Universidad de Huelva

Departamento de Ciencias Agroforestales

Utilización de fotoperiodo artificial, melatonina exógena y/o efecto macho para la mejora de los parámetros reproductivos de caprinos mediterráneos

Memoria para optar al grado de doctora
presentada por:

María Carolina Gatica Jorquera

Fecha de lectura: 31 de mayo de 2012

Bajo la dirección de los doctores:

Luis Ángel Zarazaga Garcés
José Luis Guzmán Guerrero

Huelva, 2012

ISBN: 978-84-15633-88-4
D.L.: H 315-2012

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AGROFORESTALES

TESIS DOCTORAL

UTILIZACIÓN DE FOTOPERIODO ARTIFICIAL, MELATONINA EXOGENA Y/O EFECTO MACHO PARA LA MEJORA DE LOS PARÁMETROS REPRODUCTIVOS DE CAPRINOS MEDITERRÁNEOS.

Memoria presentada por: MARÍA CAROLINA GATICA JORQUERA

para optar al grado de Doctora

Dirigida por: DR. LUIS ÁNGEL ZARAZAGA GARCÉS

DR. JOSÉ LUIS GUZMÁN GUERRERO

Huelva, Abril de 2012

"A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota."

Teresa de Calcuta

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN **1**

SUMMARY **13**

JUSTIFICACIÓN **23**

GLOSARIO TÉRMINOS Y ABREVIATURAS **29**

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA **35**

OBJETIVOS **105**

ARTÍCULOS PUBLICADOS **109**

DISCUSIÓN GENERAL **163**

CONCLUSIONES **177**

CONCLUSIONS **181**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS **185**

OTRAS PUBLICACIONES **235**

Universidad de Huelva

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: "UTILIZACIÓN DE FOTOPERIODO ARTIFICIAL, MELATONINA EXÓGENA Y/O EFECTO MACHO PARA LA MEJORA DE LOS PARÁMETROS REPRODUCTIVOS DE CAPRINOS MEDITERRÁNEOS", que se recoge en la siguiente memoria y de la que es autora Dña. MARÍA CAROLINA GATICA JORQUERA, Ingeniera Agrícola, 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 PETRI 95-0964.OP cuyo investigador principal ha sido el Dr. Luis Ángel Zarazaga Garcés.

Los estudios de Doctorado han sido financiados con aportes propios de la Universidad Arturo Prat del Estado de Chile y por el fondo del Proyecto MECESUP UAP 0204 del Ministerio de Educación de Chile.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar por quién hizo posible que pudiese realizar y finalizar mis estudios de Doctorado, por entregar de manera generosa sus conocimientos y experiencias, por ser un modelo a seguir en el ámbito científico y en el trabajo experimental, pero por sobre todo una gran persona, quien tuvo una paciencia casi infinita, mi Director de Tesis, Don Luis Ángel Zarazaga Garcés, sin su guía, no lo habría logrado. Muchísimas gracias de todo corazón.

A Don José Luis Guzmán Guerrero, también mi Director de Tesis, por su valioso aporte durante todo el trabajo realizado, por entregar y transmitir su experiencia y rigurosidad. Por su gran entrega personal y su calidez. Sin él tampoco lo habría logrado.

A mis dos Directores, toda mi gratitud y admiración por siempre.

A mi gran amiga Rocío Prieto, su amistad es uno de los resultados más valiosos de este proceso de Doctorado. Gracias a toda su familia, que me acogió junto a los míos como parte de ellos.

A mi amiga y casi Hermana, Rocío Muñoz, por su gran ayuda, apoyo emocional y por estar siempre conmigo, en las buenas y en las malas.

A mi amiga Irma Celi, por su amistad, por todo el tiempo que me dedicó, por ser mi "representante" en todos los trámites. Y lo más importante, por su gran ayuda en el desarrollo de esta Tesis.

A Carmen, Andrés, Manuel, Ignacio y José María, su ayuda y amistad hicieron mis días más alegres. Gracias por su ayuda en el trabajo y por su cálido apoyo. Carmen, Andrés y Manuel, gracias porque fueron como mi familia en España.

A mi amiga Elisa, por acogerme siempre que lo necesité, por su ayuda incondicional y por su amistad.

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 y especialmente a Benoît Malpaux que participó de forma decisiva en el diseño experimental de los trabajos aquí presentados.

A mi familia, mi hermana María Isabel, mi cuñada Cecilia, mis suegros. Por su constante apoyo para que finalizara este trabajo.

Por último, quise dejar para el final a mis seres cercanos, a mi madre María Angélica, quien me regaló parte de su vida para acompañarme en momentos difíciles y en este largo proceso. A mi hija Sofía que desde pequeñita me acompaña en los sacrificios y aventuras en las que me embarco. A Francisco mi marido, por su apoyo, su compañía en las largas jornadas de trabajo, por su esfuerzo en mantener nuestra familia feliz, por el amor que me entrega. A Javiera, mi segunda hija, por su apoyo y todas las alegrías que me ha dado

A todos, mi cariño sincero e infinito agradecimiento.

A mi hija Sofía con Amor y Esperanza

RESUMEN

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo ha sido evaluar la utilización del fotoperiodo artificial, la aplicación de melatonina y el efecto macho para inducir actividad reproductiva durante el periodo de anestro estacionario en caprinos Mediterráneos.

Para la consecución de este objetivo se han llevado a cabo cinco experimentos. 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 ellos, excepto uno, se realizaron en la Granja Experimental de la Universidad de Huelva (latitud: 37º 12' N; longitud 6º 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).

El primer experimento fue diseñado para determinar si el tratamiento con implantes de melatonina exógena, aplicados en el equinoccio de primavera, podía inducir actividad reproductiva en época de anestro estacionario en hembras sin separación de los machos. Además, se evaluó el efecto a medio plazo del tratamiento con melatonina, estudiando el reinicio de la siguiente época normal de actividad reproductiva.

Para ello, se emplearon 29 hembras adultas, no preñadas, que fueron distribuidas en dos grupos, uno que fue tratado con melatonina en el equinoccio de primavera (18 de marzo) (M, n=14) y otro que no recibió ningún tipo de tratamiento y ejerció de lote control (C, n=15). Los grupos fueron equilibrados en función de su peso vivo y condición corporal al comienzo del experimento. También se utilizó un tercer grupo, de cabras ovariectomizadas e implantadas con estradiol y tratadas con melatonina (OVX, n=5), que estuvo aislado de todo contacto con los machos durante todo el experimento, con el fin de evaluar el efecto del implante de melatonina sobre la actividad hipofisaria. En los grupos M y C se realizó detección diaria de celos (actividad estral), utilizando machos enteros provistos de mandil y la tasa de ovulación fue determinada por laparoscopia a los 7 días de la detección de cada celo. Semanalmente, se midió la concentración plasmática de progesterona (actividad ovárica) en los grupos M y C y de LH en el grupo OVX, así como el peso vivo y la condición corporal en todos los grupos.

No se observó efecto del tratamiento con melatonina sobre el peso vivo ni sobre la condición corporal, sin embargo, sí que existió efecto del tiempo ($P<0,001$) e interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P<0,05$) sobre el peso vivo, indicando que la evolución de éste a lo largo del experimento fue diferente entre el grupo M y C.

Durante el periodo de anestro estacionario todas las hembras del grupo M presentaron un claro aumento de las concentraciones plasmáticas de progesterona ($P<0,001$) y ninguna hembra del grupo control, a pesar de que estaban en contacto con las hembras del lote M. La tasa de ovulación del primer celo detectado durante esta época, en el grupo M, fue de 1,60 ± 0,2 cuerpos lúteos. Por otra parte, el 85,7% de las hembras de este grupo mostró actividad estral en esta época, iniciándose a los 33 días de la colocación del implante en el 57,1% de las hembras, siendo la fecha media de aparición del primer celo el 20 de abril ± 5,02 días.

En la siguiente época de actividad reproductiva se inició la actividad ovárica, el día 7 de septiembre (± 3,19 días) y el día 20 de agosto (± 6,97 días), en los grupos M y C, respectivamente, ($P<0,05$) permaneciendo las concentraciones elevadas de progesterona hasta el final del experimento. De este modo, el tratamiento con melatonina produjo un inicio más tardío de la salida en celo en la siguiente época de actividad reproductiva natural (11 de septiembre ± 3,31 días vs 22 de agosto ± 6,12 días, para el grupo M y C, respectivamente, $P<0,001$). El rango de inicio de la actividad estral fue desde el 26 de agosto hasta el 27 de septiembre en el grupo M y desde el 8 de julio hasta el 23 de septiembre para el grupo C. No se observó efecto del tratamiento sobre la tasa de ovulación en el primer celo de esta época.

En relación con la evolución de las concentraciones de LH en el grupo OVX, fue muy similar a la de la progesterona del grupo M y se incrementaron rápidamente tras la colocación del implante. Se presentaron dos periodos de concentraciones de LH elevadas (>0,5 ng/ml): el primero empezó el 17 de abril (± 10,17 días) y el segundo empezó el 11 de septiembre (± 12,35 días), permaneciendo así hasta el final de experimento.

Por tanto, la utilización de implantes de melatonina, entorno al equinoccio de primavera en caprinos Mediterráneos, es capaz de inducir por sí misma actividad reproductiva durante este periodo de anestro estacionario, sin necesidad de separación de los machos, aunque provoca un ligero retraso en el inicio de la siguiente época normal de actividad reproductiva.

El segundo experimento fue diseñado para determinar si la combinación de fotoperiodo artificial de días largos con la posterior aplicación de melatonina exógena es capaz de inducir actividad reproductiva durante el periodo de anestro estacionario (primavera) en cabras sin separación de los machos y además, si este tratamiento provoca alguna variación en el inicio de la siguiente época de actividad reproductiva natural.

Comenzó el 4 de noviembre de 2005 y finalizó el 27 de octubre de 2006. Se utilizaron 34 hembras adultas, enteras, que se distribuyeron en dos grupos, equilibrados en función de su peso vivo y condición corporal. Diecisiete de ellas fueron expuestas a fotoperiodo artificial de días largos (16 horas de luz diaria), desde el 14 de noviembre de 2005 al 20 de febrero de 2006, momento en el que se les colocó un implante subcutáneo de melatonina y fueron expuestas a fotoperiodo natural (DL-M). Las 17 hembras restantes se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo natural (C). Ambos grupos se mantuvieron en contacto permanente con machos durante todo el experimento. Se detectaron celos diariamente con machos enteros provistos de mandil y se determinó la tasa de ovulación por laparoscopia a los 7 días de la detección del celo; igualmente, se determinó semanalmente el peso vivo, la condición corporal y las concentraciones plasmáticas de progesterona.

Se observó un claro efecto del tiempo ($P<0,001$) y una interacción significativa entre tratamiento y tiempo ($P<0,05$) sobre el peso vivo. Las cabras del grupo DL-M mostraron un aumento de peso vivo durante el tratamiento de fotoperiodo artificial, periodo durante el cual se redujo más rápidamente su actividad reproductiva y posteriormente mostraron pérdidas de peso vivo durante el periodo de actividad reproductiva inducida por el tratamiento durante la primavera. Respecto a la condición corporal, sólo se observó un claro efecto del tiempo ($P<0,001$).

Durante el periodo de anestro estacionario un 94,1% de las hembras del grupo DL-M presentaron actividad ovárica ($P<0,001$) y un 88,2% actividad estral, a diferencia del grupo C, donde ninguna mostró actividad alguna. La tasa de ovulación promedio del primer celo detectado, durante el periodo de anestro estacionario, fue de 1,93 ± 0,2 cuerpos lúteos.

Finalmente, el reinicio de la actividad reproductiva en la siguiente época normal varió en dos semanas, siendo más tardía la del grupo DL-M ($P<0,05$), (28 de septiembre ± 6,1 días y 18 de septiembre ± 5,2 días para los grupos DL-M y C respectivamente).

Podemos concluir que el tratamiento con fotoperiodo artificial de días largos durante tres meses y la colocación de implantes de melatonina al finalizar éste, sin la separación de los machos, puede inducir actividad ovárica y estral en periodo de anestro estacionario, aunque, de nuevo, causa un pequeño retraso en el reinicio de la actividad reproductiva normal en la siguiente época.

El objetivo del tercer experimento fue determinar si un tratamiento de fotoperiodo artificial de días largos durante tres meses y sin separación de los machos es capaz de estimular actividad reproductiva durante el periodo de anestro estacionario en hembras caprinas y además evaluar si este tratamiento provoca alguna variación en el reinicio de la nueva época de actividad reproductiva.

Se utilizaron 39 hembras adultas, enteras y no preñadas, que fueron divididas en dos grupos equilibrados en base a su peso vivo y condición corporal al inicio del experimento. El primer grupo recibió un tratamiento de fotoperiodo artificial de días largos (16 horas de luz) desde el 17 de noviembre del 2006 al 5 de febrero del 2007 (DL; n=18). El resto de las hembras formaron el grupo control que fue mantenido en condiciones de fotoperiodo natural (C; n=21). Ambos grupos se mantuvieron en contacto durante todo el experimento con machos. La toma de datos se realizó con la misma metodología y frecuencia que en los experimentos anteriores.

El grupo DL experimentó un aumento del peso vivo durante el periodo de tratamiento fotoperiódico y perdió peso durante la primavera ($P<0,001$). En cuanto a la condición corporal sólo se vio influenciada por el paso del tiempo a lo largo del experimento ($P<0,001$).

También se observó una interacción significativa entre tiempo y tratamiento sobre las concentraciones plasmáticas de progesterona ($P<0,001$), de manera que fueron más elevadas durante el periodo de anestro estacionario en el grupo DL. Ninguna hembra del grupo C mostró actividad ovárica ni estral durante este periodo, sin embargo, en el grupo DL un 72% de las hembras mostraron actividad ovárica, si bien sólo un 33% del total mostraron celos ($P<0,01$). La tasa de ovulación del primer celo detectado por los machos en el grupo DL fue de $1,67 \pm 0,2$ cuerpos lúteos. En este caso, no se observó diferencias significativas entre los grupos en la reactivación de la actividad reproductiva en la nueva época de actividad sexual.

Por lo tanto, el tratamiento con tres meses de exposición a fotoperiodo artificial de días largos y con contacto permanente con machos parece ser no muy adecuado para ser empleado a nivel de explotación, puesto que, aunque estimuló la actividad luteal durante el periodo de anestro estacionario no fue capaz de provocar celos de forma masiva, por lo que tal vez debería ser asociado a otras prácticas para lograr una adecuada respuesta reproductiva. Dicho tratamiento no modificó el inicio de la siguiente época de actividad reproductiva natural.

El cuarto experimento se diseñó con el objetivo de evaluar el protocolo más eficaz de aplicación de los implantes de melatonina entorno al equinoccio de primavera en dos razas caprinas Mediterráneas, en función de si son aplicados sólo a las hembras, sólo a los machos o a ambos sexos.

Para ello, se realizaron, a su vez, dos ensayos. El primero tenía un diseño factorial 2x2, en función de que los machos y/o las hembras fueran tratados o no con melatonina. Se utilizaron 419, 510 y 631 cabras de raza Murciano-Granadina durante tres años consecutivos. En el segundo ensayo se realizó el mismo protocolo experimental con 635 cabras de raza Payoya, sólo en el año 2009 (los resultados fueron comparados con los resultados obtenidos ese mismo año en las hembras de raza Murciano-Granadina). De este modo, para cada raza, se formaron cuatro grupos: lote de hembras control cubiertas con machos control (HC/MC), lote de hembras control cubiertas con machos implantados con melatonina (HC/MM), lote de hembras tratadas con melatonina cubiertas con machos control (HM/MC) y lote de hembras tratadas con melatonina cubiertas con machos tratados con melatonina (HM/MM).

Los implantes de melatonina fueron colocados el 21 de abril de 2007, el 26 de abril de 2008 y el 17 de abril de 2009 subcutáneamente en la base de la oreja izquierda, conteniendo 18 mg de la hormona (Melovine®, CEVA Salud Animal, Barcelona, España). A las hembras se les colocó sólo un implante de melatonina, mientras que a los machos se les colocaron tres.

En el momento de la colocación de los implantes se separaron los machos de las hembras y se introdujeron con las hembras, de todos los grupos, a los 45 días de la colocación del implante de melatonina, permaneciendo juntos durante aproximadamente 1 mes. El número de hembras por macho osciló entre 14 y 17, dependiendo del año y del grupo de cubrición. Los grupos estaban separados unos de otros por al menos 100 m de distancia.

Se determinó la fertilidad (porcentaje de hembras que parieron), la prolificidad (número de crías por hembra parida) y la productividad (número de crías por hembra del lote). El número adicional de crías por cabra de cada lote se comparó con respecto al grupo control (HC/MC). También se registró la fecha de parto de cada una de las hembras, así como el tiempo transcurrido entre la introducción de los machos y el parto, considerando como día 0 el día de introducción de los machos.

En el primer ensayo de este experimento, los resultados se analizaron conjuntamente, dado que no hubo diferencias significativas entre los grupos sobre los parámetros analizados entre los tres años. Los mejores parámetros reproductivos se obtuvieron cuando los animales fueron implantados, ya fueran hembras o machos. Respecto a las hembras, la fertilidad fue de 71,1% vs 57,0% para los grupos HM y HC, respectivamente; y la productividad de 1,37 ± 0,04 vs 1,12 ± 0,03 crías por hembra, para los grupos HM y HC, respectivamente ($P<0,01$). Respecto a los machos, la fertilidad fue de 65,9% vs 58,4% para los grupos MM y MC, respectivamente; y la productividad de 1,28 ± 0,03 crías por hembra vs 1,13 ± 0,04 crías por hembra, para los grupos MM y MC, respectivamente, $P<0,01$. No se observaron diferencias en la prolificidad entre ambos grupos. Además, se observó una interacción entre el sexo que recibía el tratamiento y el tratamiento con melatonina ($P<0,05$) sobre la productividad. De manera que el tratamiento de los machos con melatonina no la mejoraba en las hembras tratadas con melatonina pero sí la aumentaba en las hembras control.

En el segundo ensayo de este experimento, los resultados reproductivos de las hembras de raza Murciano-Granadina fueron superiores a los de la raza Payoya (fertilidad: 65% vs 55%; prolificidad: 1,93 ± 0,02 vs 1,82 ± 0,03 crías por hembra y productividad: 1,26 ± 0,04 vs 1,00 ± 0,04 crías nacidas por hembra, para las razas Murciano-Granadina y Payoya, respectivamente ($P<0.01$). La fertilidad y productividad se incrementaron en ambas razas cuando las hembras fueron implantadas con melatonina, pero hubo diferentes respuestas al tratamiento. En la raza Murciano-Granadina se obtuvo un gran incremento en el número de crías nacidas por hembra cuando las hembras fueron tratadas con melatonina, independientemente de que los machos hubieran sido tratados o no (0,54 crías extra y 59% de aumento y 0,53 crías extra y 58% de aumento, para HM-MC y HM-MM, respectivamente) ($P<0,01$), este incremento se obtuvo también, en la raza Payoya, en el grupo HM-MC (0,19 crías extra y 19% de aumento).

Podemos concluir que los mejores resultados reproductivos se obtienen cuando las hembras en ambas razas son tratadas con implantes de melatonina. Además, en el caso de la raza Murciano-Granadina la colocación de implantes de melatonina a los machos se muestra ventajosa cuando se va a cubrir hembras que no están implantadas. Por último, se han observado importantes variaciones en los parámetros reproductivos y en la respuesta al tratamiento entre las razas.

El quinto experimento fue diseñado para determinar si el uso de fotoperiodo artificial de días largos (16 horas de luz) y/o la aplicación de melatonina exógena son efectivos para inducir actividad reproductiva durante el periodo de anestro estacionario en machos cabríos. Además, se determinó si estos tratamientos modificaban el inicio de la siguiente época de actividad reproductiva.

Para ello, se realizaron otros 2 ensayos. En el primero 19 machos adultos fueron distribuidos en 3 grupos experimentales. Catorce, fueron sometidos a un fotoperiodo artificial de 16 horas diarias de luz durante 98 días (finales de otoño a finales de invierno). Al finalizar este tratamiento, a 7 de ellos se les colocaron 3 implantes subcutáneos de melatonina (DL-M), mientras que al resto de machos se les alojó en condiciones de fotoperiodo natural (DL, n=7). Los restantes 5 machos fueron mantenidos, durante todo el experimento, en condiciones de fotoperiodo natural (C1).

En el segundo ensayo se utilizaron dos grupos experimentales. A 7 machos se les colocaron 3 implantes subcutáneos de melatonina en torno al equinoccio de primavera (M) y a otros 5 machos se les mantuvo en condiciones de fotoperiodo natural actuando como grupo control (C2).

Se determinó el peso vivo, peso testicular y las concentraciones plasmáticas de testosterona semanalmente. Se realizaron extracciones de semen mensuales en las que se evaluó también el comportamiento sexual de los machos y la producción de semen. En este sentido, se controló el tiempo de eyaculación y el porcentaje de machos que eyaculaban, así como el porcentaje de machos activos (machos que intentaban eyacular por lo menos dos veces pero que finalmente no conseguían eyacular durante los 5 minutos).

En el ensayo 1 de este quinto experimento, a diferencia del ensayo 2, se observó una interacción significativa entre el tiempo y el grupo experimental, tanto sobre el peso vivo ($P<0,05$) como sobre el peso testicular ($P<0,001$), de manera que las variaciones

observadas se produjeron de diferente manera entre los grupos tratados y el grupo control.

Durante el anestro estacionario (primavera) todos los grupos tratados mostraron concentraciones plasmáticas de testosterona más elevadas que los grupos control. Y una vez desencadenado ese incremento de las concentraciones de testosterona, éstas descendieron a niveles basales hasta que se inició la actividad reproductiva en la siguiente época de actividad reproductiva natural, que se retrasó sólo en el grupo DL-M ($P<0,01$).

El tiempo de eyaculación fue menor en los lotes DL-M y DL en relación a su control ($P<0,001$), pero fue superior en el grupo M en relación a su control ($P<0,01$). Igualmente, en el ensayo 1 hubo diferencias entre los grupos en cuanto al porcentaje de machos que eyaculaban ($P<0,001$) y el porcentaje de machos que estuvieron activos ($P<0,001$), que fue menor en ambos casos en el lote DL. Sin embargo, en el ensayo 2 no hubo diferencias entre los grupos.

Finalmente, todos los grupos tratados tuvieron un volumen de eyaculado mayor que sus controles (Ensayo 1: 1,16 ± 0,04 ml, 1,16 ± 0,04 ml, y 1,08 ± 0,04 ml, para los grupos DL-M DL y C1, respectivamente, $P<0,01$; Ensayo 2: 1,04 ± 0,07 ml vs 0,77 ± 0,05 ml, para los grupos M y C2, respectivamente, $P<0,01$). Además, en el ensayo 2 el tratamiento con melatonina incrementó significativamente tanto la concentración como la producción espermática ($P<0,001$).

Los resultados obtenidos, en este último experimento, demuestran que el tratamiento con días largos artificiales y/o melatonina, en machos cabríos, provoca un incremento de las concentraciones plasmáticas de testosterona durante el anestro estacional. Además, en el caso de los machos control, el haber estado en contacto con los machos tratados no les provocó una estimulación de la secreción de testosterona durante este periodo. Finalmente, el tratamiento sólo con días largos resultó ser el menos efectivo, medido en términos de porcentaje de machos que eyaculaban o que estaban sexualmente activos.

En conjunto, de los resultados obtenidos en la presente memoria, se puede concluir señalando que tanto la utilización de implantes de melatonina entorno al equinoccio de primavera como el tratamiento con fotoperiodo artificial de días largos antes de colocar el implante de melatonina provocan, en hembras y en machos,

actividad reproductiva durante este periodo de anestro estacionario. Sin embargo, el tratamiento sólo con tres meses de días largos en hembras no fue capaz de provocar celos de forma masiva durante la primavera y también fue el tratamiento que resultó menos efectivo, en términos de porcentaje de machos que eyaculaban o que estaban sexualmente activos, cuando se aplicó a los machos cabríos. Finalmente, en cuanto al protocolo de utilización de los implantes de melatonina, los mejores resultados reproductivos se obtienen cuando al menos las hembras son tratadas con ellos.

SUMMARY

SUMMARY

The main aim of this work was to evaluate the effect of different treatments on the reproductive parameters during the non-breeding season in Mediterranean goats, including the use of exogenous melatonin, artificial long days and male effect. For this aim, five experiments were conducted.

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. All experiments, except one, were performed at the experimental farm from the University of Huelva (latitude: 37º 12' N; longitude 6º 54' O) which meets the requirements of the European Union Directive 86/609 in relation to the animal protection and handling of animals used in scientific experiments (Directive 2010/63). The first experiment was designed to determine whether treatment with exogenous melatonin inserted at the spring equinox can induce reproductive activity during the non-breeding season in Mediterranean female goat without the use of male effect and whether this treatment causes a variation in the reactivation of reproductive activity in the natural breeding season.

Twenty-nine entire, non-pregnant adult female goats were used. The goats were distributed into two experimental groups, balanced for live weight and body condition score. Both groups-the control group (Group C, n = 15) and the melatonin-treated group (Group M, n=14)-were kept in the same communal yard with an uncovered area throughout the experiment. On March 18, Group M received 1 subcutaneous melatonin implant. In addition, a third group of ovariectomized, estradiol treated goat does (OVX, n=5) were implanted with exogenous melatonin at the same date as the entire females, this group was completely isolated from the rest to determine the effect of melatonin implant on pituitary activity. Oestrous activity was checked daily using entire aproned bucks with the entire females and ovulation rate was determined by laparoscopy 7 days after positive identification of oestrus. Blood samples were collected weekly from each animal by jugular venipuncture and assayed for progesterone in M and C Groups and LH in OVX Group. Live weight and body condition score were recorded weekly for all animals.

No effect of melatonin treatment on live weight and body condition score was observed. However, there was a clear effect of time ($P<0.001$) and a treatment by time interaction ($P<0.05$) on live weight, as a consequence, the evolution of live weight in the experiment was different between M and C group.

In entire goats, a clear treatment by time interaction was observed for progesterone concentrations ($P<0.001$), with a period of high progesterone concentrations during the natural seasonal anoestrous in Group M. In this way, during the non-breeding season whereas all females of Group M showed ovarian activity ($P<0.001$), no female of Group C did it in spite that they were in contact. The ovulation rate of the first detected oestrus during the non-breeding season in Group M was 1.60 ± 0.20 corpora lutea. In Group M, 85.7% of the animals showed oestrous activity, and 57.1% showed the first oestrous activity in the first 33 days after implant insertion. The mean date of oestrous activity for Group M during the seasonal anoestrus was April 20 (± 5.02 days).

A second period of elevated progesterone concentrations was observed on the M group from September 7th (± 3.19 d) until the end of the experiment. The period of high progesterone concentrations for the C group was from August 20th (± 6.97 d) until the end of the experiment. The dates of the reactivation of oestrous activity in the natural breeding season were September 11st (± 3.31 days) versus August 22nd (± 6.12 d) for Groups M and C, respectively ($P<0.01$). The range of the onset of oestrus activity was from August 26th until September 27th and July 8th until September 23th for Groups M and C, respectively. No effect to treatment on ovulation rate in the first detected oestrus was observed.

The evolution of LH concentrations in the OVX group was very similar to that of the progesterone concentrations of the M Group and increased rapidly after implant insertion. This group showed two periods of high LH concentrations (higher than 0.5 ng/mL): the first started on April 17th (± 10.17 d) and the second period was from September 11st (± 12.35 d) until the end of the experiment. The results of the current experiment support the hypothesis that Mediterranean goat does treated with exogenous melatonin and without separation from males showed a clear reproductive activity during the non-breeding season, and this treatment induces a small retardation in the reactivation of reproductive activity in the natural breeding season.

The second experiment was conducted to determine whether the treatment with artificial long days and exogenous melatonin can induce reproductive activity during spring (seasonal anoestrous) in Mediterranean goats that are in daily contact with bucks and whether this treatment causes a variation in the reactivation of the reproductive activity in the normal breeding season. The experiment started on 4 November 2005 and finished on 27 October 2006. Thirty-four adult and barren does were used, distributed into two groups balanced according to their live weight and body condition score. Seventeen females were exposed to long days (16 h of light/day) form 14 November 2005 to 20 February 2006. On 20 February they received one s.c melatonin implant (LD-M group) and were exposed to natural photoperiodic changes in an open shed. The other females during entire experiment were placed in an open shed under natural photoperiod and remained as the Control group (C group). During the experiment, the live weight, body condition score and plasma progesterone concentrations were measured weekly, oestrus activity was tested daily using entire aproned bucks, and ovulation rate was evaluated by laparoscopy 7 days after positive identification of oestrus.

A clear effect of time ($P<0.001$) on live weight was observed. Moreover, a significant interaction of time-treatment was observed for live weight ($P<0.05$). The LD-M group clearly increased their live weight during the photoperiodic treatment, when the reproductive activity decreased. After that, they showed losses of live weight when the treatment induced a clear reproductive activity during the seasonal anoestrus. Moreover, a clear effect of time ($P<0.001$) on body condition score was observed.

During the non-breeding season, 94.1% females of the LD-M group showed ovarian activity in response to the used treatment and 88.2% showed oestrous activity during this period. However no ovarian activity or oestrous activity was observed at this period on the control group. This effect was displayed on progesterone concentrations resulting in an interaction time-treatment ($P<0.001$), reflecting high concentrations during the non-breeding season in the LD-M group whereas the group C showed low progesterone concentrations during this period. The ovulation rate of the first detected oestrus in the LD-M group was 1.93 ± 0.20 corpora lutea.

Finally, the restart of the reproductive activity in the next breeding season was a slightly delayed in LD-M group (two weeks) ($P< 0.05$).

In conclusion, the results of this experiment indicate that, the photoperiodic-melatonin treatment is able to induce reproductive activity during the seasonal anoestrous in Mediterranean goat's daily contact with males and this treatment induces a slight delay in the onset of the natural breeding season in the treated females.

The aim of the third experiment was to determine whether a treatment of 3 months of artificial long days and daily contact with bucks, could stimulate reproductive activity during the normal seasonal anoestrous in Mediterranean female goats, and whether such treatment modifies the onset of the normal breeding season.

Thirty-nine adult, open does were assigned to two treatments of similar mean body weight and body condition score. One group (LD; n = 18) was housed in a light-proof building and exposed to long days (16 h of light/d) from 17 November to 5 February, and then exposed to the natural photoperiod in an open shed. The remaining females were housed in an open shed under natural photoperiod conditions throughout the experiment (control [C]; n = 21). Plasma samples for progesterone, live weight and body condition score were recorded every week. Oestrous activity was checked daily using entire aproned bucks and ovulation rate was evaluated by laparoscopy 7 days after positive identification of the oestrus. Bucks were housed close to females in a separate barn from the onset of the experiment.

As in previous experiments, there was a treatment by time interaction effect ($P<0.001$) indicating that live weight evolution differed along the time between groups. In this way the LD group showed an increase of live weight during the photoperiodic treatment and a decrease during the seasonal anoestrus where areas the C group increases their live weight. Moreover, an effect of time ($P<0.001$) was observed on body condition score.

As previous experiments, a clear interaction treatment-time on progesterone concentration was observed ($P<0.001$). The LD does showed higher progesterone concentrations during the non-breeding season than C does ($P<0.001$). On the whole, more LD does (72%) exhibited luteal activity ($P<0.05$) and 33% oestrous activity during the natural anoestrus season and was higher ($P<0.05$) than in C does that did not showed or ovarian activity or oestrous activity. Ovulation rate for the first detected oestrus during the natural anoestrus season of the LD does was 1.67 ± 0.2 corpora lutea.

Concerning the reactivation of the normal breeding season, no differences between groups were observed.

In conclusion, the results of this study support the hypothesis that increasing the photoperiod for three months during the end of the natural breeding season and daily contact with bucks, can induce the occurrence of endocrine reproductive activity during the natural anoestrus season in Mediterranean goats without affecting the onset of the next natural breeding season. However, very few does respond in terms of oestrous activity, indicating that by itself such stimulation is insufficient to induce a sufficient number of does to exhibit oestrus and be used as reproductive management strategy for out-of-season breeding in Mediterranean goats.

The aim of this fourth work was to determine if the reproductive performances using melatonin implants around the spring equinox in two Mediterranean goats' breeds could be modified depending on the used protocols (only females, only males, both or no sexes implanted) and on the used breed. Two assays were carried out. In the first assay, 419, 510 and 631 Murciano-Granadina females during three consecutive years were used. They were divided into four groups depending on if females were treated (FM) or not with melatonin (FC) and were mount with males treated with melatonin (MM) or no treated with melatonin (MC). Four types of mating, based on implantation protocol, were then allowed -females control mated with males control (FC/MC), females control mated with males implanted with melatonin (FC/MM), females implanted with melatonin mated with males control (FM/MC) and females implanted with melatonin mated with males implanted with melatonin (FM/MM)- after appropriately inducing the male effect.

In the second assay, during the year 2009, the same protocols were used with 635 Payoya females and their results were compared with the results obtained the same year on the Murciano-Granadina breed.

On 21 April 2007, 26 April 2008 and 17 April 2009 groups treated with melatonin and received one subcutaneous melatonin implant containing 18 mg of the hormone (Melovine®, CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain) at the base of the left ear. Treated males received at the same time three subcutaneous implants of the same characteristics at the base of the left ear. At the melatonin implantation, males and females were isolated.

Intact adult males were joined with female goats 45 after the implant insertion. Males were introduced into female pens in a ratio of one buck to 14-17 females depending on year and group. The day of buck introduction was designated day 0 (D0). Bucks were kept with goats for about one month to ensure fertilisation by natural mating. In addition, the distance between the four groups was more than 100 m.

The criteria used to evaluate the effect of the treatment were lambing rate or fertility (percentage of goats kidding); litter size or prolificacy (number of kids born per goat kidding) and productivity (number of kids born per goat of the group). The number of additional kids born per goat compared to the control group (FC/MC mating) was recorded and the percentage of increase calculated. Duration of pregnancy was calculated as the interval between the dates of introduction of the bucks to kidding date.

In the first assay no differences between years were observed and all years were pooled. The higher reproductive performances were obtained when at least females were implanted with melatonin (fertility: 71.1% vs. 57.0% for FM and FC groups and productivity 1.37 ± 0.04 kids⁄female vs 1.12 ± 0.03 kids⁄female for FM and FC groups, $P<0.01$) or males were implanted with melatonin (fertility: 65.9% vs 58.4% for MM and MC groups and productivity: 1.28 ± 0.03 kids⁄female and 1.13 ± 0.04 kids⁄female for MM and MC, respectively; $P<0.01$). No differences on litter size were observed between groups. Moreover, the interaction sex-melatonin treatment, had a significant effect on productivity ($P<0.05$). The treatment of males with melatonin did not improve the productivity of melatonin-treated females. In contrast, the productivity of control females was higher in groups joining melatonin-treated rather than control bucks.

In the second assay, all reproductive performances studied were higher in the Murciano-Granadina breed than in the Payoya breed (Fertility: 65% vs 55%; prolificacy: 1.93 ± 0.02 kids per goat vs 1.82 ± 0.03 kids per goat and productivity: 1.26 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.04 number of goat kids born per female of Murciano-Granadina and Payoya breeds, respectively) ($P<0.01$). Fertility and productivity was increased in both breeds when females were implanted with melatonin but differences in the response to the melatonin treatment between breeds were observed. The highest increase in the number of kids born per goat was obtained when at least females were treated with melatonin (0.54 extra kids-59% of increase and 0.53 extra kids-58% of increase for FM/MC and FM/MM, respectively) in the Murciano-Granadina breed. Whereas the

highest increase in the Payoya breed was obtained in the FM/MC group (0.19 extra kids 19% of increase).

These results demonstrate that the higher reproductive performances using melatonin treatment in Mediterranean goats (Payoya and Murciano-Granadina breeds) are obtained when at least females are treated with melatonin. For the Murciano-Granadina breed the melatonin treatment applied to the males allowed to increase the reproductive performances when used with non treated females. Finally, important differences in reproductive performance and response to the melatonin treatment are seen between breeds.

The fifth experiment was conducted to determine whether treatments using photoperiod (long days) and/or exogenous melatonin are effective in enhancing reproductive activity during the natural anoestrus season in Mediterranean bucks and whether this treatment causes a variation in the reactivation of the reproductive activity in the normal breeding season.

Two assays were carried out. In the first assay, 19 adult bucks were allotted to 3 different groups. Fourteen bucks were exposed to 16 h of light/day (long day) for 98 days (late autumn-winter). At the end of the long day treatment, 7 bucks received 3 s.c. melatonin implants (LD-M group), and the other bucks remained as long day group (LD group, n = 7). The control group (C1, n = 5), remained under natural photoperiod. In the second assay, 7 bucks received 3 s.c. melatonin implants at the spring equinox (M group, n = 7), while the other 5 bucks remained as the control group (C2, n = 5).

Live weight, Testicular weight and plasma testosterone concentration were recorded weekly throughout the study. Moreover, semen was collected monthly to evaluate semen production and sexual behaviour. The ejaculation latency and the percentage of bucks that ejaculated and the percentage of active males (bucks that attempted to ejaculate at least twice, but did not achieve ejaculation within 5 min), were recorded. The reproductive status of the bucks was assessed using the characteristics of the plasma testosterone profile.

In the first assay, a clear interaction time-group was observed in live weight ($P<0.05$) and in TW ($P<0.001$), this interaction was not observed in the second assay showing that the evolution of those parameters were different between treated and the control group.

During the natural anoestrus season (spring), the treated groups recorded higher plasma testosterone concentrations than the control groups. After that, the testosterone concentrations decreased in the treated groups. And the reactivation of the natural reproductive season was delayed only in the LD-M group ($P<0.01$).

The ejaculation latency was lower in the LD-M and LD group than C group ($P<0.001$) but the M group was higher than C group ($P<0.01$). Similarly, in the first assay they were differences between groups on the percentage of males that ejaculated ($P<0.001$) and the percentage of active males ($P<0.001$) lower for both variables in the LD group. However, no differences were observed between M and C2 groups.

All treated bucks showed a higher mean semen volume, than the control groups (Exp 1: 1.16 ± 0.04 mL, 1.16 ± 0.04 mL, and 1.08 ± 0.04 mL, for the LD-M, LD, and C1 groups, respectively ($P<0.01$); Exp 2: 1.04 ± 0.07 mL vs 0.77 ± 0.05 mL, for M and C2 groups, respectively; ($P<0.01$). Moreover in the second assay M group showed higher sperm concentration and sperm production ($P<0.001$).

These results demonstrate that the treatment with artificial long days and/or melatonin at Mediterranean latitudes in bucks can induce an increase in plasma testosterone concentration during the natural seasonal anoestrous. The control groups, although in contact with the treated bucks, did not show an increase in the concentrations of testosterone during this period. The treatment of long day and melatonin induced a delay in the onset of the natural reproductive (breeding) season. Finally the treatment with only long day seems to be least effective, measured by the percentages of males that ejaculated or were sexually active.

According to the obtained results we can conclude for Mediterranean goats, that the use of melatonin implants around the spring equinox and 3 months of artificial long days before a treatment with exogenous melatonin are able to induce reproduce activity in females and males during the non-breeding season. However, the treatment with three months of long days was not able to induce oestrous activity during the seasonal anoestrous and was less effective in terms of percentage of ejaculating or active males. Concerning the melatonin procedure, the higher reproductive performances were obtained when at least females were treated with melatonin.

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

Los animales de granja representan, para todos los países, una fuente importante de recursos que pueden contribuir a la producción alimentaria y satisfacer las necesidades humanas, por lo que tienen un valor estratégico en el cual se debe trabajar para ser mantenido.

En su vertiente socioeconómica, el manejo tradicional de rebaños de ovino y caprino asegura la presencia humana en las zonas rurales menos favorecidas, donde la presencia constante del pastor es uno de los factores que frena el riesgo de despoblación y contribuye a mantener en buenas condiciones agroambientales dehesas, montes, prados y rastrojeras. Aunque también existen sistemas altamente tecnificados de alta producción y complejidad.

En la Unión Europea, el caprino se concentra en la Cuenca Mediterránea, siendo los países con más censo Grecia, España, Francia, Italia y Portugal en este orden, entre los cinco poseen casi el 80 % del ganado caprino. Existen, igualmente, grandes diferencias en los sistemas de producción, desde sistemas intensivos de producción lechera (Francia), hasta sistemas semi-extensivos carne-leche (predominan en Grecia, Italia y Portugal), pasando por sistemas semi-extensivos lecheros (predominan en España) (EUROSTAT, 2010).

En el mercado intracomunitario de leche de cabra se destaca la capacidad importadora de Francia desde otros países, fundamentalmente España, habiendo disminuido considerablemente desde el año 2008.

En España el censo de ganado caprino se ha mantenido estable en los últimos años gracias al buen mercado, tanto de la leche como del cabrito lechal. En cuanto a la producción lechera se ha pasado de 370 millones de litros en 1996 a más de 470 en 2009, incrementándose en un 27% la producción con un censo similar, lo que denota la mejora que se está produciendo en este sector y el potencial que representa. Respecto a la distribución territorial, hay una gran diferencia entre las distintas Comunidades Autónomas, concentrándose este ganado en el sur, donde destaca Andalucía y Canarias, con más del 40 % del censo nacional y más del 50% de la producción lechera. (EUROSTAT, 2010)

El sector productor de la carne de ovino y caprino en Andalucía presenta una elevada complejidad, debido a la gran diversidad de sistemas de producción existentes, los cuales se encuentran condicionados por factores como los cultivos de la zona, el acceso a los montes, a los pastos, a los barbechos, etc., así como por el gran número de razas autóctonas presentes, de distintas aptitudes de producción y muy bien adaptadas al medio natural. El ganado caprino se encuentra fundamentalmente dedicado a la producción láctea, siendo escasa la orientación a la producción de carne.

Por otro lado, la estacionalidad de la reproducción es una de las principales limitantes de la productividad de las explotaciones en pequeños rumiantes (Yeates, 1949). Estas variaciones de la actividad reproductiva a lo largo del año se manifiestan tanto en las hembras como en los machos (Karsch *et al*., 1984). En los pequeños rumiantes, dicha estacionalidad, está fuertemente influenciada por diferentes factores medioambientales entre los que se encuentra el nivel de alimentación y el fotoperiodo. Recientemente, se ha puesto en evidencia que, en caprinos Mediterráneos, la alimentación tiene un efecto reducido sobre la duración del anestro estacionario tanto en la hembra (Zarazaga *et al*., 2005) como en el macho (Zarazaga *et al*., 2009). Por lo tanto, quedaría el fotoperiodo, a través de su intermediario que es la melatonina, como factor medioambiental más importante que controle la estacionalidad reproductiva de caprinos autóctonos. De este modo, recientemente se ha demostrado, en las razas caprinas españolas Mediterráneas, cuál es el papel y la influencia del fotoperiodo sobre la estacionalidad reproductiva, demostrándose que éste es el principal factor que controla la actividad sexual a lo largo del año (Gómez-Brunet *et al*., 2003; 2010; Santiago-Moreno *et al*., 2003; Zarazaga *et al*., 2011a y c).

Además, una de las prácticas más habituales en las explotaciones caprinas es la realización de efecto macho para desencadenar actividad reproductiva de las hembras durante el periodo de anestro estacionario. Si bien, parece ser que, en algunos casos, este efecto macho presenta unos resultados inferiores a los esperados debido a que los machos no se encuentran preparados sexualmente para realizar las cubriciones (Delgadillo *et al*., 2009).

De este modo, los objetivos de este trabajo han sido investigar qué tratamientos, incluyendo la utilización de fotoperiodo artificial y/o melatonina asociados o no a efecto macho, permiten desencadenar actividad reproductiva durante el periodo de anestro estacionario y obtener cubriciones durante este periodo en caprino Mediterráneo.

Además, por lo mencionado anteriormente, surgía la necesidad de comprobar si estos tratamientos son adecuados también para su utilización con machos, así como el protocolo más efectivo de la utilización de implantes de melatonina.

Con los resultados obtenidos de esta investigación se pretende la mejora y optimización de los sistemas de explotación caprina en España, mediante la incorporación de técnicas de mejora de la eficacia reproductiva que aseguren una producción sostenible, utilizando metodologías que son fácilmente aplicables a nivel de explotación. Además, estos resultados son fácil y rápidamente aplicables a nivel de cualquier explotación comercial dedicada tanto a la producción de leche como de carne.

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

1/MP03	Gen del grupo *Per*
2-iodoMT	2 iodomelatonina
5-HT	Serotonina (5-hidroxitriptamina)
A14	Núcleo dopaminérgico A14
A15	Núcleo dopaminérgico A15
AANAT	Arilalkilamina N-acetil-transferasa
Ach	Acetilcolina
ADN	Ácido Desoxirribonucléico
AHA	Área hipotalámica anterior
AHP	Área hipotalámica posterior
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
APM	Área premamilar
APO	Área preóptica
aMT6S	6-sulfatoxi-melatonina
ARC	Núcleo Arcuato
ARN	Ácido Ribonucléico
ARNm	Ácido Ribonucléico mensajero
Bmal	Gen del grupo *Per*
CA	Comisura anterior
CE	Conformidad Europea
CEE	Comunidad Económica Europea
clock	Gen del grupo *Per*
CM	Cuerpo mamilar
CRH	Hormona liberadora de corticotropinas
Cry	Gen *Cryptochrome*
Cyc	Gen *Ciclo*
CYC	Proteína sintetizada por genes Ciclo
Da	Dalton
d.C.	Después de Cristo
DHA	Área hipotalámica dorsal
DMH	Núcleo dorsomedial
DUOE	Diário Oficial Unión Europea
E_2	Estradiol
EM	Eminencia media
FAO	Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FSH	Hormona Folículo Estimulante
g	Gramos
GABA	Ácido gamma-aminobutírico (γ-aminobutírico)
GCS	Ganglio Cervical Superior
GH	Hormona del crecimiento
GHRH	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento
GMPc	Guanosín Monofosfato cíclico

CLK	Proteína codificada por genes reloj
h	Horas
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HIOMT	hidroxiindol-O-metiltransferasa
IML	Columna intermedio lateral de la espina dorsal
LH	Hormona Luteinizante
LHRH	LH-*Releasing hormone*
MEL	Melatonina
mg	Miligramos
ml	Mililitros
MTr	Receptores de Melatonina
NA	Noradrenalina
ng	Nanogramos
NAS	N-acetil-serotonina
NGL	Núcleo geniculado lateral
NMD	Núcleo medial dorsal
NPM	Núcleo pre-mamilar
NPV	Núcleo paraventricular
NPO	Núcleo preóptico
NSO	Núcleo supraóptico
NSQ	Núcleo supraquiasmático
NVM	Núcleo ventromedial
NPY	Neuropéptido Y
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
OVX+E_2	Hembra ovariectomizada portadora de un implante de estradiol
P4	Progesterona
PACAP	Polipéptido activador de la adenilato ciclasa
Per	Gen *Period*
Pg	Picogramos
PGE_2	Prostaglandina dinoprostona
$PGF_{2\alpha}$	Prostaglandina F2alfa
QOp	Quiasma óptico
RAFÉ	Núcleo del rafé
SN	Secretoneurina
Tim	Gen *Atemporal*
TH	Triptófano-hidroxilasa
TNF-α	Factor de necrosis tumoral
VIP	Péptido vasoconstrictor intestinal
VP	Vasopresina
°C	Grado Celsius

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA EN EL GANADO CAPRINO. 39

1.1 INTRODUCCIÓN. 39

1.2 FISIOLOGÍA DEL CICLO ESTRAL. 40

1.2.1. CICLO ESTRAL. 40

1.2.2. CONTROL NEUROENDOCRINO DEL CICLO ESTRAL Y SUS INTERRELACIONES. 45

1.2.2.1. CONTROL HIPOTALÁMICO. 45

1.2.2.2. CONTROL HIPOFISARIO. 50

1.3 ACTIVIDAD REPRODUCTIVA DEL MACHO CABRÍO. 55

1.3.1 ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA. 55

1.3.2 MODELO HORMONAL DEL MACHO. 57

1.3.2.1. HORMONA LUTEINIZANTE Y HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE. 57

1.3.2.2. TESTOSTERONA. 58

2. PAPEL DEL FOTOPERIODO Y MELATONINA 61

2.1. INTRODUCCIÓN. 61

2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DEL FOTOPERIODO. 62

2.2.1. FOTOPERIODO Y REPRODUCCIÓN. 62

2.2.2. FOTORREFRACTARIEDAD. 63

2.2.3. RITMO ENDÓGENO DE REPRODUCCIÓN. 65

2.2.4. INTERPRETACIÓN DE LA SEÑAL FOTOPERIÓDICA. 68

2.2.4.1. VÍA ANATÓMICA. 68

2.3. LA MELATONINA Y LA REGULACIÓN DE LA REPRODUCCIÓN. 70

2.3.1. MELATONINA: DESCUBRIMIENTO Y PROPIEDADES. 70

2.3.2. SÍNTESIS Y CATABOLISMO. 71

2.3.2.1. BIOSÍNTESIS. 71

2.3.2.2. CATABOLISMO. 75

2.3.3. MECANISMO DE ACCIÓN. 76

2.4. REGULACIÓN GENÉTICA DE LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA: LOS GENES RELOJ. 79

2.4.1. INTRODUCCIÓN. 79

2.4.2. GENES EN LOS MAMÍFEROS. 80

3. CONTROL DE LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA EN EL GANADO CAPRINO. ..83

3.1. INTRODUCCIÓN. ..83

3.2. UTILIZACIÓN DE TRATAMIENTOS FOTOPERIÓDICOS Y MELATONINA. ..84

3.2.1. INTRODUCCIÓN. ..84

3.2.2. UTILIZACIÓN DE TRATAMIENTOS FOTOPERIÓDICOS. ..85

3.2.3. UTILIZACIÓN DE IMPLANTES DE MELATONINA. ..87

3.3. LA BIOESTIMULACIÓN SEXUAL. ..93

3.3.1. INTRODUCCIÓN. ..93

3.3.2. EL EFECTO MACHO. ..94

3.3.2.1. ASPECTOS A TENER EN CUENTA EN LA EFICACIA DEL EFECTO MACHO. ..98

3.3.3. EL EFECTO HEMBRA. ..102

1. LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA EN EL GANADO CAPRINO

1.1. INTRODUCCIÓN

El estudio de la reproducción en la especie caprina se ha visto limitado, al igual que otros aspectos relacionados con su producción, ya que de entre los pequeños rumiantes es una especie que ha despertado menor interés que otras. Desde el punto de vista reproductivo, la especie caprina es una especie poliéstrica estacional, es decir, que tiene un periodo de actividad reproductiva que abarca el otoño y el invierno y un periodo de reposo sexual durante la primavera y el verano, también denominado anestro estacionario. La existencia de esta periodicidad en la actividad reproductiva no es más que un mecanismo de adaptación al medio ambiente, de forma que los partos ocurran en el periodo más favorable en cuanto a condiciones climatológicas y de disponibilidad de recursos alimenticios para la supervivencia de las crías y la lactación de la madre, que es la primavera (Karsch *et al*., 1984). De este modo, 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). Por tanto, en la especie caprina, 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), de ahí que la especie caprina se defina como una "especie de días cortos". Esta alternancia de la actividad reproductiva, existente en todas las razas caprinas fuera del ecuador, se va acentuando conforme aumenta la latitud. Sin embargo, en los bovinos de leche y la especie porcina, el proceso de domesticación ha llevado 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 del eje hipotálamo-hipofisario por uno o varios factores medioambientales, siendo el fotoperiodo el que se ha demostrado que controla en mayor medida la actividad reproductiva porque además es el más repetible de año en año (Bissonnette, 1941; Yeates, 1949; Karsch *et al*., 1984; Robinson *et al*., 1985; Arbiza, 1986; Chemineau *et al*., 1988; Maeda *et al*., 1988; Valencia *et al*., 1990; Santa María *et al*., 1990; Gómez-Brunet *et al*., 2010; Zarazaga *et al*., 2011a y c). También se han descrito otros factores relacionados con la estación del año que pueden ejercer un efecto en la regulación de la actividad sexual, como la lluvia o incluso la temperatura. Así,

Ortega *et al*. (1981) y Das (1993), demostraron que cabras nacidas en época lluviosa parieron a una edad más temprana que aquellas nacidas en periodo de sequía.

Esta estacionalidad reproductiva en caprinos y ovinos parece ser el resultado de un cambio en la sensibilidad del sistema neuroendocrino a la acción inhibitoria de estradiol. Este esteroide provoca una marcada reducción en la secreción de gonadotropinas durante la época de anestro estacionario (Legan *et al*., 1977; Karsch *et al*., 1984; Henniawati *et al*., 1995), lo que se refleja en el cambio en el patrón de secreción de GnRH (*Gonadotrophin-Releasing-Hormone*) (Karsch *et al*., 1993). Para investigar el modo de acción del estradiol se ha usado un modelo experimental utilizando hembras ovariectomizadas con un implante de estradiol, observando los cambios en la sensibilidad del eje hipotálamo-hipofisario frente a la liberación constante del esteroide que permite dicho implante (Legan *et al*., 1977; Karsch *et al*., 1984; Henniawati *et al*., 1995).

Como consecuencia de esta estacionalidad reproductiva se producen importantes variaciones a lo largo del año también 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. FISIOLOGÍA DEL CICLO ESTRAL

1.2.1. CICLO ESTRAL

El ciclo estral o sexual engloba los cambios morfológicos y fisiológicos que se producen en el ovario y tracto genital de la cabra no gestante y que desencadenan la expresión del celo (Fatet *et al*., 2010); siendo su objetivo la preparación de gametos femeninos funcionales y permitir las condiciones adecuadas para que se produzca su fecundación y nidación en el caso de que se produzca la cubrición. 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).

Durante el periodo de actividad reproductiva, la cabra presenta ciclos sexuales, de acuerdo con Asdell (1964), con una duración variable, alrededor de 21 días,

entendiendo por ciclo estral el intervalo de tiempo entre el comienzo de un periodo de celo y el siguiente, 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).

El ciclo sexual se divide en dos fases: la fase folicular que abarca las fases 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 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, que se corresponden con los días 18-21 de un ciclo y 1-2 del ciclo siguiente (Figura 1). Se divide en proestro, que se corresponde con el reclutamiento, selección y dominancia folicular, y durante el cual la secreción de estradiol, producido por los folículos ováricos en desarrollo, se va incrementando, y finaliza con la salida en celo de la hembra que se conoce como estro. El inicio del estro se corresponde con el día 0 del ciclo y, durante el mismo, la concentración de estradiol en sangre, procedente de los folículos dominantes, es máxima, finalizando con la ovulación (Fatet *et al*., 2010).

Durante esta fase folicular, la FSH hipofisaria estimula el crecimiento folicular y se producen pequeños picos de secreción de gonadotropinas y estrógenos, que corresponden a los diferentes periodos del crecimiento folicular. De éstos folículos reclutados, 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 (Fatet *et al*., 2010).

El celo se manifiesta en la cabra por un incremento en su actividad física, así como descargas de mucus por la vagina, agitaciones constantes del rabo y enrojecimiento de la vulva (Bon Durant, 1981). También es muy común la actividad homosexual (cabras montando a otras cabras) (Katz y McDonald, 1992). El comportamiento de celo se divide en dos fases: atracción del sexo opuesto y receptividad. La primera consiste en la estimulación del macho y la segunda consiste en

la inmovilización de la hembra como respuesta a los golpes realizados con las extremidades anteriores por el macho, lo que induce a la monta y a la cópula. En el inicio del estro la atracción siempre precede a la receptividad, si bien ambos comportamientos se expresan de manera simultánea (Fatet *et al*., 2010). La duración del comportamiento de estro dura alrededor de 36 horas, pero varía entre 24 y 48 horas, dependiendo de diferentes factores, entre los que destaca la raza. Así, en las razas Angora y Mossi es conocido que tienen un comportamiento de celo relativamente corto, de 22 y 20 horas, respectivamente (Shelton, 1978; Tamboura *et al*., 1998). En caprinos Criollos de México la duración del comportamiento de estro está en torno a 27 horas y en la raza Alpina francesa se describen duraciones de 31 horas (Baril *et al*., 1993). En la raza Boer la duración promedio es de 37 horas (Greyling, 2000) y en la raza Matou de China Central es de 58 horas (Moaeen-ud-Din *et al*., 2008). La edad es otro factor que incide tanto en la aparición del estro como en la duración de éste, siendo más corto en cabras jóvenes. La mayoría de las razas caprinas europeas presentan pubertad entre los cinco y diez meses de edad (Riera, 1982). Igualmente, la presencia constante del macho reduce su duración, pero no afecta a la tasa de ovulación, como así ha sido descrito en la raza Nubiana (Romano y Fernández Abella, 1997)

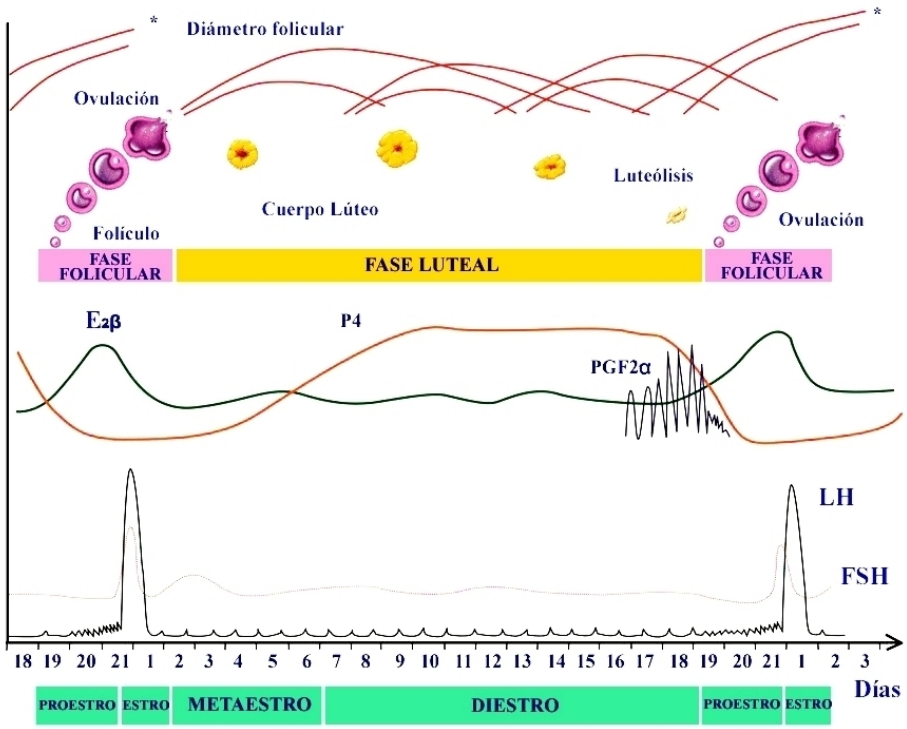
Entre las 7 y 18 horas de haberse iniciado el celo se produce el pico preovulatorio de LH que conlleva niveles de esta hormona en sangre de 20 a 100 ng/ml (Valencia y Bustamante, 1986) y que provocará la ovulación 20-26 horas después y la luteinización de las células foliculares. El momento exacto de 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). Este intervalo varía, según la raza y las características individuales del animal, entre 14,5 horas en la raza Alpina (González-Stagnaro *et al*., 1993), 14-22 horas en la raza Mossi y 8 horas en la raza Boer (Greyling, 2000).

La ruptura folicular ocurre cuando se presenta un desequilibrio entre la producción de las PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$, ya que aumenta la cantidad de esta última que se produce por un aumento de la actividad de la PGE_2-9-ketoreductasa, enzima que permite la conversión de PGE_2 a $PGF_{2\alpha}$ y que a su vez es dependiente de la secreción de progesterona (Watson *et al*., 1979). Las células de la teca y la túnica albugínea son desintegradas por la $PGF_{2\alpha}$, activando el proceso de colagenolisis, vasoconstricción y apoptosis (o muerte celular) en la superficie del folículo preovulatorio. Este mecanismo ocurre ya que provoca la liberación de la enzima TNF-α (factor de necrosis tumoral-α)

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. El rol potencial de la PGE_2 es menos notorio que el de la $PGF_{2\alpha}$. Es posible que contrarreste en forma transitoria el efecto de vasoconstricción de la $PGF_{2\alpha}$, promoviendo un edema folicular y distensión de la membrana folicular (Murdoch *et al*., 1983; Murdoch y Myers, 1983). Este estrés sería el causante de la ruptura de la debilitada membrana folicular, 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), en la maduración del oocito (Downs y Longo, 1983) y en el proceso de luteinización (Armstrong, 1981).

También es importante señalar que, 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).

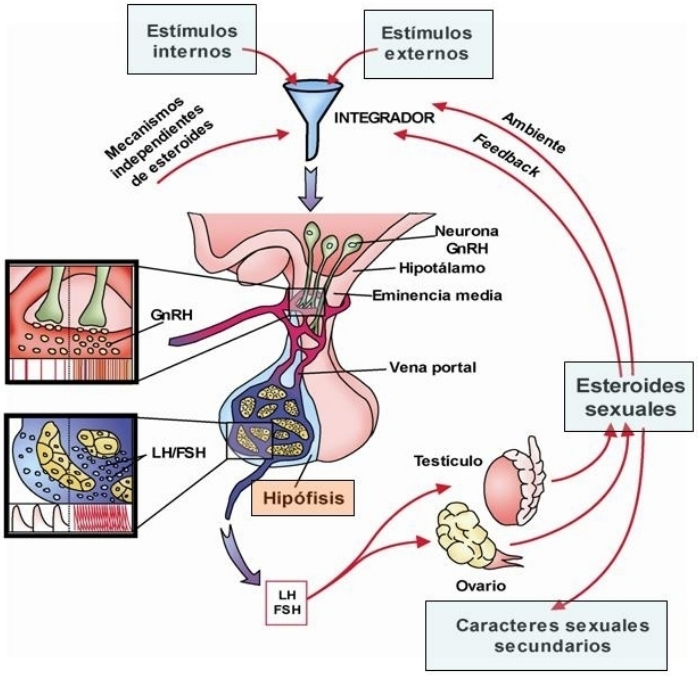
Figura 1. Representación esquemática de los diferentes eventos fisiológicos que ocurren durante el ciclo estral de la cabra: patrones de desarrollo folicular, ciclo ovárico y regulaciones endocrinas (adaptado de Baril *et al*., 1993 y Evans, 2003)



Tras la fase folicular comienza la fase luteal que se inicia tras el final del estro y su duración es de unos 16-18 días. 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). Una vez que se ha producido la ovulación, el folículo ovárico se transforma en cuerpo lúteo, que es el encargado de la producción de progesterona (P4). Esta hormona ejerce un efecto de *feedback* negativo sobre el hipotálamo (Figura 2), regulando la secreción de gonadotropinas e impidiendo que se produzca un nuevo celo y ovulación, además prepara al endometrio para la implantación del embrión y ayuda a mantener la gestación, siendo indispensable su presencia durante toda la gestación en el caso de la especie caprina (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, comienza la liberación de $PGF_{2\alpha}$ por

parte del útero, que conlleva la regresión del cuerpo lúteo o luteolisis, y se prepara al ovario para el inicio de un nuevo ciclo estral (Chemineau *et al*., 1988; Baril *et al.*, 1993).

Figura 2. Esquema representativo del eje hipotálamo-hipofisario-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 hipofisarias (adaptado de Gutiérrez, 2009).



1.2.2. CONTROL NEUROENDOCRINO DEL CICLO ESTRAL Y SUS INTERRELACIONES

1.2.2.1. CONTROL HIPOTALÁMICO

El hipotálamo es una estructura situada en la zona media de la base cerebral, rodeando a la porción ventral del tercer ventrículo (Lincoln, 1992) (Figura 3). Su función es el mantenimiento de la homeostasis a través de la regulación como

intermediario entre el sistema nervioso central y la hipófisis (Malven, 1993). Su influencia en el control de la reproducción se realiza mediante la conexión con la hipófisis a través del sistema porta, formado por una red de capilares que desciende al lóbulo anterior de la hipófisis. A través de este sistema se trasportan desde el hipotálamo los factores liberadores de hormonas (*Releasing Hormones*, RH) como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la hormona liberadora de tirotropina (TRH), la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la hormona liberadora de la hormona del crecimiento o GH (GHRH) y la somastostatina (hormona inhibidora de la secreción de GH).

A continuación, se describen los aspectos más importantes de la hormona liberadora de gonadotropina GnRH (*Gonadotrophin-Releasing Hormone*) o LHRH (LH-*Releasing Hormone*) por su rol fundamental en el control de la reproducción.

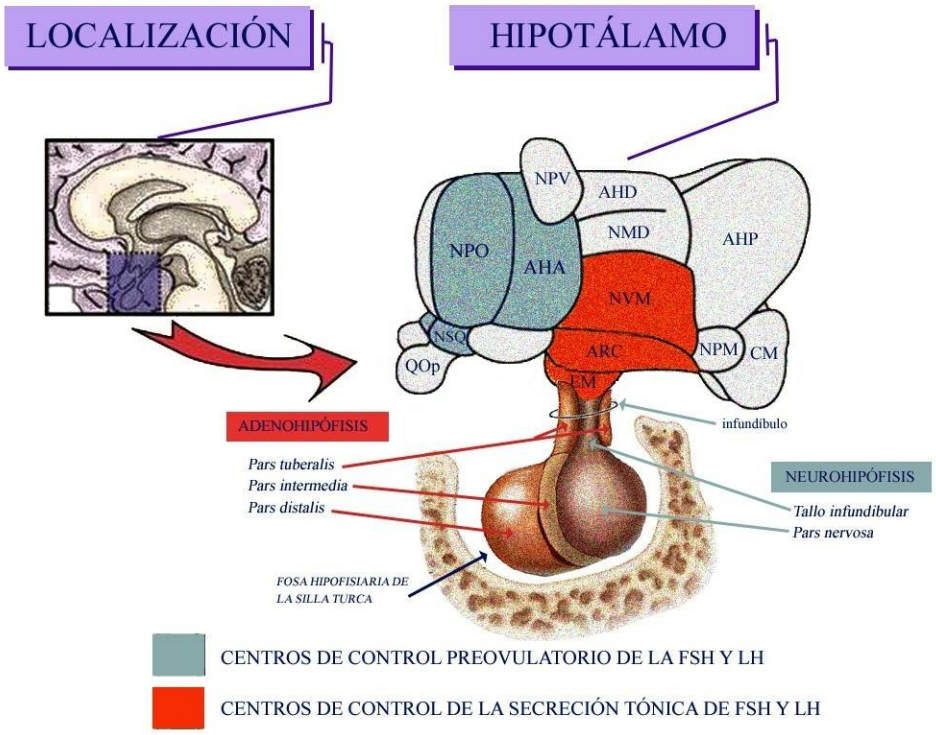
- **HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS**

Es un decapéptido perteneciente al grupo de las hormonas liberadoras, que como tales, ejercen su acción uniéndose a receptores específicos localizados en la superficie de células "diana", donde actuará y provocará la liberación de la hormona deseada (McDonald, 1989).

La síntesis de GnRH se realiza en el área preóptica del hipotálamo, ésta es secretada al torrente sanguíneo portal hipofisario en la eminencia media. La sangre del sistema porta lleva la GnRH a la adenohipófisis que contiene células gonadotropas donde la GnRH activa a su receptor. Aquí se 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). La FSH promueve (a nivel gonadal) el crecimiento folicular y la producción de estradiol y, como consecuencia de esto, se produce la liberación de LH a nivel hipofisario. 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 como el metabolismo, la sensibilidad a los esteroides gonadales, la melatonina, la nutrición, el desarrollo o 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).

Figura 3. Representación esquemática 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).



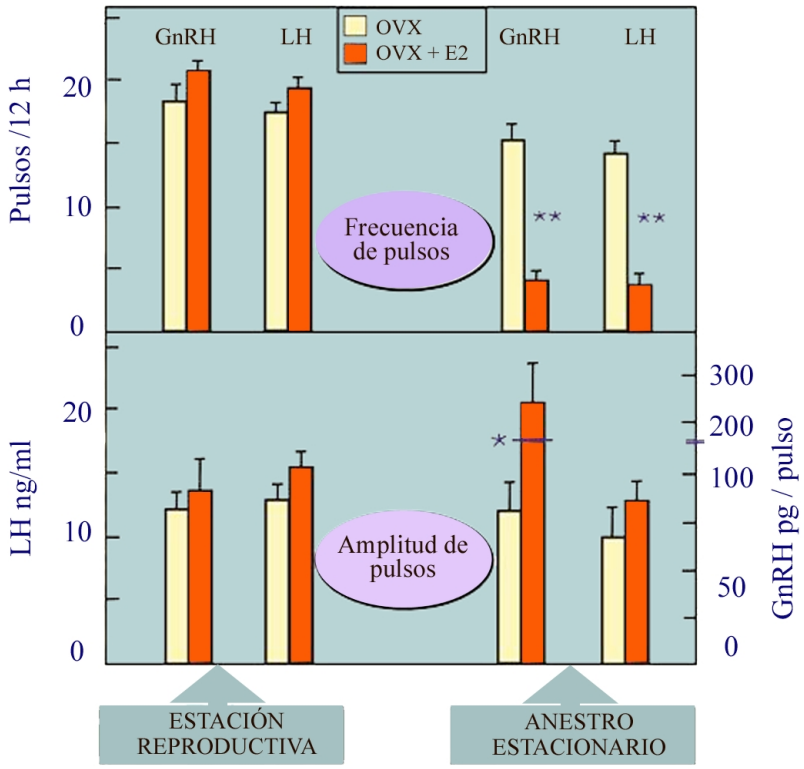
La secreción de GnRH es de tipo pulsátil, al igual que la de la LH (cuyo detalle será revisado posteriormente) y la frecuencia y amplitud de los pulsos varía a lo largo del ciclo sexual, determinando sus acontecimientos durante la estación reproductiva. Debido a que las concentraciones de GnRH sólo pueden ser medidas a nivel de la circulación portal hipotálamo-hipofisaria, siempre ha significado una dificultad explicar la naturaleza de la secreción de la GnRH (Barrell *et al*., 1992).

Los pulsos de GnRH, y por lo tanto de LH, se reducen considerablemente durante el periodo de anestro estacionario (Barrell *et al*., 1992). Esta disminución se debe a que las concentraciones de estradiol disminuyen a niveles basales (*feedback* negativo) (Moenter *et al*., 1990; Barrell *et al*., 1992; Karsch *et al*., 1993), lo que confirma 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). Para estudiar la variación de la sensibilidad del eje hipotálamo-hipófisis a la acción del estradiol se ha utilizado un modelo experimental de hembras ovariectomizadas e implantadas con estradiol (para lograr una concentración constante de esta hormona a lo largo del año) (Legan *et al*., 1977; Goodman *et al*., 1981; Zarazaga *et al*., 2005). Con este modelo se ha confirmado que durante la estación reproductiva 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).

Durante los últimos años se han realizado estudios en la especie ovina para determinar los mecanismos que intervienen en la transmisión del *feedback* negativo del estradiol (E_2) al sistema GnRH, así como la del funcionamiento de esa compleja red neural (Chemineau *et al*., 2010; Goodman *et al*., 2010). Arroyo (2011) señala que, durante el anestro, el *feedback* negativo del estradiol actúa específicamente en el núcleo dopaminérgico A15 (ubicado en el hipotálamo) (Figura 5), donde induce la síntesis y secreción de dopamina, la cual actúa en las neuronas productoras de GnRH e inhibe la frecuencia de síntesis y liberación de esta hormona (Thiéry *et al*., 1989; Gayrard *et al*., 1994; Havern *et al*., 1994; Thiéry *et al*., 1995; Gallegos-Sánchez *et al*., 1997; Viguié *et al*., 1997). Este hecho ocurre a pesar de que en el núcleo A15 no se han localizado receptores para el estradiol (Lehman y Karsch, 1993; Goubillon *et al*., 1999), por lo tanto, este mecanismo de acción del estradiol en este proceso no está del todo claro (Thiéry *et al*., 1995). Recientemente, Bogusz *et al*. (2008) determinaron que el ácido gamma-aminobutírico (GABA), neurotransmisor inhibitorio cerebral, inhibe la secreción de dopamina. Así, identificaron procesos neuronales GABA aferentes al núcleo A15, provenientes del área preóptica, y se demostró que, durante el anestro estacional, el estradiol suprime la liberación de GABA; este efecto inhibitorio ocurre en el núcleo A15, específicamente en los procesos neuronales mencionados. La supresión

en la liberación de GABA activa las neuronas dopaminérginas e incrementa la síntesis y secreción de dopamina, la cual ejerce su efecto biológico en las neuronas GnRH y reduce la frecuencia de pulsos de esta hormona y por lo tanto de LH (Figura 4).

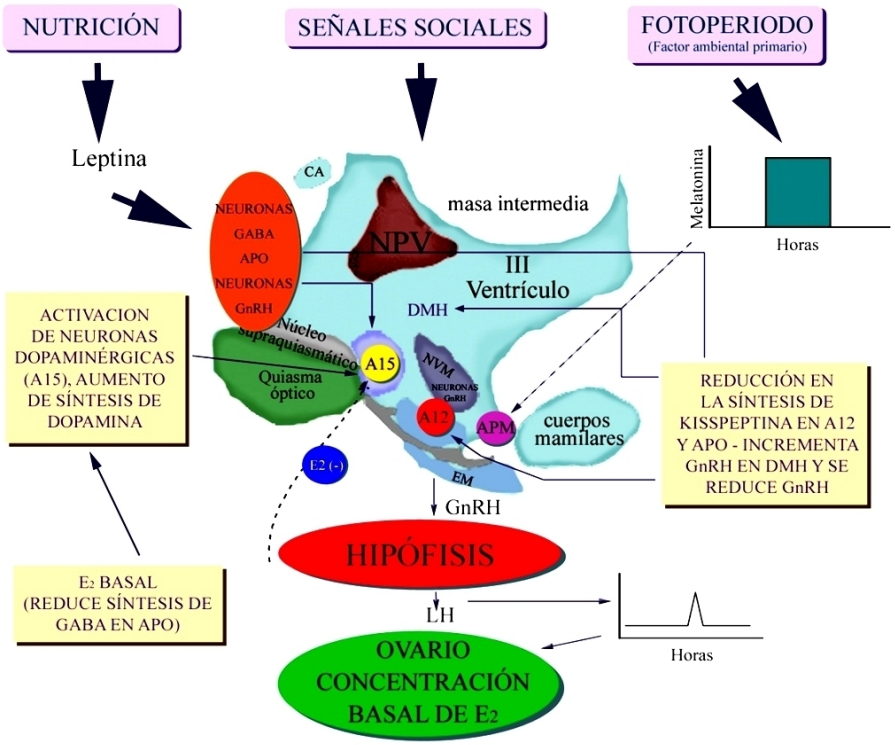
Figura 4. Frecuencia de pulsos de GnRH y LH en ovejas ovariectomizadas (OVX) u ovariectomizadas e implantadas con estradiol (OVX + E_2) durante la estación sexual y el anestro estacionario (Karsch *et al*., 1993).



También, recientemente, se ha descubierto en ovinos otro péptido involucrado en la reproducción, la kisspeptina (Smith *et al*., 2007). Este neuropéptido participa de manera determinante en la activación del eje reproductivo y es fundamental para el inicio de la pubertad (Meza-Herrera *et al*., 2010; Hameed *et al*., 2011). La kisspeptina estimula la secreción de gonadotropinas en roedores y ovejas con un efecto directo en las neuronas GnRH. En ovinos, las neuronas kisspeptina se localizan en el núcleo arcuato (ARC; también conocido como núcleo A12) (Figura 5) y en el área preóptica

(Pompolo *et al*., 2006; Smith *et al*., 2007) y parecen ser determinantes en que se produzca el pico preovulatorio de LH (Estrada *et al*., 2006; Clarckson *et al*., 2008).

Figura 5. Control neuroendocrino del anestro estacional en pequeños rumiantes. (Arroyo, 2011).



1.2.2.2. CONTROL HIPOFISARIO

La hipófisis es una glándula endocrina que segrega hormonas trópicas que regulan la función de otras glándulas endocrinas. Se aloja en un espacio óseo llamado "silla turca" del hueso esfenoides.

Se pueden distinguir en ella dos partes importantes:

- La adenohipófisis (lóbulo anterior), donde pueden identificarse tres partes: *pars anterior* (*pars distalis*), *pars intermedia* y *pars tuberalis*. Las células gonadotropas se encuentran en su estructura y producen la FSH y la LH, ambas moduladas por la actividad de la GnRH (Malven, 1993) (Figura 2).

También, en la *pars anterior* se encuentran células lactotropas, que son las encargadas de la síntesis y liberación de la prolactina (Stirland *et al*., 2001; Romanowicz *et al*., 2004).

- La neurohipófisis (lóbulo posterior), donde se identifican dos partes: la *pars eminens* y la *pars nervosa*, que 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.

Finalmente, una tercera porción de la hipófisis es el tallo hipofisario, que está ubicado entre la *pars eminens* y la *pars nervosa*, y rodeado por la misma *pars tuberalis* de la adenohipófisis. De hecho, el hipotálamo y la hipófisis forman un complejo fisiológico encargado de la síntesis y secreción de hormonas peptídicas, que contribuye al control de diversas funciones fisiológicas como el desarrollo corporal, el control del ciclo estral, el adaptarse a los constantes cambios que se presentan durante el día, la secreción láctea, excreción renal y otras muchas actividades (Malven, 1993).

- **HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE**

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. Está formada por dos subunidades: la subunidad α, que es compartida con la LH, la gonadotropina coriónica humana (hCG) y por la hormona estimulante de la glándula tiroides; y la subunidad β. La FSH es producida por las células gonadotropas de la hipófisis anterior y su síntesis y secreción es regulada por factores hipofisarios, gonadales y neuronales (Padmanabhan *et al*., 2002).

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). En cuanto a los perfiles plasmáticos de FSH, parece ser que su liberación no se produce en forma de pulsos, pero su modo de secreción a lo largo del ciclo estral es muy parecido al de la LH. Durante la fase folicular del ciclo se describen

dos picos de FSH, el primero coincidiría con la descarga preovulatoria de LH y el segundo simultáneo con la ovulación (L'Hermite *et al*., 1972; Salamonsen *et al*., 1973). Parece ser que la segunda descarga de FSH está relacionada con el número de folículos que madurarán en el próximo ciclo (Cahill, 1979). Tras la ovulación desaparecen los folículos maduros (Medhamurthy *et al*., 1987), por lo que hay una interrupción temporal de FSH al descender notablemente el nivel de estradiol que producían estos folículos.

Martín *et al*. (1988) demostraron la existencia de un control ovárico (inhibina) sobre la FSH, control no ejercido sobre la LH. Así, se observó que la secreción de FSH en anestro y en fase folicular del ciclo está controlada en principio por la acción sinérgica del estradiol y la inhibina de los folículos ováricos dominantes sobre la hipófisis, mientras que la secreción de la LH se inhibe durante el anestro sólo por el estradiol a través de un efecto sobre los pulsos de la GnRH hipotalámica.

- **HORMONA LUTEINIZANTE**

Es una glucoproteína con un peso molecular aproximado de 30.000 Da y con una vida media de 30 minutos. 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). Para que la ovulación se produzca, la frecuencia de pulsos de LH debe ser lo suficientemente alta como para que genere un incremento sostenido en los niveles de LH necesarios para estimular la secreción de estradiol que provoque el pico preovulatorio de LH y la ovulación. La LH se libera de forma pulsátil durante la fase luteal del ciclo, con una baja frecuencia (1 pulso cada 3-12 horas) (Haresign *et al*., 1983). Esta baja frecuencia de liberación pulsátil se debe al efecto inhibitorio de la progesterona secretada por el cuerpo lúteo en sinergia con los bajos niveles de estradiol circulantes (Goodman *et al*., 1981). Entre pulsos, la LH disminuye marcadamente, llegando casi al final de la fase luteal a niveles mínimos, coincidiendo con el máximo de progesterona (Hauger *et al*., 1977). Así, la baja frecuencia de pulsos de LH no proporciona el suficiente apoyo como

para provocar los últimos estadios de desarrollo folicular e incrementar la secreción de estradiol. Cuando el cuerpo lúteo regresa, la frecuencia de pulsos de LH se incrementa gradualmente hasta llegar a 1 pulso cada 1-2 horas (Baird *et al*., 1976, Hauger *et al*., 1977), lo que provoca un gran apoyo hormonal para el desarrollo de los folículos ováricos y un incremento en la secreción de estradiol necesaria para la aparición del celo y el pico preovulatorio de LH (Goodman *et al*., 1981).

Durante el anestro estacionario, las concentraciones plasmáticas de progesterona se encuentran en niveles basales debido a la ausencia de pico preovulatorio de gonadotropinas y por tanto de ovulación, por lo que, los pulsos de LH tienen una baja frecuencia (1 cada 8-12 horas) (Karsch *et al*., 1984). Así, los niveles de LH durante el anestro son inferiores a los encontrados durante la fase luteal del ciclo en la estación sexual (Scaramuzzi, 1975; Scaramuzzi y Baird, 1977).

- **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, así participa en todos los periodos de desarrollo de la glándula mamaria, incluyendo su crecimiento, inducción de la lactogénesis y el mantenimiento de la lactación y además en la síntesis de progesterona por el cuerpo lúteo (Djiane y Kelly, 1993). El tiempo de permanencia en sangre es de aproximadamente 21 minutos (Gow *et al*., 1983).

La secreción de la 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). Igualmente, en el Ibex ibérico (*Capra pyrenaica hispanica*), se ha observado que las concentraciones plasmáticas de prolactina son elevadas durante los días largos y bajas durante los días cortos (Santiago-Moreno *et al*., 2003), con niveles basales en octubre, muy similares a los de la cabra doméstica (Prandi *et al*., 1988). Sin embargo, existen variaciones en el momento de iniciarse el incremento de las concentraciones de prolactina, que se produce en abril en

el Ibex ibérico, 3 meses más tarde que en la muflón (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). Además, la secreción de prolactina parece tener un ritmo endógeno (Gómez-Brunet *et al*., 2008), tanto en ovejas domésticas como salvajes, mostrando las ovejas domésticas una mayor sensibilidad a los días largos constantes que las salvajes.

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, las modificaciones de 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). Este hecho indicaría 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; Regisford y Katz, 1994).

La secreción de prolactina también se ha relacionado con los cambios de pelaje a lo largo del año, tanto en hámsteres (Duncan y Goldman, 1984) como en el muflón (Santiago-Moreno *et al*., 2004), presentándose la muda cuando las concentraciones son mayores, aunque en las especies domésticas parece no ejercer demasiada influencia. Igualmente, Santiago-Moreno *et al*. (2005), en el muflón europeo (*Ovis gmelini musimon*), encontraron que la prolactina podría ejercer un posible rol sobre los cambios de crecimiento del cuerno en animales adultos. También se ha relacionado las variaciones de prolactina con la temperatura. 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). Además, 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).

1.3. ACTIVIDAD REPRODUCTIVA DEL MACHO CABRÍO

1.3.1. ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA

En el caso de los machos cabríos también se observa variación estacional en el comportamiento sexual, la actividad hormonal, la calidad y producción seminal y el peso y volumen testicular (Schanbacher y Lunstra, 1976; Lincoln y Davidson, 1977; Ortavant *et al*., 1985). Cuando la duración del día comienza a reducirse se produce un aumento del tamaño testicular (Pelletier *et al*., 1988), del nivel de secreción de LH, FSH y testosterona (Lincoln y Peet, 1977; D'Occhio *et al*., 1984) y mejora la producción y la calidad y cantidad espermática (Colas y Guérin, 1981). De acuerdo a lo descrito por Delgadillo *et al*. (1999) en machos Criollos mexicanos, los valores mínimos en el peso testicular (90 g) y concentración plasmática de testosterona (0,1 ng/ml) son registrados en los meses de verano y los valores máximos en los meses de invierno (145 g y 10 ng/ml respectivamente). Igualmente, Fabre-Nys (2000) señala también que las fluctuaciones en el comportamiento sexual están relacionadas con las concentraciones de testosterona. Un incremento en la tasa de testosterona (de 3 a 20 ng/ml) es seguido, seis semanas después, por la expresión de comportamiento sexual (Rouger, 1974; Ahmad y Noakes, 1995). Respecto a la producción de semen y concentración espermática, Delgadillo *et al*. (1999), en machos Criollos mexicanos, indican que los valores mínimos de espermatozoides por eyaculado se obtienen en la época de fotoperiodo creciente (1,4 x 10^9 espermatozoides/eyaculado) y los máximos valores se alcanzan en fotoperiodo decreciente (2,8 x 10^9 espermatozoides/eyaculado). Roca *et al*. (1992) señalan que la calidad seminal, en la raza Murciano-Granadina, es mayor durante verano y otoño en el sur de España.

Respecto a posibles factores de variación o moduladores de la estacionalidad reproductiva de los machos cabríos se ha observado que la raza tiene una mayor influencia que los factores medioambientales en las concentraciones plasmáticas de testosterona (Todini *et al*., 2007). Igualmente, se ha observado que las variaciones de

actividad reproductiva y calidad seminal son independientes del nivel de nutrición. Así, trabajando con machos cabríos Criollos, en el norte de México, se ha observado que con una alimentación constante manifiestan su máximo periodo de actividad sexual entre los meses de mayo a diciembre (otoño e invierno) (Delgadillo *et al*., 1999). También, trabajando con machos de raza Payoya (Zarazaga *et al*., 2009), sometidos a diferentes niveles de alimentación, se ha demostrado que presentan una marcada estacionalidad reproductiva a lo largo del año que no puede ser modificada por una mejora en el nivel de alimentación, pero ésta permite que los machos se encuentren en mejores condiciones reproductivas en primavera, cuando habitualmente los machos son utilizados para realizar el efecto macho en las explotaciones caprinas Mediterráneas.

Otros estudios, realizados por Walkden-Brown *et al*. (1994b), indican que los caprinos en zonas templadas expresan una importante variación en su actividad sexual dependiendo de la época del año. En machos de raza Alpina y Saanen, el peso testicular, el cual está relacionado con la actividad espermatogénica, muestra valores mínimos entre enero y abril (invierno y primavera) y valores máximos entre septiembre y diciembre (otoño) (Delgadillo *et al*., 1991). También, un fuerte detrimento de la motilidad espermática individual y fecundidad espermática se observa ente abril y agosto (primavera-verano). Corteel (1977) describe que el volumen de eyaculado, en la raza Alpina, es mayor durante el invierno y éste comienza a disminuir entre primavera y verano.

Con relación al comportamiento sexual, Rouger (1974) señala que las conductas relacionadas con el comportamiento, como olisqueos, montas, intentos de monta, etc., también presentan importantes variaciones de acuerdo a la época del año. La frecuencia de montas es más elevada entre otoño e invierno que en el resto del año. En general, todos los parámetros antes señalados son elevados a fin del verano, comienzo del otoño y disminuyen al final del invierno y comienzo de la primavera (Lincoln y Short, 1980; Haynes y Schanbacher, 1983; Pelletier y Almeida, 1987).

Además, pese a que la espermatogénesis en el macho no se detiene, sí se disminuye considerablemente en la época de anestro estacionario, observándose variaciones en la sensibilidad de los machos caprinos frente al fotoperiodo en relación a los ovinos. De esta manera, la actividad espermatogénica disminuye notablemente en ovinos a fines del invierno y en primavera, mientras que en caprinos esta disminución ocurre en primavera e inicios del verano (Chemineau *et al*., 1992a).

Aún cuando los moruecos y machos cabríos podrían ser entrenados para montar a hembras no éstricas, lo más normal es que sólo respondan a hembras éstricas. El principal estímulo sexual es el olfativo, hasta el punto de que los machos son capaces de detectar al sexo opuesto mediante los mensajeros químicos, transportados en el aire, que reciben el nombre de feromonas. Estos mensajeros pueden convertirse en respuestas fisiológicas o de comportamiento (Delgadillo *et al*., 2008). Una vez estimulado por una hembra éstrica, el macho comienza el llamado cortejo nupcial, que, en ocasiones, puede incluir hasta comportamiento agresivo hacia la hembra, golpeándola, frotándola (particularmente la vulva), balando y moviendo el labio superior. Durante este periodo de excitación sexual es muy posible que se escape algo de líquido a través del proceso uretral del pene, que es una secreción de las glándulas bulbo-uretrales que sirve para eliminar cualquier resto de orina que permaneciera en la uretra. En el caso de machos ansiosos es muy aconsejable el sujetarles durante un corto tiempo para permitir que ocurra tal secreción (Delgadillo *et al*., 2008). Una vez sujetada la hembra, el macho la montará rápidamente y, después de uno o dos empujones, se producirá la intromisión del pene en la vagina. La eyaculación ocurre espontáneamente y dura sólo unos momentos, caracterizándose por un violento empuje de su pelvis. Concluida la eyaculación el macho desmonta inmediatamente.

Antes de la eyaculación, los espermatozoides se transportan desde la cola del epidídimo hasta la ampolla de los conductos deferentes, mediante las secreciones de estos conductos y las contracciones de sus paredes. Durante la eyaculación los espermatozoides entran en la uretra, donde se mezclan con las secreciones de las glándulas accesorias. Las poderosas contracciones de la uretra, durante la eyaculación, expelen el semen al exterior.

1.3.2. MODELO HORMONAL DEL MACHO

1.3.2.1. HORMONA LUTEINIZANTE Y HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE

A nivel testicular, en pequeños rumiantes, la FSH controla la actividad de las células de Sertoli, regulando la espermatogénesis y la secreción de inhibina (Delgadillo *et al*., 1995). La inhibina se caracteriza por disminuir la secreción de FSH, por acción

directa sobre la hipófisis, actuando en sinergia con la testosterona (Tilbrook *et al*., 1993, 1999). La LH, por su parte, actúa sobre las células de Leydig, regulando la producción de testosterona (Lincoln *et al*., 1990). El incremento de la frecuencia de los pulsos de LH durante el otoño, como consecuencia de la disminución de la sensibilidad al efecto de retroalimentación negativa de la testosterona (Jackson *et al*., 1991), es seguida por un incremento en la secreción de testosterona (Rhim *et al*., 1993), que permitirá un adecuado desarrollo de las glándulas accesorias (Santiago-Moreno *et al*., 2005) y un medio óptimo para el desarrollo de una espermatogénesis normal.

La reactivación gonadal lleva consigo también cambios morfológicos en los testículos. Cuando se activa el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal se produce un aumento del tamaño testicular (Lincoln y Short, 1980; Langford *et al*., 1987) durante el periodo verano-otoño, mientras que en primavera el tamaño testicular es mínimo. Este ciclo testicular es la expresión de los cambios andrógeno-dependientes originados en los túbulos seminíferos, induciendo cambios tanto en su diámetro (Hochereau-de-Reviers *et al*., 1985; Mortimer y Lincoln, 1982; Gastel *et al*., 1995) como en su longitud (Hochereau-de-Reviers *et al*., 1976). A nivel celular se constata un aumento del volumen de las células de Leydig, un incremento del tamaño del núcleo de las células de Sertoli (Hochereau-de-Reviers *et al*., 1976, 1985) y una hipertrofia de la membrana basal (Mortimer y Lincoln, 1982; Gastel *et al*., 1995), todo ello correlacionado con el aumento de la actividad de las células mencionadas, inducida por las hormonas gonadotropas (Mortimer y Lincoln, 1982). En este sentido, se ha apuntado una alta correlación entre los niveles de FSH y el tamaño testicular (Martin *et al*., 1999). Por otro lado, la alta correlación encontrada entre el tamaño testicular (principalmente circunferencia escrotal y diámetro testicular) (Almeida y Lincoln, 1982; Lincoln, 1998; Langford *et al*., 1999) y la producción seminal y la fertilidad, hacen de estos parámetros un buen indicador de la espermatogénesis (Notter *et al*., 1981; Fowler, 1984).

1.3.2.2. TESTOSTERONA

La secreción de testosterona se realiza de forma pulsátil al estar controlada por la secreción de LH que también es pulsátil (Lincoln, 1988). Cada pulso de LH va seguido, en la mayoría de los casos, de un pulso de testosterona en un tiempo que varía, en

pequeños rumiantes, de 20 minutos a 1 hora (Foster, 1978; Muduuli *et al*., 1979; Howland *et al*., 1985). En el patrón de secreción de testosterona podemos distinguir la línea o valor basal y los pulsos o picos. Éstos, para Muduuli *et al*. (1979) se definen como aumentos que excedan el valor medio del patrón en una desviación estándar y vayan seguidos por dos o más valores en disminución. En cambio, Sanford *et al*. (1984) los describe como aumentos que excedan el nivel de 1 ng/ml, seguidos por dos o más valores en disminución. Por tanto, el patrón de secreción viene definido por el nivel basal, la amplitud de pulsos y la frecuencia de los mismos, así como el nivel medio constituido por la media de todos los valores del patrón.

Para algunos autores existe una cierta sincronización en el tiempo de secreción de testosterona a lo largo del día. Lincoln *et al*. (1977) observaron, en moruecos, un ritmo circadiano con una liberación bifásica de LH, FSH y testosterona, con un pico máximo entre las 17:00 y las 20:00 horas y otro menor entre las 5:00 y las 8:00 horas, registrándose por tanto los valores máximos durante la noche. Lincoln *et al*. (1977) sugieren que, si las descargas son estimuladas durante la oscuridad, existe un mecanismo de control del ciclo reproductivo, disminuyendo la liberación de gonadotropinas durante los días largos y promoviéndola durante los días cortos. Por el contrario, Sanford *et al*. (1974), en moruecos, registraron una mayor frecuencia de picos de LH y testosterona durante las horas del día y Muduuli *et al*. (1979), en cabras Pigmea, observaron que la aparición de los picos de LH y testosterona variaba según los meses en relación con el comienzo de la oscuridad. Ortavant *et al*. (1982) demostraron estadísticamente que la liberación de testosterona en morueco varió de forma no aleatoria en función del momento del día, encontrando un mínimo de picos inmediatamente después del amanecer, y un máximo entre 4 y 5 horas después del amanecer. Estos resultados sugirieron que el amanecer podría actuar como sincronizador de la actividad gonadotropa, si bien los autores no aseguran que el patrón hormonal sea similar en otras latitudes o en otras razas.

En machos cabríos de raza Murciano-Granadina, Zubieta (1990) observó un incremento en los niveles de secreción de testosterona a partir de los 9 meses de edad (enero) hasta los 14 meses (junio), sugiriendo que estos niveles están más ligados a una influencia estacional que al propio desarrollo de los animales. Pérez y Mateos (1995), trabajando con las razas Verata y Malagueña, determinaron que ambas razas mostraron un aumento en las concentraciones plasmáticas de testosterona durante el fotoperiodo

decreciente. Los patrones de secreción mostraron incrementos en los valores medios, los niveles basales, la frecuencia y altura de los picos de secreción durante el mismo fotoperiodo. También se observó que los niveles de testosterona fueron más elevados en la raza Verata que en la Malagueña. Lo anterior demuestra la marcada estacionalidad de ambas razas, sobre todo en la Verata. Por último, Walkden-Brown y Restall (1992) detectaron, en machos cabríos Cashmere australianos, niveles más altos de testosterona en otoño que durante el resto del año.

2. PAPEL DEL FOTOPERIODO Y MELATONINA

2.1. INTRODUCCIÓN

El fotoperiodo podría definirse como la variación estacional de la duración del número diario de horas de luz (Chemineau *et al*., 1992b; Malpaux, 2006; Chemineau *et al*., 2010). La importancia del fotoperiodo en el control de la estacionalidad de la reproducción está marcada por dos factores. El primero es que de todas las variables medioambientales el fotoperiodo es el más estable año a año y por lo tanto es un buen predictor del comportamiento reproductivo que tendrán los animales como respuesta a esta variación del fotoperiodo (Chemineau *et al*., 1992b). En segundo lugar, la estacionalidad está marcada, por regla general, por la latitud, a mayor latitud (>40º) mayor estacionalidad y en latitudes más bajas hay razas que se mantienen sexualmente activas durante todo el año (Pelletier y Almeida, 1987).

Los caprinos y ovinos son llamados especies de días cortos, debido a que el periodo de actividad reproductiva ocurre en otoño-invierno, cuando el fotoperiodo es decreciente, esta información de los días cortos (8 horas de luz diarias) se transfiere en forma de señales que estimulan (Chemineau *et al*., 1992b). Los días largos cumplen dos roles, inhibir la actividad sexual y hacer a los animales sensibles a los días cortos (Chemineau *et al*., 1992b).

También se ha demostrado la existencia de un ritmo endógeno de actividad neuroendocrina que aparece cuando los animales son mantenidos experimentalmente en fotoperiodo constante; así, cuando ovejas Suffolk, ovariectomizadas y portadoras de un implante de estradiol, han sido mantenidas en días cortos constantes durante más de 3 años aparece un ritmo circanual de reproducción pero desincronizado (Karsch *et al*., 1989) y el mismo fenómeno también ocurre en cabras (Aguilar *et al*., 2001). De todo ello se desprende que el papel del fotoperiodo es sincronizar y ajustar el ciclo reproductivo a los 365 días de duración del año.

Las variaciones en la duración del día inducen cambios en la secreción de melatonina, que es el intermediario que transforma la señal fotoperiódica en una señal hormonal, provocando cambios en la secreción de las gonadotropinas, responsables de la actividad sexual de los pequeños rumiantes (Goodman *et al*., 1981). La información fotoperiódica es traducida por la glándula pineal por medio de un ritmo circadiano de

secreción de melatonina (Bittman *et al*., 1983). Esta hormona es secretada únicamente durante la noche, y la duración de la secreción coincide exactamente con el periodo de oscuridad, tanto en caprino (Delgadillo y Chemineau, 1992; Mori *et al*., 1987) como en ovino (Karsch *et al*., 1985; Malpaux *et al*., 1987; 1988;). Por lo tanto, la duración de la secreción de la melatonina varía entre los días largos y cortos, lo que constituye, como se ha indicado anteriormente, una señal neuroendocrina que regula la actividad del eje hipotálamo-hipofisario.

Además del ritmo circadiano, se han demostrado la existencia de otros ritmos endógenos, conocidos como plasticidad neuronal y los llamados genes reloj (*clock genes*). El concepto de plasticidad neuronal se refiere a las adaptaciones circadianas y estacionales que experimenta el sistema nervioso porque las neuronas no son estáticas, 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. Finalmente, 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. MECANISMO DE ACCIÓN DEL FOTOPERIODO

2.2.1. FOTOPERIODO Y REPRODUCCIÓN

Ya se ha mencionado que las razas caprinas originarias de latitudes altas y medias (superiores a 40º), donde se producen marcadas oscilaciones de la duración del día a lo largo del año, muestran variaciones estacionales de su actividad reproductiva en ambos sexos (Falagan *et al*., 1989; Delgadillo *et al*., 1991; Delgadillo y Chemineau, 1992; Chemineau *et al*., 1992b; Zarazaga *et al*., 2005, 2009; Duarte *et al*., 2008). De este modo, en la cabra se observa una alternancia anual entre la época de actividad reproductiva, caracterizada por la sucesión a intervalos regulares de comportamiento de

celo y ovulación si no ha habido gestación, y el anestro estacionario, caracterizado por el cese de esta actividad sexual.

El fotoperiodo es el principal factor responsable de la estacionalidad sexual en ganado caprino. En este sentido, se han utilizado distintos modelos experimentales para definir dicho papel manipulando la longitud del día, si bien se podrían agrupar en tres:

- Inversión artificial del fotoperiodo natural anual, produciendo un cambio de 6 meses en el momento en que se produce la estación sexual en relación al año natural (Yeates, 1949; Thwaites, 1965).

- Ritmos fotoperiódicos semestrales, reproduciendo cada 6 meses las variaciones anuales del fotoperiodo, de manera que las hembras presentan dos estaciones de reproducción al año (Mauleón y Rougeot, 1962).

- Alternancia cada 3 meses de días largos y cortos, induciendo periodos de actividad e inactividad sexual, de forma que los primeros se producen tras el inicio de los días cortos y los segundos, tras el paso a días largos. En concreto, Chemineau *et al*. (1988) señalan que el intervalo entre el cambio de días largos a cortos y el inicio de la actividad ovulatoria se produce a los 74-85 días de iniciados los días cortos.

Por lo tanto, se ha observado que la actividad reproductiva se puede modular alternando periodos de días largos (16 horas de luz y 8 de oscuridad, 16L:8O) o días cortos (8L:16O) constantes, de manera que la exposición a días cortos es seguida por un inicio de la actividad ovulatoria, mientras que los días largos provocan una inhibición de la misma (Karsch *et al*., 1984; D'Occhio *et al*., 1984; Zarazaga *et al*., 2011a, 2011b).

2.2.2. FOTORREFRACTARIEDAD

La regulación del ciclo reproductivo a lo largo del año es más complejo que el resultado de los efectos estimulatorios de los días cortos o inhibitorios de los días largos, de manera que los animales se hacen refractarios al efecto estimulatorio o inhibitorio de los mismos. Así, cabras sometidas a fotoperiodo de días largos durante 7 meses reactivaron su actividad ovulatoria de manera cíclica, y la refractariedad a los días cortos ocurrió con más de 300 días de exposición (Mori *et al*., 1984). Sin embargo, Chemineau *et al*. (1992b) describieron que cabras sometidas a días cortos mostraron

refractariedad a los mismos a los 120 días de exposición, siendo la respuesta igual al ser expuestos, los mismos animales, permanentemente a días largos.

La fotorrefractariedad puede ayudar a explicar el momento en que se inicia la actividad sexual. Así, la actividad sexual comienza después del solsticio de verano (momento en que comienza a disminuir la duración de horas de luz), no como consecuencia del efecto de la disminución de la duración del día, pues se ha observado que si las hembras son alojadas en días largos constantemente desde el solsticio de verano, o si son expuestas a un incremento continuo de la duración del día desde el equinoccio de primavera, la activación estacional de la actividad ovulatoria o de la secreción de LH comienza a la vez que en animales sometidos a fotoperiodo natural (Worthy y Haresign, 1983; Robinson y Karsch, 1984; Malpaux *et al*., 1989; Gómez-Brunet *et al*., 2010; Delgadillo *et al*., 2011). Lo mismo sucede a la hora de estudiar el final de la época de actividad sexual; tanto ovejas como cabras mantenidas desde el solsticio de invierno en días cortos, o aquellas a las que se les provocaba una disminución en la duración del día desde el equinoccio de otoño, cesaron su actividad sexual al mismo tiempo que hembras mantenidas en fotoperiodo natural (Robinson *et al*., 1985; Worthy *et al*., 1985; Malpaux *et al*., 1988; Gómez-Brunet *et al*., 2010; Delgadillo *et al*., 2011). Este comportamiento también se manifiesta en razas ovinas de reducida estacionalidad originarias de zonas subtropicales como la Barbados Barriga Negra (Hernández, 2007).

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 (>52ºN), 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 (39-40ºN), 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. Incluso, dichos 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 a la oveja 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 genotípicas 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).

Por otro lado, la experiencia fotoperiódica previa condiciona la respuesta a los cambios en la duración del día. Así, 12 horas de luz diarias pueden ser interpretadas como día corto si los animales estaban recibiendo previamente 16 horas de luz, pero serán interpretadas como días largos si sólo recibían 8 horas (Hafez, 1952; Robinson y Karsch, 1984; Chemineau *et al.*, 1992b).

2.2.3. RITMO ENDÓGENO DE REPRODUCCIÓN

Esta refractariedad sería el punto fundamental que explicaría el ritmo endógeno de la reproducción, siendo el papel del fotoperiodo el de sincronizarlo a lo largo del año y que la reproducción tenga lugar en el momento más favorable. Así, la mayoría de los mamíferos poseen un ritmo de reproducción que se manifiesta aun en ausencia total de

variaciones fotoperiódicas, teniendo un duración aproximada de 10-11 meses (Thimonier, 1989). Otros autores han indicado que habría momentos críticos a lo largo del año que intervienen en la regulación del ritmo endógeno de la reproducción, siendo los días crecientes uno de ellos, especialmente en el momento de inicio de la época de actividad sexual (final del verano), de manera que los días cortos actuarían principalmente para mantener la actividad reproductiva ya iniciada (Malpaux *et al*., 1989; Malpaux y Karsch, 1990; Wayne *et al*., 1990; Woodfill *et al*., 1991). Los estados refractarios parecen ser consecuencia de este llamado ritmo endógeno, de manera que en ausencia de variaciones fotoperiódicas, tanto en cabras como en ovejas, ya sea pinealectomizadas o sometidas a días cortos o largos constantes durante varios años, 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.

Una aportación muy importante al papel del fotoperiodo sobre la estacionalidad reproductiva es la de Malpaux *et al*. (1988), que sugieren que la transición entre la estación sexual y el anestro estacionario no está específicamente controlada por cambios en la longitud del día, y señalan que la oveja posee un ritmo endógeno de reproducción, con lo que el papel del fotoperiodo es circunscribir ese ritmo a 365 días. En conjunto, estos autores demostraron que el aumento de la duración del día tras el solsticio de invierno puede actuar sobre el momento en que finaliza la actividad sexual, pero que la razón principal que determina la transición al anestro estacionario es un "apagado" de la actividad reproductiva como resultado de un ritmo endógeno subyacente de reproducción.

Más tarde, estos mismos autores señalaron que, también la transición del anestro a la estación sexual está generada endógenamente, jugando el fotoperiodo un papel fundamental, determinando el momento en que ésta se produce (Malpaux *et al*., 1989). Finalmente, y trabajando con ovejas pinealectomizadas, este mismo equipo desarrolló más su teoría en base a que las ovejas sin glándula pineal responden en función de la

historia fotoperiódica previa y el ciclo fotoperiódico posterior a la citada pinealectomía (Wayne *et al*., 1990). En conjunto, la descripción del ritmo circadiano endógeno de reproducción y su regulación por el fotoperiodo se expone a continuación: (ver Figura 6).

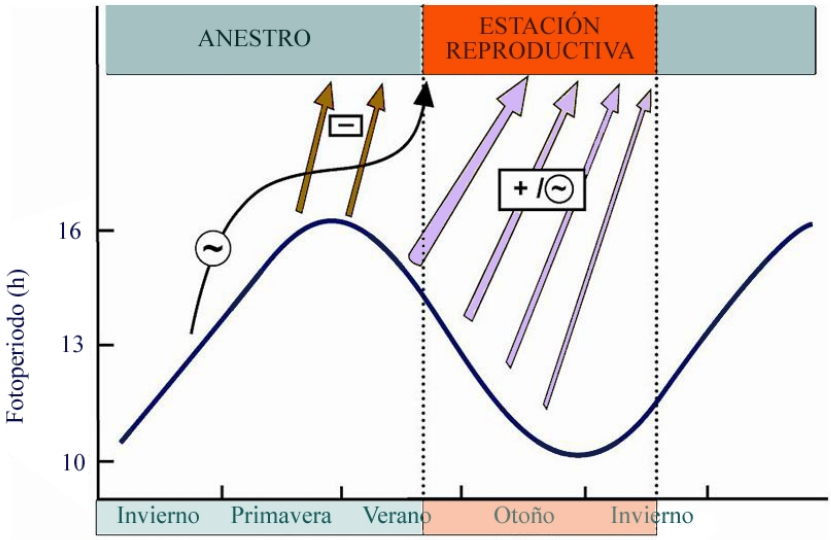
- El aumento de la longitud del día desde el solsticio de invierno al de verano es fundamental para el inicio de la actividad sexual, de manera que la duración de la exposición a este fotoperiodo creciente determina el momento de inicio de la estación reproductiva (sincronización, ~). Además, los días largos también parecen suprimir activamente la función reproductiva entorno 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 (sincronización, ~).

- Por último, el fotoperiodo decreciente, desde el equinoccio de otoño al solsticio de invierno, parece jugar un papel importante en la ruptura de la fotorrefractariedad a los días largos, asegurando que la oveja responda al subsiguiente incremento en la longitud del día que sincronizará la estación sexual del año siguiente (+).

Incidiendo en 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.

Figura 6. 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 (+). (Malpaux *et al*., 1989*)*.



2.2.4. INTERPRETACIÓN DE LA SEÑAL FOTOPERIÓDICA

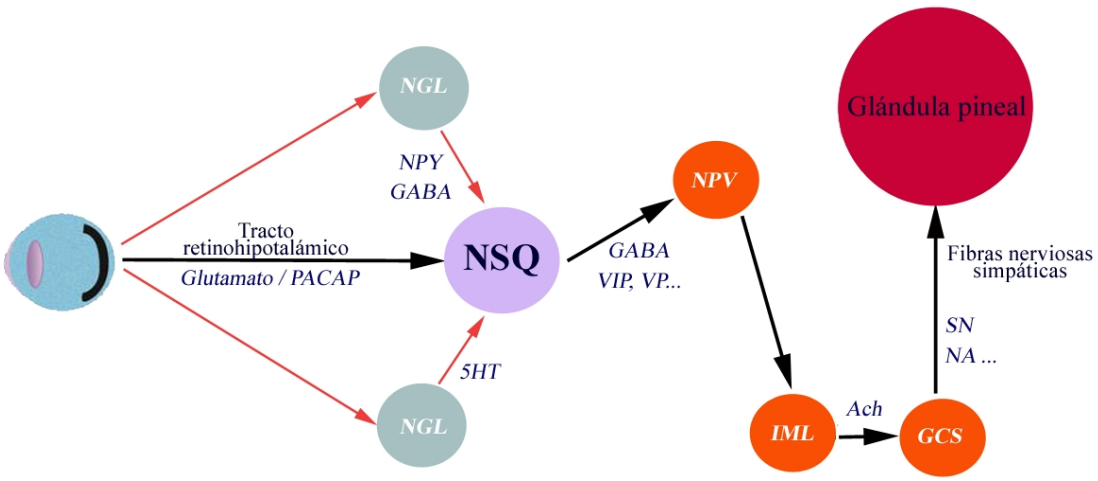
2.2.4.1. VÍA ANATÓMICA

La información fotoperiódica es captada por la retina y transmitida a los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo desde donde llega hasta los ganglios cervicales superiores pasando por los núcleos paraventriculares, y por último, a la glándula pineal (Tamarkin *et al*., 1985). Esta glándula tiene como misión la síntesis y secreción de melatonina (Figura 7). Esta hormona, única y exclusivamente, se sintetiza durante la noche ya que la información luminosa captada por la retina es inhibidora de su síntesis. De este modo, la duración de la secreción de melatonina es larga durante los días cortos y corta durante los días largos (Delgadillo *et al*., 2001). La percepción de esta duración permite a los animales controlar su actividad reproductiva (Bittman *et al*., 1983a). La melatonina traduce la información fotoperiódica, de tal forma que la pinealectomía del animal inhibe los efectos del fotoperiodo sobre la reproducción. Sobre este modelo, la

melatonina administrada por vía periférica, simulando un perfil de secreción determinado, restablece los efectos estimulantes de los días cortos o los efectos inhibidores de los días largos sobre la secreción de LH (Malpaux, 2001). Este control de la secreción de LH se debe a que la melatonina es liberada, además de a la circulación general, al líquido cerebroespinal (Tricoire *et al*., 2002) y se une a receptores que se encuentran en el hipotálamo medio basal (Malpaux *et al*., 1997). A través de estudios farmacológicos y de hibridación *in situ*, estos sitios de unión han sido identificados, como es el caso del receptor oMT1 (Mailliet *et al*., 2004; Migaud *et al*., 2005). Si bien existen también otros receptores de unión de la melatonina cuyo papel está todavía por demostrar (Legros *et al*., 2007). La acción de la melatonina sobre la secreción de GnRH es indirecta interviniendo un gran número de neuromediadores. La utilización de implantes de melatonina modifica la síntesis de dopamina en la eminencia media (Viguie *et al*., 1995).

Figura 7. Representación esquemática simplificada de las vías nerviosas entre el ojo y la glándula pineal (adaptado de Simmonneaux y Ribelayga, 2003).

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 vasonconstrictor intestinal; VP: vasopresina.



2.3. LA MELATONINA Y LA REGULACIÓN DE LA REPRODUCCIÓN

2.3.1. MELATONINA: DESCUBRIMIENTO Y PROPIEDADES

En la mayoría de los mamíferos, la glándula pineal principalmente, pero no exclusivamente, produce la secreción de melatonina a la circulación durante las 24 horas del día, manteniendo concentraciones basales durante las horas de luz y elevadas por la noche y si bien sintetiza una gran variedad de hormonas e indolaminas, la melatonina es la que ha sido más ampliamente estudiada (Sugden, 1989).

La primera discusión acerca de la función de la glándula pineal fue realizada probablemente por Galeno (130-200 años d.C.), quien, en contra de Aristóteles, localizaba el lugar del alma en el cerebro y no en el corazón. Aunque Galeno no fue el descubridor de la glándula pineal fue el primero que escribió acerca de su localización, estructura, forma y función y la consideró como una glándula que contenía numerosos vasos sanguíneos, a la vez que era rodeada y apoyada por un tejido compacto (Arendt, 1995). Fue a finales del siglo XVII cuando los anatomistas comenzaron a dudar acerca de la afirmación de Descartes, que alojaba el alma en la glándula pineal. Posteriormente, estudios comparativos y morfológicos la convirtieron en una glándula vestigial en el cerebro sin funciones aparentes y fue a final de los años cincuenta cuando empezaron los estudios químicos y de biosíntesis de la glándula pineal y de la melatonina (Collin *et al*., 1988).

La melatonina fue descubierta por Lerner *et al*. (1958). Es una indolamina, de color amarillo claro, con un punto de fusión que se sitúa alrededor de los 116-118ºC (Szmuszkovicz y Heinzelman, 1960). Es poco soluble en el agua, pero si se disuelve en etanol, lo que permite que atraviese las capas celulares por difusión pasiva (Pautler y Hall, 1987).

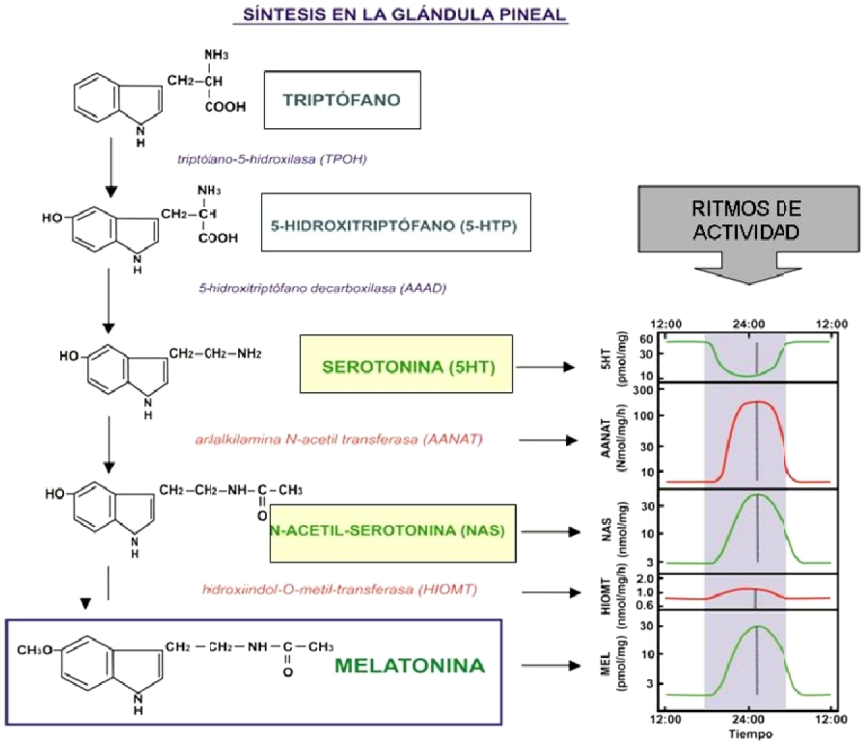
2.3.2. SÍNTESIS Y CATABOLISMO

2.3.2.1. BIOSÍNTESIS

Respecto a su síntesis, y contrariamente a lo que se creyó en un principio, la melatonina no sólo se sintetiza en la glándula pineal, sino también en otras estructuras, donde se encuentra el equipo enzimático suficiente para su síntesis, como la retina, el tracto gastrointestinal, la glándula lacrimal y los leucocitos de la sangre (Pang *et al*., 1993); no obstante, la síntesis a nivel de la glándula pineal es la más importante.

En la mayoría de los animales, la melatonina se secreta, única y exclusivamente, durante el periodo de oscuridad, ya que la luz inhibe su síntesis (Figura 8). El comienzo de oscuridad provoca un incremento en la síntesis de melatonina por parte de los pinealocitos de la glándula pineal, ya que éstos son estimulados por la secreción de noradrenalina, proveniente del ganglio cervical superior, que se une a los receptores α_1 y β de la membrana del pinealocito. La activación de los receptores α_1 y β desencadena una reacción intracelular que culmina con la estimulación de la expresión del ARNm para la síntesis de la enzima arilalkilamina N-acetil-transferasa (AANAT) encargada de la transformación de la serotonina en N-acetil-serotonina (NAS). Una vez sintetizada, ésta se transforma en melatonina por la acción de la enzima hidroxiindol-O-metil-transferasa (HIOMT). A su vez, la serotonina deriva del triptófano con el 5-hidroxitriptófano como intermediario. La conversión del triptófano a 5-hidroxitriptófano es catalizada por la triptófano-hidroxilasa (TH); finalmente, el paso a serotonina es catalizado por la 5-hidroxitriptófano-decarboxilasa. Aquí se produce el primer paso limitante en la síntesis de melatonina, ya que se puede estimular mediante la administración de hidroxitriptófano y no con la de triptófano (Sugden *et al*., 1985), lo que indica que la actividad TH puede llegar a saturarse. También se ha señalado que utilizando un inhibidor de la TH, la paraclorofenilalanina, se observa una ausencia total de variación en el ritmo diario de secreción de la melatonina (Chemineau *et al*., 1991). El segundo paso que limita la síntesis de melatonina, y que es el que finalmente regula el ritmo de secreción de la hormona, es la mayor actividad nocturna de la AANAT. Parece ser que la actividad de la HIOMT no sufre oscilaciones a lo largo del periodo luz/oscuridad, si bien podría ser la enzima que controle el nivel de producción de la melatonina (Coon *et al*., 1999).

Figura 8: E Vía de síntesis de la melatonina en la glándula pineal Adaptado de Kopin *et al*., 1961; Malpaux, 2001), así como el ritmo de actividad de la AANAT y de la HIOMT (en rojo), y variaciones en la tasa de serotonina (5-HT), de N-acetil-serotonina (NAS) y melatonina (MEL) (en azul) durante las horas de oscuridad (área sombreada) (Adaptado de Klein, 1979).



La producción de melatonina sigue un ritmo circadiano de secreción, con unas concentraciones elevadas por la noche y basales durante el día. Este mismo ritmo diario de secreción que se observa en la síntesis de melatonina se ha demostrado en las diferentes enzimas que participan en su síntesis. Así, la AANAT 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. Si bien en la oveja la actividad nocturna de la AANAT no parece clara, Coon *et al*. (1999) demostraron, tanto en animales sacrificados durante el día como durante la noche, 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. Este ritmo de secreción de la AANAT conlleva un ritmo inverso de la serotonina, con bajos niveles durante la noche y altos durante el día. Respecto a la NAS, durante la noche presenta unas concentraciones mayores en la circulación que los de la melatonina, tal como muestran estudios realizados en ratas (Chattoraj *et al*., 2009) y en humanos (Attanasio *et al*., 1986). Finalmente, la HIOMT parece regular a largo plazo la síntesis nocturna de melatonina (Simonneaux y Ribelayga, 2003), de manera que su actividad, en la oveja, parece que 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 8) (Coon *et al*., 1999). Sin embargo, Vivien-Roels *et al*. (1999), en ovejas, observaron que 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. 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.

La duración de la secreción de melatonina refleja la duración de la noche, proporcionando la información al organismo que va a permitir regular funciones fisiológicas no sólo reproductivas sino también otras como la muda (Lincoln *et al*., 1980), las oscilaciones del peso corporal (Plotka *et al*., 1982), etc. La secreción de melatonina se caracteriza por aumentar rápidamente en cuanto se apagan las luces en animales sometidos a fotoperiodo artificial, o poco después de que se produzca el ocaso en animales sometidos a fotoperiodo natural (Malpaux *et al*., 1988). De todos modos, el inicio de la secreción de melatonina, tras el comienzo del periodo de oscuridad, varía en función del fotoperiodo. Así, cuando los animales son sometidos a fotoperiodo de días largos (16L:8O) la secreción de melatonina comienza antes (a los 11 minutos) que cuando los animales son sometidos a días cortos (8L: 16O) (a los 20 minutos) (Ravault y Chesneau, 1999).

Por otro lado, también parece que la duración de las horas de oscuridad afecta al momento de finalización de la secreción de melatonina, ya que durante los días cortos, es decir, con noches más largas, las concentraciones de melatonina comienzan a

disminuir antes del final de la noche, mientras que en los días largos, disminuyen las concentraciones incluso después de que las luces se hayan encendido (Malpaux *et al*., 2002). Finalmente, se ha indicado, aunque los resultados son contradictorios, que este modelo también sufre una variación a lo largo del año, con unos bajos niveles durante el verano y mayores, pero posiblemente de menor amplitud, en el invierno (Arendt *et al*., 1981). Por lo tanto, la información fotoperiódica también refleja los cambios a lo largo del año, y es interpretada por el animal mediante la señal de la melatonina.

El ritmo circadiano de secreción es un ritmo endógeno circunscrito a un periodo de 24 horas, como ya se ha indicado, por el ciclo luz/oscuridad. Cuando los animales son mantenidos en luz constante, el ritmo de secreción de melatonina desaparece. Sin embargo, cuando son sometidos a oscuridad constante, se sigue observando un modelo de secreción rítmico, pero éste no está sincronizado entre animales, y es algo inferior a 24 horas (Ebling *et al*., 1988; Kumar y Lincoln, 1995). Este hecho parece indicar que la luz tiene como papel sincronizar este ritmo endógeno a un ciclo de 24 horas y que existe un reloj endógeno que dirige esta secreción de melatonina. Este reloj endógeno se localiza, en los pequeños rumiantes, en los núcleos supraquiasmáticos (Malpaux *et al*., 1993). Igualmente, cuando los animales son sometidos a un flash de luz, consistente en repartir el periodo de luz en dos fases, 7 horas y luego 1 hora aplicada 16 ó 17 horas después, éste es interpretado por el animal como 16 horas de luz durante la noche (Chemineau *et al*., 1992b). 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 nocturna pueden modificar la curva de secreción de melatonina y, en 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.

Una vez que la melatonina ha sido sintetizada, y a diferencia de lo que sucede con otras hormonas que son almacenadas en la propia glándula donde ha sido sintetizada, ésta es liberada directamente a la circulación. El modo o vía de secreción de la melatonina a la circulación general, para alcanzar sus puntos de acción a nivel del sistema nervioso central, contempla dos hipótesis:

- Una secreción a la circulación general, después de su síntesis. La melatonina es secretada por una gran vía vascular que fluye desde la glándula pineal a la vena de

Galiano y luego pasa a las venas yugulares. Mediante las arterias carótidas es transportada al cerebro, y se supone que son estas concentraciones las encargadas de actuar a nivel de los puntos de acción de esta hormona en el sistema nervioso central y controlar, por ejemplo, la actividad reproductiva.

- Una secreción directa al líquido cefalorraquídeo, en los ventrículos cerebrales. Aunque se ha sugerido que únicamente sería secretada al mismo un 0,1% de la cantidad total de melatonina sintetizada por la pineal.

Las especies ovina y caprina han sido utilizadas como modelos para el estudio de la secreción de melatonina porque se dispone de un análisis sencillo de realizar para su determinación, ya sea en suero o en plasma, y porque, además, poseen un gran volumen de sangre que permite una frecuente extracción de cualquiera de sus venas yugulares. Sin embargo, Zarazaga *et al*. (2010a y 2010b) han comprobado que las concentraciones plasmáticas de melatonina entre ambas yugulares varían muchísimo en un mismo animal.

2.3.2.2. CATABOLISMO

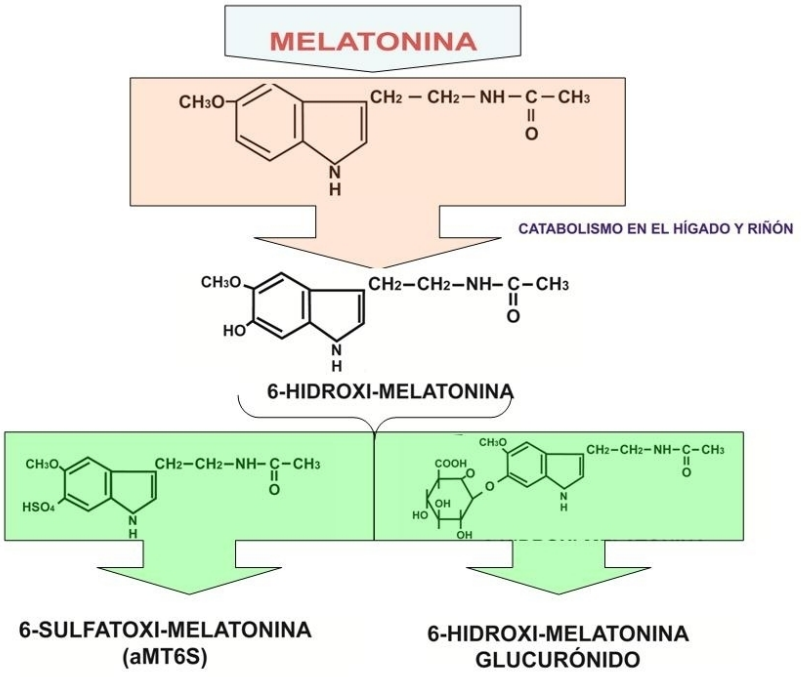
Ya en 1961, Kopin *et al*., sugirieron que la 6-hidroximelatonina, encontrada en el hígado y riñón de ratón, era el metabolito principal de la melatonina. De este modo, la principal vía de catabolismo de la melatonina sanguínea, tanto en roedores (Kopin *et al*., 1961) como en humanos (Jones *et al*., 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 9), 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 6-sulfatoxi-melatonina 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; Pääkkönen *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.

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) o hámster y conejo (13-14 minutos) (Bechgaard *et al*., 1999) y oveja (17,8 minutos) (Zarazaga *et al*., 1998a, 1998b).

Figura 9. Catabolismo de la melatonina por las vías hepática y renal (Adaptado de Kopin *et al*., 1961; Malpaux, 2001).



2.3.3. MECANISMO DE ACCIÓN

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 (Legan y Karsch, 1980). En el caso de la cabra, la estimulación de la secreción de la LH se produce aproximadamente a los 45 de haber comenzado los días cortos y la inhibición aproximadamente a los 30 días de haber comenzado los días largos (Zarazaga *et al*., 2011a, 2011b).

La melatonina actúa en el hipotálamo mediobasal para modular la pulsatilidad de la secreción de GnRH. Esto ha sido demostrado en la oveja, donde microimplantes de melatonina en el hipotálamo, tanto en machos como en hembras y en condiciones de inhibición de la actividad reproductiva, logran estimular la actividad gonadotrópica (Lincoln y Maeda, 1992; Malpaux *et al*., 1993). Sin embargo, los receptores de melatonina en el cerebro se concentran en mayor cantidad en las proximidades de la *pars tuberalis* de la hipófisis y en menor cantidad en el área mediobasal del hipotálamo (Malpaux *et al*., 1997).

La melatonina ejerce sus acciones a través de receptores de alta y baja afinidad. Éstos pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G, que han sido identificados y caracterizados en una variedad de tejidos por autorradiografía y ensayos de ligadura con iodomelatonina (Devenson *et al*., 1992; Gonzalez-Haba *et al*., 1995; Bayarri *et al*., 2004; Ekmekcioglu 2006). En mamíferos, los receptores de melatonina (MTr) se encuentran en la *pars tuberalis* y *distalis* de la hipófisis, en el núcleo supraquiasmático y el área preóptica del hipotálamo, los núcleos paraventricular y anteroventral talámicos, el hipocampo, la corteza cerebral y cerebelar, el área postrema y la retina (Vanecek, 1998). Además, se ha descrito señalización intracelular, tanto por vía del AMPc como del GMPc, lo que sugiere que el polimorfismo es una característica general de la familia de receptores melatoninérgicos (Brydon *et al*., 1999). Existen varios subtipos de receptores: MT1a, que se expresa en el cerebro de mamíferos y aves, MT1b en la retina de mamíferos y MT1c en los melanóforos, el cerebro y la retina de anfibios y en el cerebro de peces y aves (Reppert *et al*., 1995; Reppert *et al*., 1996a, 1996b). Los MTr se han descrito en algunas especies animales a través de técnicas autorradiográficas (Poon *et al*., 1997). En caprinos, esta técnica demostró la presencia de sitios de unión para 2-iodoMT en la *pars tuberalis*, el núcleo

supraquiasmático, el área pre-óptica, el *septum* lateromedial, el fornix, el hipocampo y la corteza cerebral (Devenson *et al*., 1992).

Existen además importantes neurotransmisores implicados en la regulación de la acción de la melatonina. Entre ellos se encuentran la dopamina, la serotonina y el ácido aspártico. La dopamina está relacionada con la inhibición estacional de la secreción de LH, por lo tanto regula la acción de la melatonina. Las células hipotalámicas del núcleo A15 dopaminérgicas están ligadas con la inhibición de la secreción de LH durante el período de anestro en la oveja; a su vez este grupo de células están reguladas por el 17β-estradiol en el período antes mencionado. Estas células traducen la acción de retroalimentación negativa que produce el 17β-estradiol, lo cual es particularmente importante en la acción de la melatonina sobre la GnRH. Una acción similar cumplen las células hipotalámicas del núcleo A14 dopaminérgicas (Thiéry *et al*., 1995). En la oveja hay evidencia de que la dopamina inhibe el sistema de liberación de GnRH y también juega un rol en la inhibición de la reproducción durante el anestro estacionario, actuando sobre el núcleo medio basal (Meyer y Goodman, 1986). En caprinos Mediterráneos se ha observado como el sistema dopaminérgico y serotoninérgico están implicados en la inhibición de la secreción de LH al inicio del periodo de anestro estacionario. Durante el periodo de pleno anestro estacionario la inyección de pimozide, un antagonista dopaminérgico, incrementa las concentraciones medias y el número de pulsos de LH y al final del periodo de anestro estacionario la inyección de naloxona, un antagonista del sistema opioidérgico, incrementa las concentraciones medias de LH, el número de pulsos y la amplitud de los mismos (Zarazaga *et al*., 2011c).

La eminencia media es otra estructura rica en terminales nerviosas dopaminérgicas que integra la señal de la melatonina. Durante el fotoperíodo de días cortos, su actividad decrece, resultando en una disminución de la dopamina por una reducción de la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa que cataliza la síntesis de dopamina; el efecto del fotoperíodo en la actividad de la tirosina hidroxilasa es mediada por la melatonina, a través de una estimulación en la secreción de LH. Sin embargo, la relación entre las células A14 y A15 dopaminérgicas y la eminencia media, aún no ha sido establecida (Tillet, 1995).

La serotonina es otro de los neurotransmisores que inhibe la secreción de LH durante la estación de anestro fisiológico, en cambio el ácido aspártico estimula la

secreción de LH, pero el mecanismo de cómo actúan la serotonina y el ácido aspártico, inhibiendo o estimulando la secreción de LH, no se conoce (Herbison, 1995).

2.4. REGULACIÓN GENÉTICA DE LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA: LOS GENES RELOJ

2.4.1. INTRODUCCIÓN

El gen *Clock* (de sus siglas en inglés *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*) codifica una proteína implicada en la regulación de los ritmos circadianos y fue identificado en el año 1997 (Vitaterna *et al*., 1994; Ishida *et al*., 1999). Las investigaciones comenzaron descifrando el comportamiento de los ritmos circadianos en la mosca *Drosophila melanogaster*, cuyos genes se activan cuando el insecto está expuesto a la luz. En ella se identificaron genes efectores, cuyos productos median respuestas de los animales (por ejemplo la eclosión o la muda) y los genes reloj, cuyos productos regulan el reloj circadiano; dos importantes genes de este grupo son el gen período (*Per*) y el gen atemporal (*Tim*). La activación de todos estos genes requiere que sus promotores estén controlados por las proteínas de los factores de transcripción. El promotor de un gen es la región de ADN que controla la iniciación de la transcripción de dicho gen a ARN. Dicha región (el promotor) está compuesto por una secuencia específica de ADN, localizado justo donde se encuentra el punto de inicio de la transcripción del ADN y contiene la información necesaria para activar o desactivar el gen que regula. Un factor de transcripción es una proteína que participa en la regulación de la transcripción del ADN, pero que no forma parte de la ARN polimerasa. Los factores de transcripción pueden actuar reconociendo y uniéndose a secuencias concretas de ADN, uniéndose a otros factores, o uniéndose directamente a la ARN polimerasa. Los factores de transcripción son estimulados por señales citoplasmáticas. Al ser activados adquieren la capacidad de regular la expresión génica en el núcleo celular, bien activando o bien suprimiendo la transcripción de diversos genes. Ciertos factores de transcripción pueden sufrir mutaciones que los mantienen continuamente activos sin necesidad de señales externas, transformándose así en oncogenes, estimulando sin control la síntesis de proteínas implicadas en la regulación del ciclo

celular. Así, los genes reloj y los genes ciclo codifican las proteínas *Clk* y *Cyc*, respectivamente (Ishida *et al*., 1999).

2.4.2. GENES EN LOS MAMÍFEROS

El primer modelo experimental para el estudio del sustrato genómico de la ritmicidad en mamíferos fue el mutante *tau*, un hámster dorado de período circadiano locomotor de corta duración (Ralph y Menaker, 1988; Lowre *et al*., 2000) y también estudios realizados en ovinos (Lincoln *et al*., 2003). Se han identificado los genes *Per* (tres de ellos), *clock*, *Bmal* y *1/MP03* (Bae *et al*., 2001; Gekakis *et al*., 1998), que son los ortólogos (genes que son semejantes por pertenecer a dos especies que tienen un antepasado común) de *Clk* y *Cyc*, respectivamente. *Clock*, *Bmal* y *1/MP03* se dimerizan, se unen a la caja E (que tiene una deleción en la superficie de transactivación), reducen la expresión de *mper* y alargan el período circadiano, mientras que la pérdida de *Bmal 1/MP03* suprime *mper* y elimina el ritmo circadiano (Figura 10).

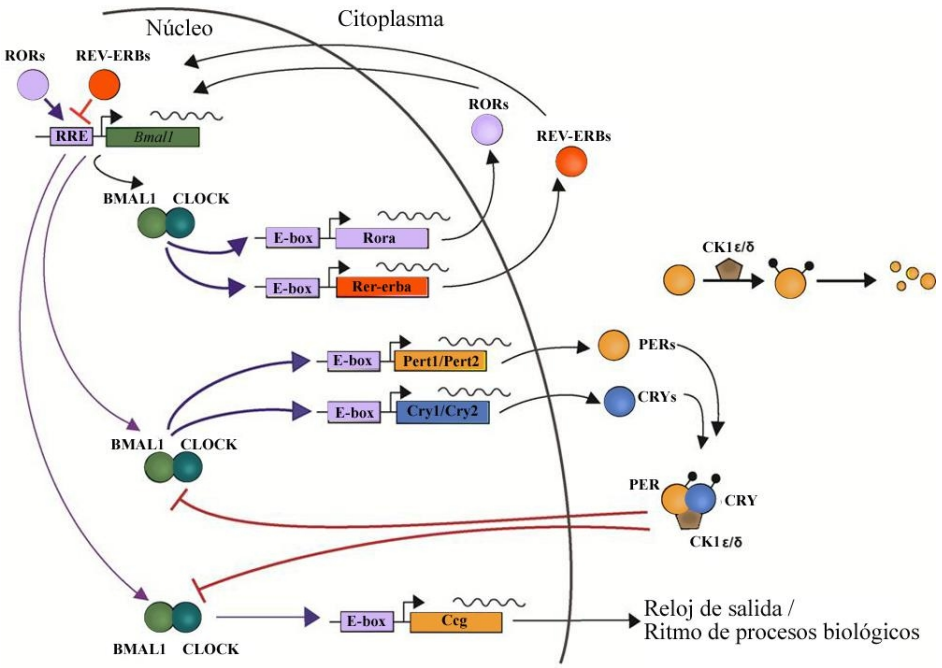
La mutación de cualquiera de los ortólogos de *per*, como son *mper 1* y *mper 2*, altera el ritmo, mientras que la doble mutación lo suprime; *mper 2* activa la transcripción de *bmal 1* y, al contrario que en *Drosophila*, *Bmal 1* cicla en el ratón, mientras que *Clock* no lo hace. Así, *Per* regula positivamente la producción rítmica de los complejos *Clock/Bmal 1,* tanto en moscas como en ratones, aunque con distintos substratos. Se ha demostrado que los productos de *Per* reprimen débilmente la transcripción de *mper 1*, dependiente de *Clock/Bmal 1*, en células de mamífero en cultivo. Así, tanto en insectos como en mamíferos, *Per*, o el complejo *Per/Tim* en *Drosophila*, regulan negativamente su propia transcripción, mientras que regulan positivamente la transcripción del complejo *Clk/ Cyc* (Gekakis *et al*., 1998; Zheng *et al*., 2001; Reppert y Weaver, 2002). La degradación de las proteínas reguladoras de la expresión de los genes del sistema circadiano se acelera por fosforilación, en la que intervienen algunas quinasas (Vielhaber *et al*., 2000; Keesler *et al*., 2000).

En mamíferos, las deficiencias de *mcry 1*o *mcry 2*, que también están presentes en insectos, alteran la duración del período circadiano, y los dobles mutantes son arrítmicos en oscuridad continua (Van der Horst *et al*., 1999). De forma parecida a la acción de *Tim* en insectos, *Mcry* inhibe la transactivación de *Clock/MDP 3* y los dobles

mutantes acumulan *Mper 2*. Ello sugiere que *Cry* reprime la expresión de *Mper*; así, en el mamífero, C*ry* parece haber tomado la función que tiene *Tim* en el insecto; en cambio, no es foto-sensible (Panda, 2002).

Se han descrito ritmos circadianos incluso en proteínas cuyos ARNm no ciclan, lo cual sugiere alguna forma de control post-traduccional (Lee *et al*., 2001), aunado a un posible mecanismo post-transcripcional, como se ha descrito en insectos (Venus y Rossback, 1997). De particular interés resulta la búsqueda de proteínas reguladoras que transmitan la señal circadiana a las proteínas de membrana, sean canales, transportadores o receptores. Es poco lo que se sabe a este respecto, aun cuando se ha identificado un modulador intracelular de canales de potasio activados por calcio, que podría participar en la inducción de la ritmicidad de actividad eléctrica; de hecho, los mutantes carentes de esta proteína no muestran ritmo circadiano locomotor (Ceriani *et al*., 2002).

Figura 10. Modelo del mecanismo molecular involucrado en el reloj circadiano en mamíferos. *Feedback* de autorregulación negativa del reloj circadiano de los mamíferos (Ko y Takahashi, 2006).



3. CONTROL DE LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA EN EL GANADO CAPRINO

3.1. INTRODUCCIÓN

Ya ha quedado demostrado que el patrón reproductivo es el reflejo de la expresión de un ritmo endógeno que es sincronizado y orientado por el fotoperiodo a través de su intermediario, la melatonina (Bon Durant *et al*., 1981). Sin embargo, otros estímulos medioambientales, como la disponibilidad de alimento y las interacciones sociales (Restall, 1992; Restall *et al*., 1995; Walkden-Brown *et al*., 1993c; Mani *et al*., 1996), pueden tener un rol potencialmente importante en la regulación de la estacionalidad.

La nutrición se considera como un factor importante que afecta a la función reproductiva en pequeños rumiantes, influenciando el inicio de la ciclicidad ovárica post-parto en ovejas (Tchamitchian *et al*., 1973; Restall y Starr, 1977) y en cabras (Walkden-Brown *et al*., 1994a). No obstante, Zarazaga *et al*. (2005), trabajando en las mismas condiciones experimentales desarrolladas en la presente Tesis, demostraron que el estado nutricional no es una limitante para el inicio de la actividad reproductiva en hembras caprinas Mediterráneas. Los parámetros reproductivos sí están comúnmente relacionados con los cambios en el peso vivo, por ejemplo, en hembras de raza Boer, el peso vivo promedio en la pubertad varía dependiendo del nivel energético de la dieta administrada (Greyling, 1988) y grandes disminuciones de peso vivo son relacionadas con la época de actividad reproductiva en varias especies (Richards *et al*., 1989).

En caprinos y ovinos, además del fotoperiodo, otro elemento que puede regular los ciclos reproductivos y su expresión lo representa la presencia de otros animales con actividad sexual manifiesta; la presentación de actividad reproductiva, al inicio del estro estacionario, se acelera si existen machos activos o hembras en estro en el rebaño (Martin *et al*., 1986; Álvarez *et al*., 1999). Al papel estimulante de la presencia del macho se le conoce como "efecto macho" (Martin *et al*., 1986; Chemineau, 1987), mientras que cuando dicha estimulación obedece a la presencia de hembras activas sexualmente, se le conoce como "efecto hembra" (Zarco *et al*., 1995; Álvarez *et al*., 1999). Para referirse a ambos fenómenos se ha utilizado el término de bioestimulación sexual (Álvarez *et al*., 1999; Ramírez *et al*., 1999).

3.2. UTILIZACIÓN DE TRATAMIENTOS FOTOPERIÓDICOS Y MELATONINA

3.2.1. INTRODUCCIÓN

Reducir el anestro estacionario, y de este modo lograr provocar que las hembras presenten actividad sexual durante este periodo, ha sido un objetivo prioritario a la hora del control de la reproducción en pequeños rumiantes. El interés de los tratamientos fotoperiódicos y de la administración de melatonina para el control de la estacionalidad se ha incrementado tras la identificación de esta hormona como el mensajero entre la información fotoperiódica y la reproducción, tanto en ovino como en caprino (Arendt *et al*., 1983; Bittman *et al*., 1983a) y por su capacidad para mimetizar los días cortos y por lo tanto estimular la actividad reproductiva.

Los tratamientos utilizados para el control de la reproducción mediante la luz y la melatonina se han basado en los siguientes principios:

- Para estimular la actividad reproductiva mediante el fotoperiodo y la melatonina tiene que haber una alternancia entre días largos y cortos.

- Los días cortos, que estimulan la reproducción, pueden ser reemplazados por un adecuado tratamiento con melatonina cuando los animales hayan percibido un incremento de su duración o días largos durante la primavera y verano. Por lo tanto, la secreción de melatonina mediante implantes actúa, más bien imitando el efecto de los días cortos que enmascarando el efecto inhibitorio de los días largos (O'Callaghan *et al*., 1991).

- La refractariedad es uno de los hechos que determinan el inicio de la inactividad sexual (Robinson y Karsch, 1984) y puede ser interrumpida mediante la exposición de los animales a un pretratamiento fotoperiódico de días largos.

- Los días largos pueden ser modificados por una estructura fotoperiódica en la cual, mediante 1 ó 2 horas de luz extra en un momento determinado del periodo de oscuridad, se estimule la "fase fotosensible" y permita que el animal interprete días largos con una duración de horas de luz menor (Thimonier *et al*., 1985).

3.2.2. UTILIZACIÓN DE TRATAMIENTOS FOTOPERIÓDICOS

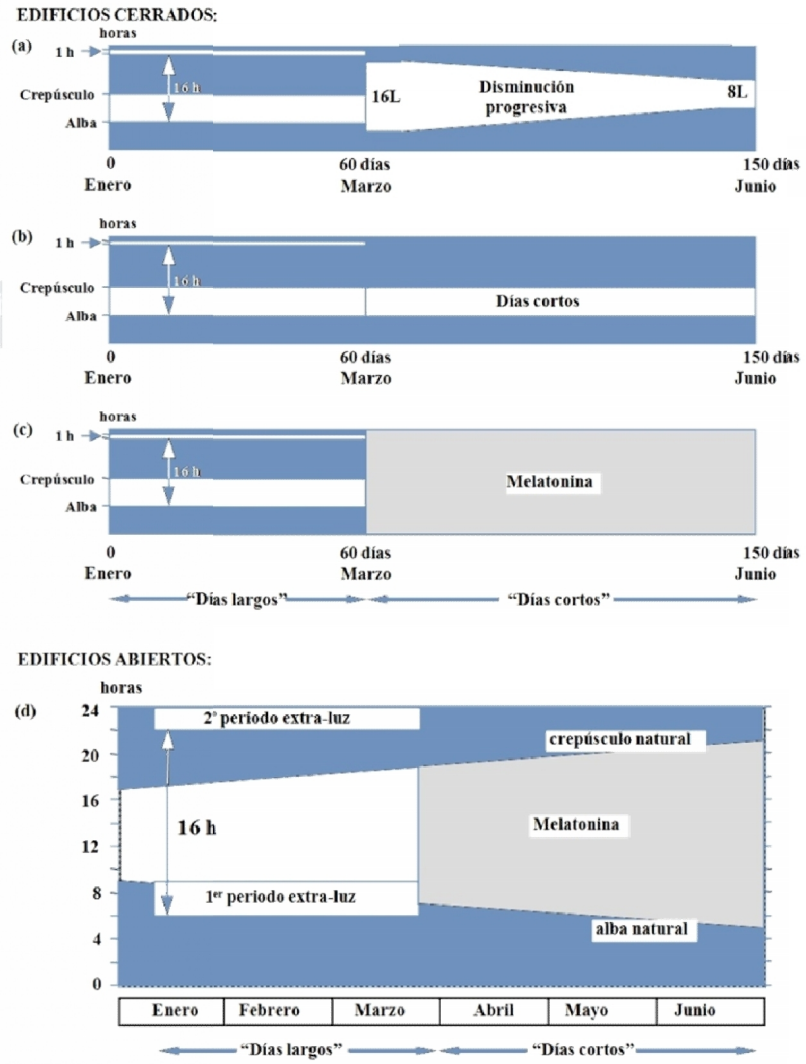
Desde la determinación de que el fotoperiodo controla la actividad reproductiva en pequeños rumiantes (Bittman *et al*., 1983b), se ha intentado modificar la alternancia natural de éste para desencadenar actividad reproductiva (Chemineau *et al*., 1986b, 1988, 1999; Delgadillo *et al*., 2002; Zarazaga *et al*., 2011a, 2011b).

La utilización de los tratamientos fotoperiódicos se realiza generalmente en centros de inseminación artificial, donde se requiere una producción de semen constante a lo largo del año y en los que los machos se mantienen en edificios cerrados, lo que facilita un control exhaustivo del encendido y apagado de las luces. En estos centros de inseminación artificial, una alternancia de un mes de días largos y un mes de días cortos se muestra muy eficaz (Pelletier y Almeida, 1987), permitiendo mantener una producción de semen constante y de alta calidad a lo largo del año y produciendo un 70% más de dosis seminales que aquellos machos mantenidos en fotoperiodo natural (Delgadillo *et al*., 1991). Igualmente, la utilización de dos meses de días largos y dos meses de días cortos, en razas Mediterráneas, permite que la producción espermática media por eyaculado sea prácticamente constante a lo largo del año (Arrebola *et al*., 2010)

De todos modos, la aplicación de fotoperiodo artificial no tiene porque ser una práctica exclusiva de edificios cerrados (Figura 11). En los alojamientos abiertos, se puede seguir el mismo principio que en los alojamientos cerrados, es decir, los animales tienen que ser sometidos a una alternancia 2,5-3 meses de días largos seguidos por días cortos, iniciando el protocolo por los primeros para preparar a los animales al efecto estimulatorio de los segundos (Chemineau *et al*., 1986b, 1988; Malpaux *et al*., 1989). De este modo, en animales alojados en edificios abiertos se pueden aplicar de dos a tres meses de días largos seguidos por implantes de melatonina, siempre y cuando esos días largos se realicen en el momento adecuado del año, que suele ser cuando los días son más cortos entre el final del otoño y el comienzo invierno (Delgadillo *et al*., 2001). Igualmente, otra manera de realizar este tipo de tratamientos fotoperiódicos en edificios abiertos sería sin la necesidad de utilizar implantes de melatonina; para ello, el tratamiento fotoperiódico debería hacerse lo suficientemente temprano en el ciclo fotoperiódico anual como para que al final del tratamiento de días largos todavía queden días lo suficientemente cortos cómo para que sean adecuadamente interpretados por los

animales (Delgadillo *et al*., 2002). De este modo, la efectividad de este tratamiento permite en cabras, cuando es asociado a efecto macho, una fertilidad de un 76% (Chemineau *et al*., 1988). De igual forma, en latitudes subtropicales permite incrementar la libido y producción espermática de los machos tratados con fotoperiodo artificial (Flores *et al*., 2000; Delgadillo *et al*., 2001).

Figura 11: Tratamientos fotoperiódicos para controlar la actividad sexual de los pequeños rumiantes en edificios cerrados o abiertos. Adaptado de Chemineau *et al*. (1992c).



En general, la utilización exclusiva de fotoperiodo artificial para inducir actividad sexual requiere del empleo de métodos adicionales basados generalmente en la manipulación de la estructura social del grupo, como sería la utilización del efecto

macho (Chemineau, 1987; Ungerfeld *et al*., 2004). Todo ello, hace que este tratamiento de utilización exclusiva del fotoperiodo, como medio de desencadenar actividad sexual durante el periodo de anestro estacionario, sea un tratamiento que tenga un gran interés en explotaciones de tipo ecológico. La ganadería ecológica es practicada en la actualidad, constituyéndose como una alternativa a la ganadería convencional, no sólo en los países industrializados, donde su mercado crece a tasas vertiginosas (especialmente en algunos países de la Unión Europea, Suiza, Japón y Estados Unidos), sino en diversos países del Sur. La FAO está dando un creciente apoyo a su extensión pero existe un vacío legal en la mayor parte de los países (Scialabba, 2000). En la Unión Europea se ha establecido un marco legislativo, mediante el Reglamento (CEE) n° 2092/91 del Consejo, de 24 de junio de 1991 sobre producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios. En el caso de España, el Reglamento se articula en forma de Real Decreto 506/2001, de 11 de mayo, por el que se modifica el Real Decreto 1852/1993, de 22 de octubre, sobre producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios. En dicha normativa se señala que la reproducción debe basarse en métodos naturales, estando prohibida la sincronización de celos con hormonas u otros productos químicos artificiales, incluso la aplicación de más de 4 h adicionales de luz artificial (Pérez *et al*., 2004).

3.2.3. UTILIZACIÓN DE IMPLANTES DE MELATONINA

El interés por la utilización de melatonina exógena para el control de la reproducción en pequeños rumiantes se incrementó una vez que se demostró claramente su implicación en el control de la actividad reproductiva. De esta manera, se ensayaron diferentes vías de aplicación buscando siempre que las concentraciones de melatonina en sangre se incrementaran durante un periodo de tiempo relativamente largo.

La administración de melatonina exógena, en la mayor parte de la bibliografía referente a la especie ovina y caprina, se ha llevado a cabo durante el periodo de anestro, si bien existe alguna referencia en la que la hormona se administra durante la estación sexual, con un efecto positivo, adelantando el inicio de la siguiente estación reproductiva (Jordan *et al*., 1990). Además, generalmente, este tratamiento es asociado al efecto macho, de manera que Chemineau *et al*. (1988), trabajando con cabras

Alpinas, indican que la respuesta ovulatoria es mayor cuando a las cabras implantadas se les somete a efecto macho. De este modo, Forcada *et al*. (2009) señalan que aunque no está bien descrito el mecanismo mediante el cual el efecto macho influencia la tasa de ovulación, éste tiene un efecto directo sobre la tasa de ovulación, lo que se ha descrito tanto en ovejas cíclicas como en ovejas anéstricas. Igualmente, Zúñiga *et al*. (2002), han mostrado, en ovejas tratadas o no con melatonina un mes y medio antes de la aplicación del efecto macho, un efecto significativo del tratamiento hormonal sobre la tasa de ovulación y que la interacción melatonina/ciclicidad fue más efectiva a la hora de mejorar la tasa de ovulación en ovejas cíclicas, mientras que la mejora en dicho parámetro en las ovejas en anestro en el momento de introducir los machos se debe al propio efecto macho. Dadas estas interacciones se puede afirmar que la combinación efecto macho con tratamiento de melatonina parece adecuada para la cubrición de razas de reducida estacionalidad en primavera, donde suele haber un cierto porcentaje de animales cíclicos. En este sentido, uno de los puntos que en muchos casos compromete la efectividad del tratamiento es precisamente el estado de actividad sexual en el que se encuentran los machos durante el periodo de anestro, porque éstos sufren importantes bajadas de actividad sexual y libido en el momento de su utilización (Walkden-Brown *et al*., 1994a; Delgadillo *et al*., 1999, 2004; Karagiannidis *et al*., 2000; Todini *et al*., 2007; Zarazaga *et al*., 2009). Por lo que Delgadillo *et al*. (2001, 2002) sugieren que hay que activar sexualmente a los machos, ya sea mediante la utilización exclusiva de fotoperiodo artificial o la combinación de fotoperiodo artificial y melatonina.

Hay que señalar que existen tres puntos muy importantes a la hora de realizar un tratamiento con melatonina:

a. Vía de administración

Los primeros trabajos intentaron determinar la eficacia de las distintas vías de administración. Así, Roche *et al*. (1985) señalan que la mayor efectividad se obtiene con la vía oral (cada día) y con implantes subcutáneos, frente a la reducida efectividad de la vía intramuscular. Estos autores desechan esta última vía de aplicación en relación a sus inferiores resultados y a lo dificultoso de su realización práctica a nivel de explotación.

Otra vía de administración ha sido a través de implantes intravaginales (Nowak y Rodway, 1985) y de bolos intrarruminales de absorción lenta (Poulton *et al*., 1987);

ambas mantienen niveles elevados de melatonina en plasma durante varias semanas y ejercen el mismo efecto que la vía oral, adelantando la actividad reproductiva.

Por lo tanto, parece que la distribución diaria de melatonina, por la vía que sea, es un requisito esencial para obtener el comienzo precoz de la actividad ovulatoria. Así, Ronayne *et al*. (1989) observaron que ovejas recibiendo melatonina 1 ó 3 veces a la semana reanudaron su actividad a la vez que ovejas no tratadas, y aquellas que recibieron melatonina una vez al día o mediante un implante subcutáneo reanudaron su actividad ovulatoria un mes antes. La administración diaria, en la alimentación, al final de la tarde, se muestra tan eficiente como la inserción de implantes subcutáneos en ovejas (English *et al*., 1986) y cabras (Chemineau *et al*., 1988). Sin embargo, los implantes de melatonina son más fáciles de utilizar, ya que sólo es necesaria una pequeña cantidad en el implante comparado con la distribución diaria (15-50 mg en lugar de 2 mg diarios durante 70 días).

La vía definitiva fue la utilización de implantes subcutáneos que se aplican en la base de la oreja; estos implantes inducen unos niveles plasmáticos de la hormona de 100 a 300 pg/ml durante unos 70 a 100 días. Este modo de aplicación hace que esta melatonina exógena proporcione una información fotoperiódica que es interpretada por los animales tratados como de días cortos (Malpaux *et al*., 1997), y estimula la actividad reproductiva siempre y cuando los animales hayan percibido un número suficiente de días largos o crecientes. Por ello, el momento de aplicación de los implantes de melatonina es uno de los puntos clave a la hora de analizar su efectividad. Estos días largos, previos al inicio del tratamiento, pueden ser provocados mediante el encendido de las luces durante el periodo del año en el que los días son más cortos, o mediante la estimulación de la fase fotosensible situada alrededor de 16 horas después del alba (Chemineau *et al*., 1992c) (Figura 11).

b. Momento de aplicación y duración del tratamiento

Como ya se ha indicado que, para asegurar la eficacia del tratamiento con melatonina, antes de recibir la hormona los animales deben haber experimentado un número suficiente de días largos (Nowak y Rodway, 1985). Por ello, en la mayoría de los estudios referidos a la utilización de implantes subcutáneos de melatonina se han realizado iniciando el tratamiento en torno al solsticio de verano (junio), principalmente

cuando se ha trabajado con razas procedentes de latitudes altas (>40º) (Moore *et al*., 1988; McMillan y Sealey, 1989; Haresign *et al*., 1990; Durotoye *et al*., 1991; Haresign, 1992; Knight *et al*., 1992), obteniéndose en general buenos resultados, tanto en adelanto de la estación sexual como en lo que a mejora de la tasa de ovulación y prolificidad se refiere. Así, en estudios realizados en Australia con ovinos, se muestra que el momento óptimo para la inserción de implantes de melatonina (asociado a efecto macho) es de 3 a 6 semanas antes de la introducción de los machos, lo que mejora la actividad estral y ovulatoria de los animales tratados (Williams *et al*., 1986), así como también los porcentajes de fertilidad (Dunstan *et al*., 1987; Staples *et al*., 1986, 1991). En Nueva Zelanda la aplicación de implantes en el solsticio de verano mejora los parámetros de fertilidad y prolificidad (McMillan y Sealey, 1989). En Grecia, ovinos implantados cerca del solsticio de verano (5 de junio) mostraron un adelanto en el inicio de actividad reproductiva entre 17 y 23 días antes que los animales no tratados (Kouimtzis *et al*., 1989). En Inglaterra, con tres razas ovinas implantadas entorno al solsticio de verano, también se ha conseguido un aumento de la prolificidad, fertilidad y precocidad en el inicio de la actividad sexual (Haresign *et al*., 1990). De este modo, y en latitudes elevadas en ovinos, Haresign (1992) recomienda que el tratamiento comience al menos 2 meses antes del inicio de la actividad natural de la raza estudiada.

En España, los implantes de melatonina se han utilizado en explotaciones ovinas desde su autorización en el año 2000 (Forcada y Abecia, 2000) y de acuerdo a lo señalado por estos autores los mejores resultados se consiguen cuando los implantes son insertados alrededor el equinoccio de primavera, dicha efectividad se anula si las ovejas son implantadas en momentos próximos al solsticio de verano, salvo el caso de la raza Lacha, la más estacional de España. Además, cuando los implantes son colocados entorno a esas fechas, su máxima efectividad se logra cuando se ha realizado una separación física entre los lotes tratados y control (Forcada *et al*., 2000). De este modo, los índices reproductivos (fertilidad, prolificidad y fecundidad), si bien se producen variaciones según los ensayos, son casi siempre superiores en las ovejas implantadas (López y Inskeep, 1991; Fernández *et al*., 1992; Gómez-Brunet *et al*., 1995; Valares *et al*., 2002; Zúñiga *et al*., 2002; Pontes-González *et al*., 2003, 2004; Sánchez *et al*., 2003; Gutiérrez *et al*., 2004; Ramírez *et al*., 2004; Arrebola *et al*., 2005, 2008). Además, cuando el efecto de la utilización de melatonina exógena no es tan claro, generalmente coincide con resultados reproductivos muy elevados en los lotes testigo o cuando se han

usado razas de una reducida estacionalidad sexual. Igualmente, la efectividad del tratamiento disminuye con la edad de los animales, de manera que corderas implantadas tienen una efectividad inferior a hembras adultas implantadas pero superior a las corderas control (Azevedo *et al*., 2003; Gascón *et al*., 2003; Legaz *et al*., 2006; Palacios *et al*., 2006; Tamayo *et al*., 2007), existiendo igualmente variaciones entre sistemas de explotación (Palacín *et al*., 2006) e incluso entre razas (Abecia *et al*., 2007).

Incluso, también se han logrado unos buenos resultados cuando los implantes de melatonina se han colocado en agosto (Requejo *et al*., 2005) e inclusive cuando se han colocado entorno al solsticio de invierno (Forcada *et al*., 2002; Palacios *et al*., 2002; Abecia *et al*., 2011). De todos modos, lo que se ha observado en razas ovinas españolas es que el tratamiento con melatonina, entorno al equinoccio de primavera, logra un adelanto del periodo de actividad reproductiva (Forcada *et al*., 1995), más que desencadenar actividad reproductiva durante el periodo de anestro estacionario, principalmente si no va asociado a la realización de efecto macho (Forcada *et al*., 2002).

Nowak y Rodway (1987) señalan que la duración óptima del tratamiento con implantes subcutáneos de melatonina en ovinos es alrededor de 70 días, aunque Forcada *et al*. (1999) muestran resultados positivos a partir de 30 días post colocación, momento en que se juntan machos y hembras. Igualmente, Argote *et al*. (2005), trabajando con ovejas raza Aragonesa, demuestran que un intervalo de tan sólo 16 días, habiendo colocado los implantes de melatonina en el mes de marzo, no es suficiente para obtener unos adecuados resultados reproductivos, en comparación con un intervalo de 33 e incluso 50 días.

Respecto al caprino, la autorización de los implantes de melatonina en España se realizó en el año 2009, en el marco de la presente Tesis Doctoral, y los resultados vienen a ser muy similares a los obtenidos en la especie ovina. Al igual que sucede con el ovino, en razas procedentes del norte de Europa, se recomienda su colocación entorno al solsticio de verano (Chemineau *et al*., 1986b; 1988; 1992b; 1996). Sin embargo, en razas Mediterráneas se ha tendido a aplicar en momentos similares al ganado ovino. Así, con la raza Murciano-Granadina se ha descrito que la colocación de implantes de melatonina en el equinoccio de primavera (marzo) muestra mejores resultados, en cuanto fertilidad alcanzada, en comparación a otros tratamientos hormonales como progesterona inyectada, incluso, mediante las esponjas vaginales (Grasa-Bañón, 2009). En la raza Florida, también se registran mejores porcentajes de preñez en hembras

tratadas con melatonina asociado a efecto macho, habiendo sido colocado el implante en diferentes momentos del periodo de anestro estacionario (Martín-Santana *et al*., 2009). Estos autores señalan, incluso, que los mejores porcentajes de preñez se obtuvieron en hembras tratadas con melatonina a finales de enero y primeros de febrero, es decir, al inicio del periodo de anestro estacionario y a las que también se les realizó efecto macho. También, en la raza Florida, Santos *et al*. (2002) obtuvieron una mejora de los resultados reproductivos en cabras implantadas en marzo.

En cuanto al tiempo de separación de machos y de hembras, Chemineau *et al*. (1986b, 1988, 1992b, 1996) señalan que este periodo de separación entre machos y hembras debe ser más largo que en el caso de la especie ovina, lográndose muy buenos resultados con una separación que oscila entre los 35 y los 80 días. El motivo puede ser que, como estos mismos autores demostraron, en la cabra, los días cortos tardan más tiempo en inducir actividad ovulatoria que en la oveja (unos 80 días en la cabra y unos 50 días en la oveja, Chemineau *et al*., 1988). Si bien, recientemente en caprinos Mediterráneos se ha observado que la estimulación de la secreción de LH se produce aproximadamente a los 45 días del inicio de los días cortos (Zarazaga *et al*., 2011a, 2011b) y a los 31 días de la colocación del implante (Zarazaga *et al*., 2011c).

c. Dosis

La dosis de melatonina proporcionada por el tratamiento también puede ser un punto muy importante y en pocos estudios ha sido tratado este punto. Mediante la administración, a través de alimentación o inyección, la dosis ha de ser suficiente para mantener elevados los niveles plasmáticos hasta que la secreción durante la noche se produzca. Si no es así, los animales tratados percibirían un periodo de luz entre la "noche artificial" producida por la melatonina exógena y la noche natural, por lo que los animales percibirían un día largo y el tratamiento no sería efectivo. En ovino se considera que 2 mg es la mínima dosis a administrar vía oral (Kennaway *et al*., 1982; Arendt *et al*., 1983).

En caprinos y ovinos se utilizan implantes subcutáneos de 18 mg (Malpaux *et al*., 1997). Estos implantes, al igual que otros sistemas de aplicación que proporcionan una liberación continua de la hormona, elevan los niveles basales de melatonina en plasma, pero no eliminan la secreción endógena normal de la misma por la glándula pineal

durante la noche (Lincoln y Ebling, 1985; Nowak *et al*., 1990). Así pues, con este método de aplicación de implantes subcutáneos se pretende obtener una curva diaria de la hormona similar a la de un día corto. Chemineau *et al*. (1993) señalan que la dosis óptima de melatonina a aplicar debe mantener las concentraciones plasmáticas al menos en un 50% del mayor nivel nocturno para obtener un avance en la actividad ovulatoria.

3.3. LA BIOESTIMULACIÓN SEXUAL

3.3.1. INTRODUCCIÓN

Las interacciones entre individuos del mismo sexo o distinto sexo generan múltiples efectos que pueden modular las distintas etapas de un ciclo reproductivo, como la aparición de la pubertad, actividad ovulatoria, actividad estral y crecimiento testicular. En el caso de las ratas el contacto entre hembras puede inducir dos efectos opuestos, un alargamiento o acortamiento de la duración de los ciclos ovulatorios (McClintock, 1983). También se ha observado que la presencia de hembras adultas retrasan el inicio de la pubertad en hembras jóvenes (Vandenbergh *et al*., 1972) y en los machos, la presencia de adultos inhibe el desarrollo testicular de los machos jóvenes (Vandenbergh, 1971).

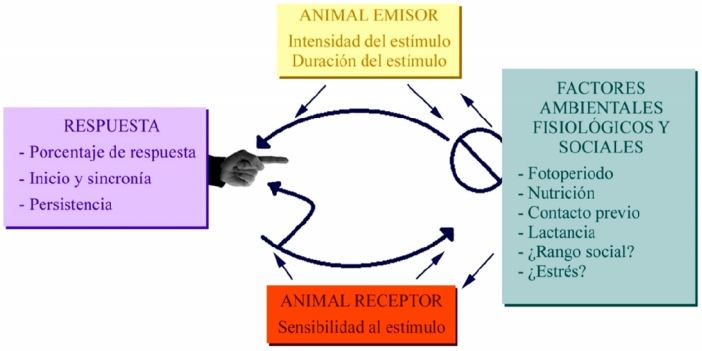
En especies como ratones (Pennycuik, 1972), vacas (Wagon *et al*., 1972), monos (Abbott *et al*., 1981) y ciervos (Clutton-Brock *et al*., 1986) la posición social de los animales también influye sobre la ocurrencia del estro; animales de baja jerarquía social muestran, con frecuencia, depresión de los signos de celo o caen en anestro. Se sabe que la exposición continua de un animal a condiciones de estrés, lo que es característico en individuos subordinados o de baja jerarquía, puede aumentar sus niveles plasmáticos de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y esteroides corticales (Ladewigh, 1987), al igual que la prolactina (Laming *et al*., 1975) (Figura 12). Se sabe que tanto los corticoesteroides (Liptrap y Cummings, 1991; Viveiros y Liptrap, 1995) como la prolactina (Varley y Foxcroft, 1990) tienen la capacidad de bloquear la ovulación mediante la inhibición de la secreción de LH y estradiol (Barb *et al*., 1992).

En caprinos y principalmente en ovinos se ha documentado ampliamente que la exposición repentina a hembras anéstricas (anestro estacional) de un macho sexualmente activo incrementa rápidamente la frecuencia de pulsos de LH (Álvarez y

Zarco, 2001; Delgadillo *et al*., 2008) y la ovulación ocurre entre 40 y 50 h después de la primera exposición; ambos eventos, en la mayoría de los casos, se acompañan por conducta estral (Hulet, 1966; Flores *et al*., 2000; Álvarez y Zarco, 2001; Delgadillo *et al*., 2008). El efecto ejercido por los moruecos en el sistema reproductivo de las ovejas es mediado por feromonas presentes en la lana y la grasa de lana de los moruecos (Knight y Lynch, 1980; Okamura y Mori, 2005, citados por Arroyo, 2011).

Wayne *et al*. (1989) realizaron un estudio con ovejas Suffolk, pinealectomizadas, ovariectomizadas y con implante de estradiol, alojadas con ovejas y machos intactos, y demostraron que las señales sociales emitidas por estos animales pueden sincronizar la actividad reproductiva estacional en ovejas sin la capacidad de responder a señales fotoperiodicas. O'Callaghan *et al*. (1994) demostraron un efecto crónico de la presencia del morueco en el ciclo reproductivo anual de la oveja. Observaron que el final de la época reproductiva se retrasa 43 días por la exposición continua del macho, durante 2 meses a partir del solsticio de invierno.

Figura 12. Representación esquemática de las interacciones sociales que se presentan en los fenómenos de bioestimulación sexual en ovejas y cabras (Walkden-Brown *et al*., 1993a). Modificado por Álvarez y Zarco (2001).



3.3.2. EL EFECTO MACHO

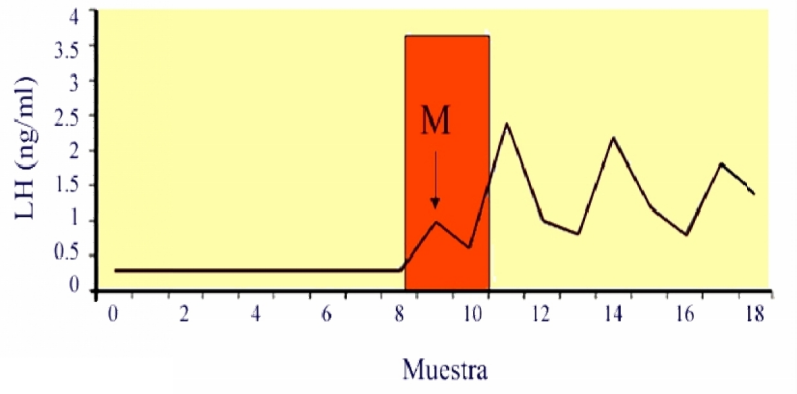
En ovejas y cabras en anestro estacionario, la introducción repentina del macho provoca el reinicio de la actividad reproductiva cíclica. Delgadillo *et al*. (2009) señalan que la introducción de los machos puede realizarse en forma intermitente, sin necesidad

de mantener separados a machos y hembras durante periodos de tiempo prolongados. Del total de las hembras expuestas al macho, un porcentaje alto ovula dentro de los primeros tres a cinco días.

Los primeros indicios del fenómeno fueron estudiados por Underwood *et al*. (1944), que demostraron la relación entre la fecha de introducción del morueco al rebaño y la época de partos, sugiriendo que las montas ocurren entre 20 y 25 días después del primer contacto entre los animales de distinto sexo. Desde entonces, el efecto macho se ha estudiado detalladamente en ovejas (Signoret, 1980; Martin *et al*., 1986; Martínez *et al*., 1998) y cabras (Shelton, 1960; Ott *et al*., 1980; Delgadillo *et al*., 2003, 2009).

Tal como se señaló anteriormente, en ambas especies la introducción del macho resulta en un rápido aumento en la frecuencia de liberación de pulsos de LH (Figura 13), seguido por un pico preovulatorio de la misma gonadotropina y ovulación (Poindron *et al*., 1980; Martin *et al*., 1986; Chemineau, 1987). Este incremento en la actividad hipofisaria estimula el desarrollo folicular, provocando un pico preovulatorio de LH que induce la ovulación (Chemineau, 1985; Martin *et al*., 1986; Chemineau, 1987). En la cabra la secreción de LH pasa de 0,3 pulsos antes de la introducción del macho, a una frecuencia de 2,2 pulsos durante tres horas seguidas tras la introducción del macho; la amplitud de los pulsos se aumenta de igual forma, pasando de 0,5 ng/ml antes de la entrada del macho a 1,7 ng/ml después del primer contacto (Figura 13) (Chemineau *et al*., 1986a, 1986b).

Figura 13. Concentraciones plasmáticas de LH con relación al momento de la introducción del macho (M) en cabra doméstica. El recuadro naranja resalta el aumento en la concentración de LH que se produce alrededor de la introducción del macho. Las muestras sanguíneas se tomaron cada 20 minutos (Chemineau *et al*., 1986b), citado por Álvarez (2000).

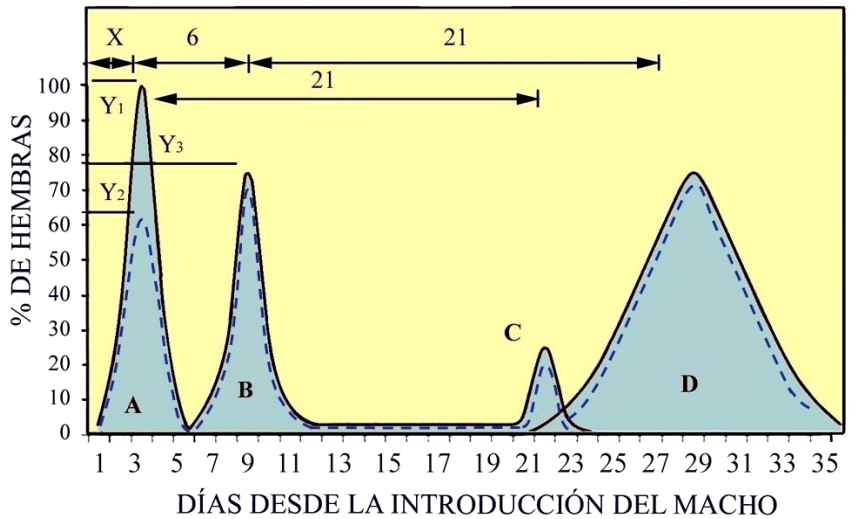


En la cabra, el cambio en la secreción pulsátil de LH culmina con la ovulación de más del 95% de las hembras dentro de los primeros tres días posteriores a la introducción del macho (Chemineau, 1983; Chemineau *et al*., 1986b) (Figura 14). La primera ovulación inducida se asocia con conducta estral aproximadamente en el 60% de los casos, dicha ovulación es seguida por un ciclo corto con duración de tres a ocho días en cerca de 75% de las hembras (Chemineau, 1987). El ciclo corto se caracteriza por una secreción baja (o nula) y transitoria de progesterona por el cuerpo lúteo (Ott *et al*., 1980; Chemineau *et al*., 1984). Después del ciclo corto se presenta una segunda ovulación cuyo cuerpo lúteo es de duración normal y que en el 90% de las hembras se acompaña de conducta estral. Así, todas las fases lúteas de duración normal permiten que la próxima ovulación se acompañe de conducta estral en todos los casos (Chemineau, 1983; Martin *et al*., 1986; Chemineau *et al*., 1987).

Por otro lado, el papel de los andrógenos, en el grado de estimulación dado por los machos, ha quedado probado al demostrarse que las secreciones de los machos con mayores niveles de testosterona desencadenan una respuesta mayor en las hembras (Iwata *et al*., 2000). Aunque las sustancias involucradas en el efecto macho no han sido identificadas, algunos ácidos grasos se han mencionado como responsables en la

estimulación feromonal (Hillbrick y Tucker, 1996). No es posible, sin embargo, considerar al efecto macho como el resultado exclusivo de la comunicación química, ya que la respuesta está afectada por otros factores. Se ha identificado un componente conductual en el fenómeno. Los machos que manifiestan una actividad sexual más intensa logran mayores cantidades de hembras inducidas que aquellos con los mismos niveles de andrógenos pero con menor actividad (Signoret *et al*., 1982; Rodriguez-Iglesias *et al*., 1991; Perkins y Fitzgerald, 1994); en tales casos, la estimulación emitida tendría componentes visuales, auditivos y táctiles cuya medición se hace difícil.

Figura 14. Representación esquemática de la respuesta ovulatoria (——) y estral (.....) posterior a la introducción del macho en cabras anéstricas. Más de 90% (Y_1) de las hembras ovulan dentro de los primeros tres días (X) después de la introducción del macho (pico A); esta primera respuesta ovulatoria es acompañada de conducta estral en 60% de los casos (Y_2). La mayoría de las cabras (Y_3) experimenta un ciclo corto y presenta una segunda ovulación seis días después (pico B); los animales no gestantes ovulan por tercera ocasión 21 días más tarde (pico D). El resto de las cabras (25%) presenta un ciclo de duración normal después de la primera ovulación y ovulan por segunda ocasión 21 días después (pico C). Todas las ovulaciones de los picos B, C y D se acompañan de conducta estral. X, Y_1, Y_2, y Y_3 pueden modificarse por la profundidad del anestro (Chemineau, 1983).



Se ha sugerido que parte de la respuesta obtenida en hembras que no pueden detectar al macho por medio del olfato (anósmicas) se debe al reconocimiento visual del macho (Cohen-Tannoudji *et al*., 1986). Es posible que en la respuesta no mediada por la información feromonal se encuentre involucrado un proceso de aprendizaje, en donde la experiencia de las hembras para distinguir a los machos activos de los inactivos sea fundamental (Álvarez y Zarco, 2001). Recientemente, Delgadillo *et al*. (2008) sugieren que la respuesta al efecto macho está dada, además, por una interacción entre genotipo y ambiente.

En cuanto al efecto en la fertilidad, la primera ovulación inducida por el efecto macho es menor que en la segunda. Ello se puede explicar como una probable consecuencia de los ciclos cortos que generalmente siguen a la primera ovulación inducida (Martin *et al*., 1986; Chemineau, 1987; Flores *et al*., 2000) y se puede asumir que la calidad del cuerpo lúteo no permite el establecimiento de la gestación, lo que no sucede en la segunda ovulación. En esta última, se logran fertilidades y tasas ovulatorias similares a las que se observan en las hembras que previamente se encontraban ciclando (Chemineau, 1987; Martínez *et al*., 1998). Aunque existen resultados contradictorios (Pearce *et al*., 1984), el contacto con el macho mejora significativamente la tasa ovulatoria, siendo ésta mayor a la observada en ovulaciones espontáneas (Cognie *et al*., 1980; Oldham *et al*., 1985).

La eficiencia del efecto macho está relacionada, también, con la profundidad del anestro en las hembras, de modo que cuando la introducción de los machos se realiza durante la época de anestro profundo, la primera ovulación se retrasa al compararla con la que se obtiene mediante la introducción de machos con hembras en anestro superficial (Lindsay y Signoret, 1980; Chemineau, 1983).

3.3.2.1. ASPECTOS A TENER EN CUENTA EN LA EFICACIA DEL EFECTO MACHO

a. Intensidad de la libido de los machos y señales olfativas

Varios estudios han demostrado que la intensidad del comportamiento sexual de los machos es un factor determinante en la respuesta de las hembras expuestas al efecto macho. Los moruecos y machos cabríos, que despliegan una intensa libido, inducen la

ovulación en un mayor porcentaje de hembras que aquellos que despliegan una débil libido (Perkins y Fitzgerald, 1994; Flores *et al*., 2000). En ovejas y cabras, el olor del macho estimula la secreción de la LH (Knight y Lynch, 1980; Over *et al*., 1990). Sin embargo, el porcentaje de hembras que ovulan al ser expuestas al olor de los machos es menor que el obtenido en hembras en contacto directo con los machos (Claus *et al*., 1990; Walkden-Brown *et al*., 1993a). En estos estudios, no se ha determinado claramente el papel que tiene el comportamiento sexual y el olor de los machos. Esto se debe, muy probablemente, a que es difícil separar el comportamiento sexual del olor de los machos, los cuales pueden actuar sinérgicamente para estimular la actividad sexual de las hembras.

b. Importancia de las vocalizaciones de los machos

En algunas especies de mamíferos, se demostró que las vocalizaciones de los machos estimulan la actividad sexual de las hembras. En las cerdas, las vocalizaciones de los machos inducen su inmovilización en la prueba de la monta (Signoret, 1974), mientras que en el venado rojo, las vocalizaciones adelantan el inicio de la estación sexual (McComb, 1987). Delgadillo *et al*. (2008) sugieren que las vocalizaciones de los machos cabríos estimulan el estro de las cabras en anestro (Vielma *et al*., 2005). En conjunto estos datos demuestran que la calidad de las señales emitidas por el macho es determinante en la respuesta de las cabras sometidas al efecto macho.

c. Factores que limitan la respuesta de las hembras al efecto macho

Existen estudios que demuestran que la respuesta de las hembras expuestas al efecto macho varía con la estación del año, con la duración de contacto entre los dos sexos, la experiencia sexual de los machos y si las hembras han tenido, previamente, parto o no. Asimismo, se ha demostrado que la separación previa entre los dos sexos por lo menos 3 semanas es necesaria para obtener una máxima respuesta. Sin embargo, tal como se había descrito anteriormente, de acuerdo a lo señalado por Delgadillo *et al*. (2009), el uso de machos sexualmente activos mejora la eficiencia del efecto macho, aún en las condiciones descritas previamente; llegando a demostrar que la separación entre ambos sexos no es necesaria siempre y cuando se introduzcan machos que estén

sexualmente activos y la respuesta es todavía mejor si los machos que se introducen son nuevos, es decir, no conocidos previamente por las hembras.

- **Estación del año**

En las hembras de razas que presentan estacionalidad reproductiva muy marcada, la respuesta al efecto macho varía en los diferentes meses del anestro estacional, de manera que la respuesta puede ser baja o ausente cuando el efecto macho se realiza en pleno anestro estacionario y mejora si se hace al final del mismo (Restall, 1992; Flores *et al*., 2000). La baja eficiencia del efecto macho se debe, probablemente, a que las señales emitidas por el macho son de baja calidad debido a que se encuentran, al igual que las hembras, en reposo sexual (Lincoln y Short, 1980; Restall, 1992; Delgadillo, 1992; 1999). De forma que, los machos cabríos sexualmente activos permiten estimular la actividad sexual de las cabras en los diferentes meses del anestro estacionario (Delgadillo *et al*., 2008).

- **Duración del contacto entre machos y hembras**

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

- **Separación previa entre machos y hembras**

La separación previa entre los dos sexos, por lo menos tres semanas, se consideró como un factor indispensable para estimular la secreción de LH y la ovulación de las

hembras expuestas al efecto macho (Schinckel, 1954; Underwood *et al*., 1994). Sin embargo, posteriormente se demostró que esta separación puede, en algunos casos, no ser necesaria. En las ovejas en contacto con los machos, la introducción de un nuevo macho induce la ovulación de la misma manera (85%) que en aquellas previamente separadas de los machos (86%) (Cushwa *et al*., 1992). Asimismo, el 89% de las ovejas que son anovulatorias, después de estar en contacto 65 días con machos, ovulan 4 días después de ponerlas en contacto con un nuevo macho (Pearce y Oldham, 1988). En estos estudios, la respuesta de las hembras pudo deberse a la introducción del nuevo macho. Otra posibilidad es que, cuando se introdujo el nuevo macho, éste ya hubiera iniciado su actividad sexual, lo que mejora la calidad de sus señales, permitiendo una alta respuesta de las hembras. Delgadillo *et al*. (2008) demostraron que, en las cabras locales de la Comarca Lagunera en México, la separación entre los dos sexos no es necesaria si se utilizan machos sexualmente activos.

- **Experiencia sexual de los machos**

Los machos ovinos sin experiencia sexual, es decir, los que han sido privados desde el destete del contacto con las hembras, manifiestan un comportamiento sexual menos intenso al ser expuestos a las hembras que los machos criados de forma heterosexual (Katz *et al*., 1988; Price *et al*., 1991). Por ello, los machos sin experiencia sexual son menos eficientes para estimular el estro de las hembras sometidas al efecto macho (Ungerfeld, 2008). Sin embargo, la inexperiencia sexual de los machos no disminuye la respuesta de las hembras sometidas al efecto macho, si éstos son sexualmente activos.

- **Número de parto o edad de las hembras**

La respuesta estral y ovulatoria de las ovejas o cabras nulíparas es menor que el de las multíparas al ser expuestas al efecto macho (Murtagh *et al*., 1984; Oldham *et al*., 1985; Walkden-Brown *et al*., 1993b; Mellado *et al*., 2000). Esta diferencia puede deberse a un desconocimiento del olor del macho en las hembras sin experiencia sexual, o a la calidad de su comportamiento estral, y no a una deficiente secreción hormonal, ya que la secreción de LH no difiere entre nulíparas y multíparas (Gelez *et al*., 2004). Más bien, esta diferencia puede deberse a un desconocimiento del olor del macho en las

hembras sin experiencia sexual, o a la calidad de su comportamiento estral. En efecto, el comportamiento previo a la aceptación del macho y posteriormente el comportamiento receptivo de las hembras nulíparas es menor que el de las multíparas en el primer contacto con los machos (Gelez *et al*., 2004). En consecuencia, las hembras nulíparas requieren más montas por eyaculación (Gelez *et al*., 2003). El comportamiento sexual de los machos puede, entonces, ser un factor determinante en la respuesta de las hembras nulíparas expuestas al efecto macho. Las hembras multíparas no disminuyen la respuesta estral al efecto macho si son expuestas a machos sexualmente activos.

3.3.3. EL EFECTO HEMBRA

En hembras ovinas se ha demostrado que, en ausencia del fotoperiodo, las hembras pueden utilizar información social para iniciar su actividad reproductiva en el momento apropiado del año (Wayne *et al*., 1989); ello sucede aun en ausencia total del macho (Sunderland *et al*., 1990), lo que sugiere que la información proveniente de las hembras puede ser usada por sus compañeras para inducir y sincronizar su actividad sexual. Como ya se ha visto, las hembras pueden usar señales provenientes de los machos; en ausencia de éstos, recurren a la información de otras hembras para ayudarse a coordinar sus eventos reproductivos con un ambiente físico y social apropiado (Sunderland *et al*., 1990). De manera que, dentro de los fenómenos de bioestimulación sexual conocidos en ovejas y cabras, se ha encontrado la existencia de un papel inductor de la actividad sexual por parte de las hembras de forma independiente de los machos (efecto hembra directo) (Oldham, 1980; Bouillon *et al*., 1982).

Otro hecho que demuestra el efecto hembra es que cabras ovariectomizadas tratadas con estradiol son capaces de inducir ovulación en sus compañeras anéstricas (Restall *et al*., 1995), mientras que la introducción de cabras que no se encuentran en estro no provocan una inducción de la actividad sexual, aun cuando se trate de individuos extraños al rebaño (Walkden-Brown *et al*., 1993a; Restall *et al*., 1995).

Una vez que se presenta el pico preovulatorio de LH en las hembras bioestimuladoras, la mayoría de las cabras anéstricas responden de la misma forma en aproximadamente 15 horas después (Álvarez *et al*., 1999; Álvarez, 2000), dicho retraso se ha considerado como el necesario para que las hembras anéstricas reciban el estímulo

de sus compañeras en estro y la respuesta se presente de manera sincronizada (Álvarez *et al*., 1999).

La respuesta al efecto hembra ha mostrado ser tan alta como la obtenida con el efecto macho o con la utilización de progestágenos (80%) (Walkden-Brown *et al*., 1993a; Álvarez *et al*., 1999), aunque en algunos estudios la inducción lograda es menor a la mencionada (Zarco *et al*., 1995; Álvarez, 2000), pero la actividad estral conseguida es siempre superior a la de los grupos testigo en los cuales no se utiliza efecto hembra (Álvarez *et al*., 1999). Al igual que en el efecto macho, los estímulos olfativos (feromonales) podrían estar involucrados en la estimulación sexual dada por las hembras en estro a otras hembras (Zarco *et al*., 1995; Álvarez *et al*., 1999).

En cabras y ovejas, el efecto hembra probablemente juega un papel de soporte y reforzamiento para el efecto macho, mejorando el grado de sincronía en el inicio de la actividad reproductiva estacional.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo ha sido determinar la eficacia de distintos tratamientos, como la utilización de fotoperiodo artificial, la aplicación de melatonina y el efecto macho, en el desencadenamiento de la actividad reproductiva durante el periodo de anestro estacionario, en caprinos Mediterráneos.

De este objetivo general se desglosan los siguientes **objetivos parciales**:

1. Determinar si el tratamiento con implantes de melatonina exógena, aplicado en el equinoccio de primavera, es capaz de inducir actividad reproductiva en esta época de anestro estacionario, en hembras caprinas Mediterráneas y sin separación de los machos. Además, se evaluará el efecto a medio plazo del tratamiento, analizando si éste retrasa el inicio de la siguiente época de actividad reproductiva.

2. Comprobar si la combinación de fotoperiodo artificial de días largos, con la posterior aplicación de melatonina al final del tratamiento fotoperiódico, es capaz de inducir actividad reproductiva durante el anestro estacionario (primavera), sin separación de machos y, además, estimar si este tratamiento provoca alguna variación en el inicio de la siguiente época de actividad reproductiva.

3. Estudiar si un tratamiento exclusivo de fotoperiodo artificial de días largos, durante tres meses y sin separación de los machos, es capaz de estimular la actividad reproductiva durante el periodo de anestro estacionario y comprobar si este tratamiento provoca alguna variación en el reinicio de la siguiente época de actividad sexual.

4. Determinar cuáles son los mejores resultados reproductivos, obtenidos en dos razas caprinas Mediterráneas, cuando se utilizan diferentes protocolos en la aplicación de implantes de melatonina.

5. Determinar si el uso de fotoperiodo artificial de días largos y/o la aplicación de

melatonina exógena son efectivos para inducir actividad reproductiva durante el periodo de anestro estacionario, en machos cabríos. Y establecer si estos tratamientos modifican el inicio de la siguiente época de actividad reproductiva.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

ARTÍCULOS PUBLICADOS

Artículo 1. Se corresponde con el objetivo 1:

Efecto de los implantes de melatonina sobre la actividad sexual de hembras caprinas Mediterráneas sin separación de los machos.

Effect of melatonin implants on sexual activity in Mediterranean goat females without separation from males.

Luis Ángel Zarazaga, María Carolina Gatica, Irma Celi, José Luis Guzmán, Benoît Malpaux.

Theriogenology (2009) 72:910-918.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Theriogenology 72 (2009) 910–918
Theriogenology
www.theriojournal.com

Effect of melatonin implants on sexual activity in Mediterranean goat females without separation from males

L.A. Zarazaga [a,*], M.C. Gatica [a], I. Celi [a], J.L. Guzmán [a], B. Malpaux [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 INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux, Centre INRA de Tours, 37380 Nouzilly, France*

Received 9 February 2009; received in revised form 29 April 2009; accepted 23 May 2009

Abstract

This work was designed to determine whether melatonin treatment at the spring equinox can induce reproductive activity in goats without separation from males (separation being the normal practice in Spanish farming systems) and whether this treatment modifies the onset of the natural breeding season. Twenty-nine entire does were distributed into two groups (Group M, n = 14; Group C, n = 15). A third group of ovariectomized, estradiol-treated goats (OVX group, n = 5) was used to study the effect of melatonin on reproductive activity. On March 18, Groups M and OVX received a subcutaneous melatonin implant. In entire females, estrus was tested daily using entire aproned males, and ovulation rate was assessed after identification of estrus. Plasma progesterone in entire goats, plasma luteinizing hormone (LH) in the OVX group, and live weight and body condition score for all animals were recorded once a week. In entire goats, a clear treatment by time interaction was observed for progesterone concentrations ($P < 0.001$), with a period of high progesterone concentrations during the natural seasonal anestrus in Group M. A similar period of high LH concentrations was observed in the OVX group. Whereas all females of Group M presented ovarian activity during this period, no female of Group C did. The resumption of the natural breeding season was retarded in Group M in comparison with that in Group C ($P < 0.05$). We can conclude that in Mediterranean goats, melatonin implants can induce reproductive activity without separation from males, and it causes a small retardation in the reactivation of reproductive activity in the natural breeding season.
© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Estrus; Goat; Male effect; Melatonin; Seasonality

1. Introduction

Some breeds of goats and sheep originating from mid and high latitudes exhibit a seasonal variation in reproductive activity during the year [1,2]. The timing of reproductive seasonality in these small ruminants, as well as in most mammals of the temperate zones, is controlled by photoperiod [2]. Photoperiod information is conveyed to the neuroendocrine system by the circadian secretion of melatonin from the pineal gland [3]. This hormone is synthesized and secreted by the pineal gland in a light-dependent daily rhythm generated by an endogenous circadian clock: high levels during the dark phase of a light-dark illumination cycle and low levels during the light phase [4,5].

Goats are denominated short-day breeders because their period of sexual activity occurs in the autumn to winter, and because the transfer to short days (8 h of light per day) and long days (16 h of light per day) is followed by a stimulation and an inhibition, respectively, of

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

0093-691X/$ – see front matter © 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.theriogenology.2009.05.020

reproductive activity [2]. As short days are characterized by a longer duration of melatonin secretion than that on long days, different attempts have been made to mimic the effect of short days by artificially prolonging the duration of high levels of circulating melatonin. Exogenously administered melatonin from continuous slow-release implants has been shown to advance the onset of the breeding season in sheep and goats by mimicking the stimulatory effect of short days [2,6] without suppressing the endogenous secretion [7,8]. However, although short days (induced by photoperiodic treatments or by exogenous melatonin) stimulate breeding activity, animals eventually become refractory to short days when kept under this day length for extended periods of time [2]. They cease their reproductive activity, reinitiating the breeding season after a period of sexual rest.

Traditionally, exogenous melatonin treatment is accompanied by a prior separation of males and females for 45 d, inducing a male effect to optimize the response during the anestrus period, obtaining a higher synchronization at mount. Male effect is a habitual practice in some extensive or semiextensive farm systems, but intensive systems generally present difficulties in separating males and females to induce this male effect, and hypothetically there could be more problems in using a melatonin treatment.

Mediterranean breeds have a short seasonal anestrus, especially when social (male effect) or nutritional factors are managed properly [9–11]. Therefore, in Mediterranean flocks at commercial level, melatonin implants are usually inserted at approximately the spring equinox [12,13].

The aim of this study was to determine whether treatment with exogenous melatonin at the spring equinox can induce reproductive activity in goats without the use of male effect (short-term effect), and whether this treatment causes a variation in the reactivation of reproductive activity in the natural breeding season (medium-term effect).

2. Materials and methods

2.1. Animals

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 on an experimental farm (latitude 37°15′N) of the University of Huelva, which meets the requirements of the European Community Commission for Scientific Procedure Establishments (1986). Twenty-nine entire, nonpregnant adult female goats, which were between 1.5 and 4 yr old at the beginning of the experiment and had kidded at least 5 months previously, were used. The experiment started on March 4, when the goats were assigned at random to the two experimental groups, balanced for live weight (LW) and body condition score (BCS) [14], and finished on September 30. Both groups—the control group (Group C, n = 15) and the melatonin-treated group (Group M, n = 14)—were kept in the same communal yard with an uncovered area throughout the experiment and without any supplementary light. On March 18, Group M received 1 subcutaneous melatonin implant containing 18 mg of the hormone (Melovine; CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain) at the base of the left ear. These implants release melatonin for about 10 wk and raise daytime concentrations to about 100 pg/mL in goats [15] and in ewes [16].

In addition, a third group of ovariectomized, estradiol-treated goat does (OVX, n = 5) were implanted with exogenous melatonin at the same date as the entire females and, similarly to them, were kept in a communal yard with an uncovered area throughout the experiment and without any supplementary light. Prior to the start of the experiment, the does used in the OVX group were ovariectomized and implanted with a 3-cm silicone implant (internal diameter (i.d.) = 3.3 mm; external diameter (o.d.) = 4.6 mm) [17] containing crystalline estradiol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Implants were soaked in physiologic serum before insertion to prevent an initial peak of steroid release. This group was used to study the direct effect of melatonin implant without the contact with the males to demonstrate whether melatonin alone implanted at this moment is able to induce the reactivation of luteinizing hormone (LH) secretion during the natural seasonal anestrus. For this reason, this group was completely isolated from the rest.

During the whole experiment, animals were maintained under intensive management and were fed daily with lucerne hay, barley straw ad libitum, and commercial concentrate, according to Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) standards [18], to maintain adult weight or allow growth in younger females throughout the experiment. All animals had free access to water and mineral blocks containing trace elements and vitamins.

2.2. Sampling

To avoid a possible male effect that could modify the reproductive activity, before the onset of the experiment

bucks were allocated close to the intact females in a separate barn. In entire does, estrous activity was tested daily using 10 entire aproned bucks. The males were introduced into the intact females group from March 4 until the end of the experiment at 0900, and sexual behavior of the bucks and females was observed for three consecutive hours, from 0900 to 1200, during the study. During the rest of the day, bucks were isolated in their barn but close to the females. Females standing at mounting by the male were considered in estrus. Ovulation rate was evaluated by laparoscopy 7 d after positive identification of estrus. To determine the occurrence of silent ovulations and to confirm ovarian activity, blood samples were collected weekly from each animal by jugular venipuncture and assayed for progesterone. Immediately after collection, samples were centrifuged and plasma was stored at − 20 °C until assay. To define the changes in LH secretion in ovariectomized goats, blood samples were collected weekly [19] from each animal by jugular venipuncture. After blood collection, samples were managed as mentioned previously. Live weight and BCS were recorded weekly for all animals.

2.3. Hormone assays

Plasma progesterone concentrations were assayed by radioimmunoassay, using the technique described by Terqui and Thimonier [20]. The sensitivity of the assay was 0.125 ng/mL. The intra-assay and interassay coefficients of variation were 6.4% and 4.4%, respectively.

Plasma LH concentrations were determined using double-antibody ELISA, as previously described in Faure et al. [21]. The sensitivity of the assay was 0.1 ng/mL. The intra-assay and interassay coefficients of variation of the control were 4.0% and 2.1%, respectively.

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

2.4. Definitions of reproductive activity

The reproductive activity induced by melatonin treatment (estrous activity or ovulatory activity) was defined as the first estrus or the first ovarian activity, respectively, after implant insertion, detected during spring, the natural nonbreeding season at this latitude. The reactivation of reproductive activity in the natural breeding season (estrous activity or ovulatory activity) was defined as the first estrus or the first ovarian activity, respectively, detected during the natural breeding season. The nonbreeding season and the natural breeding season were defined according to the results obtained at the same latitude and with a similar method by Zarazaga et al. [10]. For Group M, the mean duration of anestrus or of the anovulatory season was defined as the number of days between the last detected estrus or last ovulation induced by the melatonin treatment and the first detected estrus or first ovulation of the following breeding season [2].

Ovulatory activity was confirmed when two or more consecutive plasma samples had progesterone concentrations above baseline (0.5 ng/mL [22]) with subsequent cyclicity. For each goat, the date of the last plasma progesterone value below baseline that was followed by the first extended cyclic pattern was taken as the onset of ovulatory activity. Cessation of ovulatory activity was considered to have occurred when three or more consecutive plasma samples had concentrations below baseline. The date of the first plasma progesterone value below baseline at the completion of the last extended cyclic progesterone pattern was taken as the end of ovulatory activity.

Sexual activities observed during the experiment were grouped as (i) estrous cycle, when detected estrous behavior was accompanied by an increase in serum progesterone levels above 0.5 ng/mL; (ii) ovulatory activity, when an increase in serum progesterone levels above 0.5 ng/mL in at least two consecutive samples occurred but was not preceded by detected estrous behavior; (iii) ovulation rate of each detected cycle; (iv) length of estrous cycle classified as normal (16 to 27 days), short (<16 days), or long (>27 days) duration.

The reproductive state in the ovariectomized, estradiol-treated group was assessed using characteristics of the LH profile. The onset of pituitary activity was defined as the date of the first plasma LH sample above 0.5 ng/mL in a sequence of two or more samples above 0.5 ng/mL. The end of pituitary activity was defined as the date of the last plasma LH sample above 0.5 ng/mL, followed by a sequence of two or more points below 0.5 ng/mL [10].

2.5. Statistical analysis

Weekly means (±SEM) of LW, BCS, progesterone, and LH for each group were calculated. The effect of the treatment and time on LW, BCS, and progesterone was analyzed using an analysis for repeated measures. In entire goats, the date of the first detected estrus or first ovulatory activity induced by the melatonin implant during the seasonal anestrus, the date of the first detected estrus or the first ovulatory activity in the natural breeding season, and the ovulation rate of each

detected estrus in each period were determined for each goat. ANOVA was used to evaluate the effect of treatment on these reproductive parameters. The percentage of estrous cycles classified according to their duration and the incidence of ovarian activity and estrus induced by melatonin implant detected during the seasonal anestrus or during the natural breeding season were compared between groups using the chi-square test.

To study the effect of LW or BCS on ovulation rate at each detected estrus, entire goats were divided into groups depending on their LW at each estrus, Group 1 (LW $\leq$ 50 kg) and Group 2 (LW $>$ 50 kg), or, depending on their BCS at the same time, Group A (BCS $\leq$ 2.50) and Group B (BCS $\geq$ 2.75).

In ovariectomized goats, the weekly mean (±SEM) effect of time on LH concentrations was analyzed using an analysis of repeated measures.

3. Results

3.1. Effect of treatment on live weight and body condition score

Fig. 1 shows the changes in LW and BCS during the experiment. No effect of melatonin treatment on LW was observed. At the start of the experiment, Groups M and C had similar LW and BCS. However, there was a clear effect of time ($P < 0.001$) and a treatment by

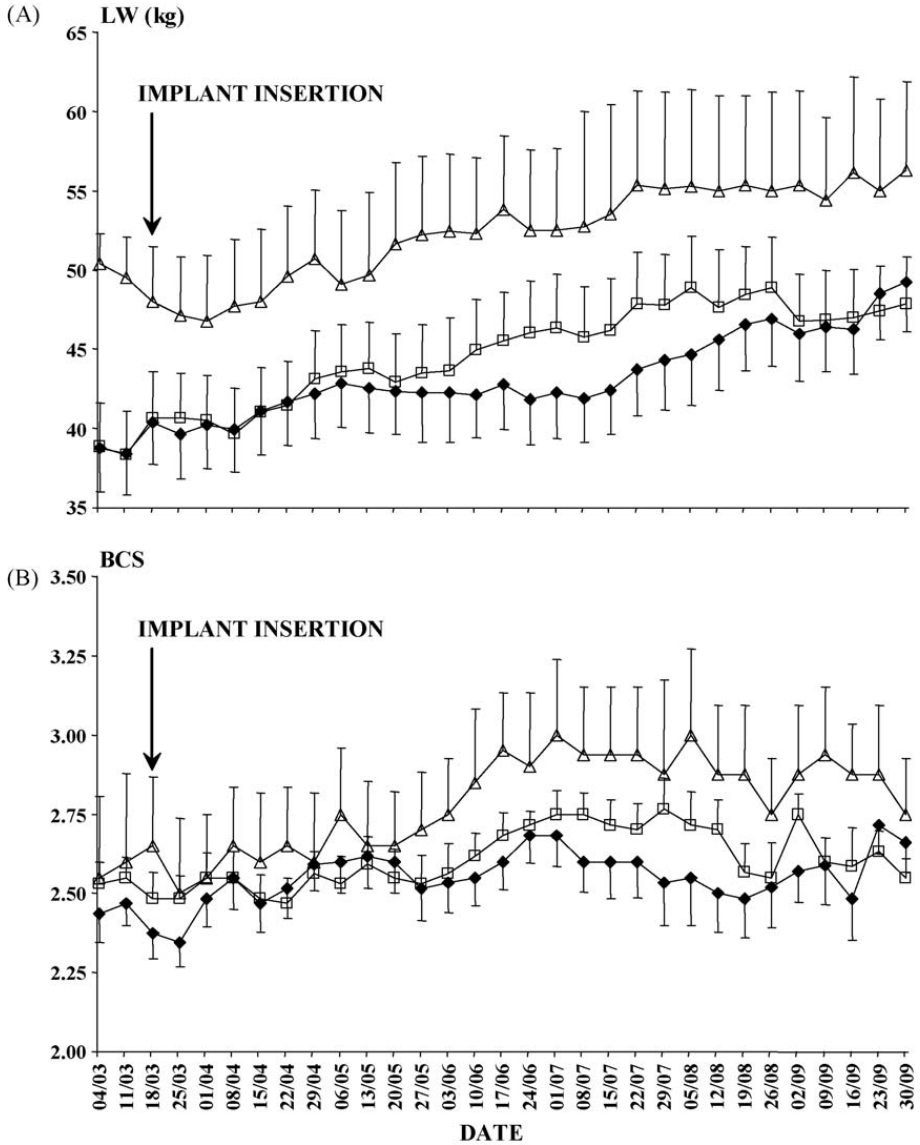


Fig. 1. Weekly mean (±SEM) for (A) live weight and (B) body condition score of entire Mediterranean goat females subjected to natural changes in day length (Group C, □), treated with exogenous melatonin on March 18 (Group M, ◆), or ovariectomized, estradiol-treated females implanted with exogenous melatonin on March 18 (OVX group, △).

time interaction ($P < 0.05$). In Group M, LW was relatively stable during the nonbreeding season (defined as the time between the first and the last ovarian activity during the natural seasonal anestrus), when they gained 0.53 ± 26.54 g/d, and markedly increased during the period that they were reproductively inactive (this was defined as the period between the last ovarian activity during the natural seasonal anestrus and the first ovarian activity in the new breeding season), when they gained 34.98 ± 11.69 g/d. On the other hand, in Group C, LW increased from the onset of the experiment until the onset of the natural breeding season (47.92 ± 10.42 g/d).

With regard to BCS, no effect of treatment or interaction was observed, but there was a clear effect of time ($P < 0.001$).

3.2. Effect of treatment on progesterone and LH concentrations

Fig. 2 shows the changes in progesterone and LH concentrations during the experiment. Progesterone concentrations showed a clear effect of time and a treatment by time interaction ($P < 0.001$). The interaction demonstrated that exogenous melatonin induces a marked ovarian activity in the treated group during the natural seasonal anestrus. However, no effect of treatment was observed.

Group M showed two periods of high progesterone concentrations. The mean date of the first ovarian activity was April 17 (±3.20 d), with a range for the onset of ovarian activity from April 8 until May 13; the range for the end of ovarian activity was from May 20 until July 1. The progesterone values remained higher than baseline for 54 ± 4.95 d, until June 11 (±3.68 d). Furthermore, this group was characterized by 100% of the animals presenting ovarian activity in response to the melatonin treatment and 71.4% showing the first ovarian activity in the first 33 d after implant insertion. There is a clear, rapid effect of the melatonin implant in stimulating the progesterone concentrations, because after only 31.5 ± 2.82 d after implant insertion, the progesterone concentrations rose above baseline. The second period was from September 7 (±3.19 d) until the end of the experiment.

In contrast, the control group showed a period of increased progesterone concentrations related only to the natural breeding season, indicating that no female of this group presented ovarian activity during the natural seasonal anestrus, despite the animals being in contact with Group M. The period of high progesterone concentrations was from August 20 (±6.97 d) until the end of the experiment. Group C resumed the natural breeding season at an earlier date than that observed for Group M ($P < 0.05$). No differences between Groups M and C in the natural reactivation of the ovarian activity

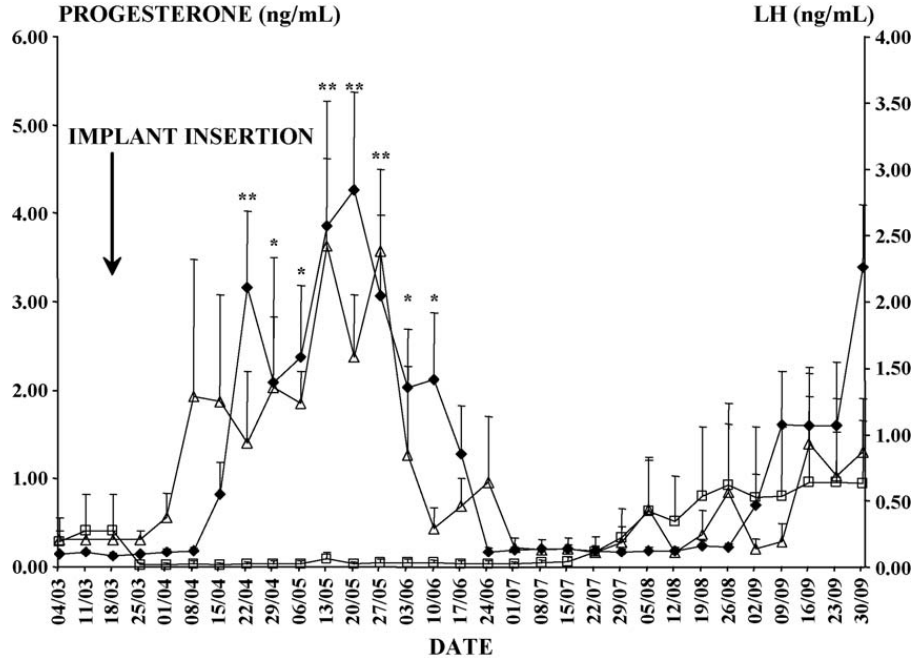


Fig. 2. Weekly mean (±SEM) for progesterone concentrations (ng/mL) of entire Mediterranean goat females subjected to natural changes in day length (Group C, □) or treated with exogenous melatonin on March 18 (Group M, ◆) and for LH concentrations (ng/mL) in ovariectomized, estradiol-treated females implanted with exogenous melatonin on March 18 (OVX group, △). *$P < 0.05$; **$P < 0.01$.

Table 1
Number and percentage of estrous cycles classified according to their duration during the reproductive activity induced by melatonin treatment during the seasonal anestrus (SA) and during the natural breeding season (NBS) in entire Mediterranean goat females subjected to natural changes in day length (Group C) or treated with exogenous melatonin on March 18 (Group M).

Period	Group	Number of cycles	Short (<16 d) n (%)	Normal (16 to 27 d) n (%)	Long (>27 d) n (%)
SA	M	24	3 (12.5)^{a}	17 (70.8)^{b}	4 (16.7)^{a}
	C	0	0	0	0
NBS	M	17	2 (11.7)^{aA}	13 (76.5)^{bA}	2 (11.7)^{aA}
	C	20	1 (5)^{aA}	14 (70)^{bA}	5 (25)^{aA}
Total	M	41	5 (12.2)^{aA}	30 (73.2)^{bA}	6 (14.6)^{aA}
	C	20	1 (5)^{aA}	14 (70)^{bA}	5 (25)^{aA}

Note: Values with different letters in the same row (a, b) or the same column (A, B) in each period are significantly different.

measured by progesterone concentrations were observed at any date.

With regard to the LH concentrations, there was a significant effect of time (Fig. 2). The evolution of LH concentration in the OVX group was very similar to that of the progesterone concentrations in the entire goats of Group M, and no statistical differences were observed ($P > 0.05$). This group showed two periods of high LH concentrations (higher than 0.5 ng/mL): the first started on April 17 (±10.17 d), with values remaining high until June 5 (±9.3 d); the second period was from September 11 (±12.35 d) until the end of the experiment. Similarly to the case of Group M, the LH secretion increased rapidly after implant insertion, with a delay of only 30.33 ± 10.17 d.

The results of the onset and the end of reproductive activity according to the LH or the progesterone concentrations in Groups OVX and M, respectively, were not different ($P > 0.05$). The increase of the LH secretion on the OVX group during the seasonal anestrus demonstrates that melatonin implant itself is able to induce a reproductive activity during this period and indicates that no contact with males is necessary. Similarly, no differences were observed for the onset of the natural breeding season between the two groups treated with melatonin (OVX and M).

3.3. Effect of treatment on date of onset of estrous activity in entire goats

As with the progesterone concentrations, no estrous activity was observed in entire goats of Group C during the natural seasonal anestrus, despite the animals being in contact with those of Group M. However, in Group M, 85.7% of the animals showed estrous activity, and 57.1% showed the first estrous activity in the first 33 d after implant insertion. The mean date of estrous activity for Group M during the seasonal anestrus was April 20 (±5.02 d). The dates of the reactivation of estrous activity in the natural breeding season were September 11 (±3.31 d) versus August 22 (±6.12 d) for Groups M and C, respectively ($P < 0.01$). The range of the onset of ovarian activity was from August 26 until September 27 and July 8 until September 23 for Groups M and C, respectively.

3.4. Effect of treatment on ovulation rate and duration of the cycle

The ovulation rate of the first detected estrus during the nonbreeding season in Group M was 1.60 ± 0.20 corpora lutea. No effect of treatment on this parameter was observed for the first estrus of the natural breeding season (1.42 ± 0.15 vs. 1.58 ± 0.19 corpora lutea for Groups M and C, respectively). No effect or interaction between treatment and the categories of LW or BCS was observed.

Table 1 shows the frequency distribution of cycles according to their length during the whole experiment. The proportion of short and long cycles was similar, and they were less frequent than normal cycles, with no observable differences between groups. With regard to the first estrus detected during the seasonal anestrus in Group M, only 14.23% were silent ovulations, and 21.4% were short cycles. However, at the resumption of the natural breeding season, only one short cycle at the first detected estrus was found in Group C.

4. Discussion

The results of the current study demonstrated that the treatment with exogenous melatonin at the spring equinox without separation from the male effectively induces reproductive activity during the natural seasonal anestrus (short-term effect) with normal cycles and sexual behavior, and that this treatment induces a small retardation in the reactivation of reproductive activity in the natural breeding season (medium-term

effect). Moreover, there is no effect of the LW and BCS on this activity.

A pattern of body weight changes, associated with reproductive activity, was observed in all groups, despite the fact that they were fed to maintain their body weight; such variations in body weight have been reported previously in this species [10,11,23,24]. These changes occurred differently between Groups M and C, due to the treatment by time interaction. These results do not seem to be a direct effect of the action of photoperiod, as has been suggested by Barenton et al. [25]; rather it seems due to the fact that food intake was reduced [26], and probably there was greater activity as a consequence of an intense sexual activity, as reported in Australian cashmere bucks [27].

The LH pattern of the ovariectomized-implanted does clearly reflects the seasonal reproductive activity of the melatonin-treated entire does and contrasts with that of the control group. The LH and progesterone concentrations of the treated groups showed a marked effect of treatment with melatonin during the non-breeding season. These results demonstrate the effectiveness of inserting melatonin implants at the spring equinox at Spanish latitudes. Furthermore, they indicate that the period of increasing days between the winter solstice and the spring equinox could be necessary to induce reproductive activity in this period, as in sheep [12], although it has been shown that at higher latitudes the melatonin implant has to be inserted later in the year, nearer to the summer solstice [28]. The results in the OVX group contrast with those reported by Forcada et al. [29]. Those authors observed in ovariectomized, estradiol-treated ewes that the melatonin implant inserted at a date similar to that in our experiment was unable to induce a resumption of reproductive activity before the onset of the natural breeding season. This suggests that goats and sheep may differ in their sensitivity to photoperiod or melatonin implants.

The increase of LH or progesterone concentrations during the sexual rest was very soon after insertion of the melatonin implant in treated groups. The difference is very high if we compare with the results of Chemineau et al. [30] who did not observe any ovulation before the introduction of males after 71 d of melatonin treatment. The increase in the mean values of LH has also been attributed to the effect of melatonin on the hypothalamus-hypophysis [31], increasing the secretion of LH. Afterwards, LH and progesterone concentrations in the treated groups fell to the basal level, probably because of refractoriness to the stimulatory short-days signal provided by melatonin [32,33].

It is important to note that a clear reproductive activity with a very high percentage of response to the melatonin treatment was obtained without isolation from the males. To our knowledge, our findings are the first of this type observed in melatonin-implanted goats, as the male effect is a normal practice when melatonin implants are used. In the References list, the only results from a study of the effectiveness of melatonin implants without separation of the males are those obtained in ewes [34]. The treated ewes showed no reproductive activity during the seasonal anestrus, but the melatonin implants were inserted 1 mo later than in our experiment; they did, however, exhibit an earlier onset of the natural breeding season.

Regarding the percentage of the response in treated goats, our result is similar to that obtained by Pellicer-Rubio et al. [35] working with Alpine goats at a higher latitude and in the Damascus goat breed treated with melatonin in May (spring) [36] in both cases with male effect. However, Chemineau et al. [2], working with Alpine goats treated only with melatonin, obtained a cyclicity of only 46% after the introduction of the males. However, our results in the control group contrast with previous ones obtained by Restall et al. [37], who showed that estrous females can induce ovulation in anovulatory does—they obtained 83% of estrus in anovulatory does exposed to induced-estrus females. This influence of the female had not been studied previously in Mediterranean goats.

The reactivation of the ovarian and estrous activity in the entire goats and the LH secretion in the OVX group in the natural breeding season, despite the retardation observed in treated goats, was similar to that described by Zarazaga et al. [10]. This retardation could be due to the melatonin treatment. The time of reproductive onset in autumn depends on the time of exposure to long days after the winter solstice [38]. The more delayed the exposure to long days, the more delayed the onset of reproductive activity in implanted animals, because the exhaustion of the melatonin implant delayed the perception of the natural long days.

The absence of effect of the melatonin implant on ovulation rate is similar to that reported in ewes by McEvoy et al. [39] and contrasts with previous results [34,40]. Similarly, there was no interaction of BCS or LW with melatonin treatment for the ovulation rate. To our knowledge, our findings are the first of this type observed in melatonin-implanted goats.

In conclusion, the results of the current experiment support the hypothesis that Mediterranean goat does treated with exogenous melatonin and without separation from males showed a clear reproductive activity

during the nonbreeding season, presenting cycles of normal duration with normal estrus, and this treatment causes a slight retardation in the reactivation of reproductive activity in the natural breeding season (medium-term effect). Moreover, there is no effect of the LW or BCS on this activity or the ovulation rate.

Conflict of interest statement

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

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. This work was supported by Grant PETRI 95-0964.OP from C.I.C.Y.T. (Spain). The authors are grateful to CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain, for providing Melovine implants.

References

[1] Ortavant R, Pelletier J, Ravault JP, Thimonier J, Voland-Nail P. Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm animals. In: Clarke JR, editor. Oxford Reviews of Reproductive Biology. Oxford University Press; 1985. p. 305–45.

[2] Chemineau P, Malpaux B, Delgadillo JA, Guerin Y, Ravault JP, Thimonier J, Pelletier J. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. Anim Reprod Sci 1992;30:157–84.

[3] Bittman EL, Dempsey RJ, Karch FJ. Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. Endocrinology 1983;113:2276–83.

[4] Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocr Rev 1991;12:151–80.

[5] Zawilska JB, Nowak JZ. Melatonin: from biochemistry to therapeutic applications. Pol J Pharmacol 1999;51:3–23.

[6] Williams AH, McPhee SR, Reeve JL, Staples LD. Optimum use of subcutaneous melatonin implants to enhance the reproductive performance of seasonal and non-seasonal sheep joined in spring and early summer. Anim Reprod Sci 1992;30:225–58.

[7] O'Callaghan D, Karsch JF, Boland MP, Roche JF. What photoperiodic signal is provided by a continuous-release melatonin implant? Biol Reprod 1991;45:927–33.

[8] Malpaux B, Viguié D, Skinner DC, Thiéry JC, Chemineau P. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. Brain Res Bull 1997;44:431–8.

[9] Lindsay DR. Environment and reproductive behaviour. Anim Reprod Sci 1996;42:1–12.

[10] 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.

[11] Zarazaga LA, Guzmán JL, Domínguez C, Pérez MC, Prieto R. Effects of season and feeding level on reproductive activity and semen quality in Payoya buck goats. Theriogenology 2009;71: 1316–25.

[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: Webb SM, Puig-Domingo M, Moller M, Pévet P, editors. Pineal Update. From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. PJD Publications Ltd; 1996. p. 295–300.

[13] Forcada F, Abecia JA, Lozano JM, Ferrer LM, Lacasta D. The effects on reproductive performance in the short and medium term of the combined use of exogenous melatonin and progestagen pessaries in ewes with a short seasonal anoestrous period. Vet Res Commun 1999;23:257–63.

[14] Hervieu J, Morand-Fehr P, Schmidely 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.

[15] Delgadillo JA, Carrillo E, Morán J, Duarte G, Chemineau P, Malpaux B. Induction of sexual activity of male creole goats in subtropical northern Mexico using long days and melatonin. J Anim Sci 2001;79:2245–52.

[16] Staples L, McPhee S, Reeve J, Williams AH. Practical applications for controlled release melatonin implants in sheep. In: Foldes A, Reiter RJ, editors. Advances in Pineal Research. 6th Edition, John Libbey & Co; 1991. p. 199–208.

[17] 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;93:478–86.

[18] Morand-Fehr P, Sauvant D. Alimentation des caprins. In: Alimentation des Bovins, Ovins et Caprins, Jarrige R (Ed.), INRA, 1988, pp. 281–304.

[19] Özsar S, Guven B, Çelebii M, Kalkandelen G, Van De Wiel DFM. Testosterone and LH concentrations in the male Angora goat during puberty. Anim Reprod Sci 1990;23:319–26.

[20] Terqui M, Thimonier J. Nouvelle méthode radioimmunologique rapide pour l' estimation du niveau de progestérone plasmatique. Application pour le diagnostic précoce de la gestation chez la brebis et la chèvre. CR Acad Sci Paris 1974;279:1109–12.

[21] Faure MO, Nicol L, Fabre S, Fontaine J, Mohoric N, McNeilly A, Taragnat C. BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary. J Endocrinol 2005;186:109–21.

[22] Zarazaga LA, Guzmán JL, Domínguez C, Pérez MC, Prieto R, Sánchez J. Effect of level of nutrition and time of birth on puberty of Payoya goat kids. Animal 2009;3:79–86.

[23] Delgadillo JA, Canedo GA, Chemineau P, Guillaume D, Malpaux B. Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male Creole goats in subtropical northern Mexico. Theriogenology 1999;52:727–37.

[24] 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;102:351–60.

[25] Barenton B, Ravault JP, Chabanet C, Daveau A, Pelletier J, Ortavant R. Photoperiodic control of growth hormone secretion on body weight. Domest Anim Endocrinol 1988;5:255–74.

[26] Argo CM, Smith JS, Kay RNB. Seasonal changes of metabolism and appetite in Soay rams. Anim Sci 1999;69:191–202.

[27] Walkden-Brown SW, Restall BJ, Scaramuzzi RJ, Martin GB, Blackberry MA. 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 Rumin Res 1997;26:237–50.

[28] Chemineau P, Malpaux B, Pelletier J, Leboeuf B, Delgadillo JA, Deletang F, et al. Emploi des implants de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maîtriser la reproduction saisonnière chez les ovins et les caprins. INRA Prod Anim 1996;9:45–60.

[29] Forcada F, Abecia JA, Zúñiga O, Lozano JM. Variation in the ability of melatonin implants inserted at two different times after the winter solstice to restore reproductive activity in reduced seasonality ewes. Aust J Agric Res 2002;53:167–73.

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

[31] Arendt J. Physiology of pineal: role in photoperiodic seasonal functions. In: Arendt J, editor. Melatonin and Mammalian Pineal Gland. Chapman and Hall; 1995. p. 110–58.

[32] Almeida OFX, Lincoln GA. Reproductive photorefractoriness in rams and accompanying changes in the patterns of melatonin and prolactin secretion. Biol Reprod 1984;30:143–58.

[33] Lincoln GA, Ebling FJP. Effect of constant-release implants of melatonin on seasonal cycles in reproduction, prolactin secretion and moulting in rams. J Reprod Fertil 1985;73:241–53.

[34] Forcada F, Zarazaga L, Abecia JA. 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 1995;43:1179–93.

[35] Pellicer-Rubio MT, Lebouf B, Bernelas D, Forgerit Y, Pougnard JL, Bonne JL, et al. Highly synchronous and fertile reproductive activity induced by the male effect during deep anoestrous in lactating goats subjected to treatment with artificially long days followed by a natural photoperiod. Anim Reprod Sci 2007;98: 241–58.

[36] Papachristoforou CC, Koumas A, Photiou C. Initiation of the breeding season in ewe lambs and goat kids with melatonin implants. Small Rumin Res 2007;73:122–6.

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

[38] Malpaux 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;122:269–78.

[39] McEvoy TG, Robinson JJ, Aitken RP, Robertson IS. Melatonin treatment of embryo donor and recipient ewes during anestrus affects their endocrine status, but not ovulation rate, embryo survival or pregnancy. Theriogenology 1998;49:943–55.

[40] Robinson JJ, Wigzell S, Aitken RP, Wallace JM, Ireland S, Robertson IS. The modifying effects of melatonin, ram exposure and plane of nutrition on the onset of ovarian activity, ovulation rate and the endocrine status of ewes. Anim Reprod Sci 1991;26:73–91.

Artículo 2: se corresponde con el objetivo 2:

Los días largos artificiales junto con la melatonina exógena y el contacto diario con machos, estimula la actividad ovárica y estral en hembras caprinas Mediterráneas.

Artificial long days in addition to exogenous melatonina and daily contact with bucks stimulate the ovarian and oestrous activity in Mediterranean goat females.

Luis Ángel Zarazaga, María Carolina Gatica, Irma Celi, José Luis Guzmán, Benoît Malpaux.

Animal (2011) 9:1414-1419.

Animal (2011), **5:9**, pp 1414–1419 © The Animal Consortium 2011
doi:10.1017/S1751731111000413

Artificial long days in addition to exogenous melatonin and daily contact with bucks stimulate the ovarian and oestrous activity in Mediterranean goat females

L. A. Zarazaga[1†], M. C. Gatica[1], I. Celi[1], J. L. Guzmán[1] and B. Malpaux[2]

[1]*Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819, Palos de la Frontera, Huelva, Spain;* [2]*Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux, Centre INRA de Tours, 37380 Nouzilly, France*

(Received 16 February 2011; Accepted 18 February 2011; First published online 23 March 2011)

One experiment was conducted to determine whether the treatment with artificial long days and exogenous melatonin can induce reproductive activity during spring (seasonal anoestrus) in Mediterranean goats that are in daily contact with bucks and whether this treatment causes a variation in the reactivation of the reproductive activity in the normal breeding season. The experiment started on 4 November 2005 and finished on 27 October 2006. Thirty-four adult and barren does were used, distributed into two groups balanced according to their live weight (LW) and body condition score (BCS). Seventeen females were exposed to long days (16 h of light/day) from 14 November 2005 to 20 February 2006. On 20 February, they received one s.c. melatonin implant (LD-M group) and were exposed to natural photoperiodic changes in an open shed. The other females during the experiment were placed in an open shed under natural photoperiod and remained as the control group (C group). The C and LD-M groups were keeping in contact with males during the whole experiment. During the experiment, the LW, BCS and plasma progesterone concentrations were measured weekly, oestrous activity was tested daily using entire aproned bucks, and ovulation rate was evaluated by laparoscopy 7 days after positive identification of the oestrus. A clear treatment–time interaction was observed for plasma progesterone concentrations ($P < 0.001$), with a period of high progesterone concentrations during the natural seasonal anoestrus in the LD-M group. Although 94.1% of females in the LD-M group presented ovarian activity during this period, no female in group C did. Resumption of ovarian activity in the subsequent natural breeding season was 2 weeks later in the LD-M group in comparison with group C ($P < 0.05$). We can conclude that in Mediterranean goat breeding systems, when females are in daily contact with bucks, the treatment with 3 months of long days and melatonin implant at the end of the light photoperiodic treatment can induce ovarian and oestrous activity during the seasonal anoestrus. Finally, this treatment causes a short delay in the subsequent reactivation of ovarian activity in the natural breeding season.

Keywords: goat, seasonality, photoperiod, melatonin

Implications

We have demonstrated that melatonin implants inserted around the spring equinox are able to induce reproductive activity in Mediterranean goats that are in daily contact with bucks. This work tries to confirm that those treatments that include exogenous melatonin and that are associated to the male effect could in fact be applied without separation of the sexes. Isolation of males is a practice that implies a management more difficult of the animals and a higher availability of equipment at the farms.

† E-mail: zarazaga@uhu.es

Introduction

Most breeds of sheep and goats from temperate latitudes and some either from or adapted to subtropical latitudes exhibit seasonal variations of sexual activity (Chemineau *et al.*, 1992a; Delgadillo *et al.*, 1999; Rivera *et al.*, 2003). The timing of reproductive seasonality in these small ruminants, as well as in most mammals, is controlled by photoperiod (Chemineau *et al.*, 1992b). Melatonin, the main secretory product from the pineal gland, is the neuroendocrine signal that transduces information about the environmental light received by the retina. This reproductive seasonality is a major limitation in farm animal species (Yeates, 1949).

Various treatments have been proposed to control the phenomenon, including male effect, melatonin, photoperiod or combinations. The seasonal variation in reproductive activity observed under natural conditions is profoundly altered when animals are subjected to alternations of 3 months of long days and 3 months of short days. Under these conditions, the sexual activity of males and females was shown to peak during short days (Chemineau *et al.*, 1988; Delgadillo *et al.*, 2000; Delgadillo *et al.*, 2004). Under field conditions, the long-day part of the treatment is easy to apply, as extra illumination can be provided indoors or outdoors.

Exogenously administered melatonin from continuous slow-release implants has been shown to advance the onset of the breeding season in goat males and females by mimicking the stimulatory effect of short days (Chemineau *et al.*, 1992b; Zarazaga *et al.*, 2009a). Traditionally, in Mediterranean latitudes, exogenous melatonin treatment is implanted around the spring equinox and accompanied by a prior separation of males and females for 45 days, inducing a male effect to optimise the response during the anoestrous period, obtaining a higher synchronisation at mount. This isolation between males and females has been assumed to be necessary for the male effect to successfully induce ovulation (for details, see review Delgadillo *et al.*, 2009). However, this isolation implies a management more difficult of the animals and a higher availability of equipment at the farms.

This study therefore had a double aim. The first part was to determine whether following a treatment with long days from the second fortnight of November to late February, followed by a melatonin implant, is effective in stimulating reproductive activity in female goats that are in daily contact with bucks during the seasonal anoestrus (short-term effect). The second part was to determine whether this treatment causes a variation in the reactivation of reproductive activity in the subsequent natural breeding season (medium-term effect).

Material and methods

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 on an experimental farm (latitude 37°15′) of the University of Huelva, which meets the requirements of the European Community Commission for Scientific Procedure Establishments (1986). Thirty-four adult and non-pregnant female Payoya goats between 1.5 and 4 years old at the beginning of the experiment, which had kidded at least 5 months previously, were used.

The experiment started on 4 November 2005 and finished on 27 October 2006. During the whole experiment, animals were maintained under intensive management and were fed daily with lucerne hay, barley straw *ad libitum* and commercial concentrate, according to the INRA standards (Morand-Fehr and Sauvant, 1988), to maintain adult weight or allow growth in younger females throughout the experiment. The concentrate was a commercial mixture of maize (26.3%), bean (20%), oats (14.1%), cottonseed (13.7%), pea (13.4%), lupin (7.3%), barley (0.2%), wheat (0.2%), sunflower seeds (0.2%) and a commercial concentrate as mineral–vitamin complement (4.6%). All animals had free access to water and mineral blocks containing trace elements and vitamins.

Experimental design

Females were distributed at random into groups balanced according to their live weight (LW), body condition score (BCS) and age. The control group (C, $n = 17$) was kept in a communal yard with an uncovered area and without any supplementary light throughout the experiment. From 14 November 2005 until 20 February 2006, 17 does (LD-M group) were placed in a light-proof building and exposed to long days (16 h light: 8 h dark; lights on 0600 h: lights off 2200 h). The photoperiod was regulated by an electric timer that controlled white fluorescent strip lights providing approximately 200 lux at the goats' eye level during the light phase, and a ventilator system was used for air renewal.

On 20 February, photoperiodic-treated females (LD-M group) were re-exposed to the natural variations in day length and received one subcutaneous melatonin implant, which contained 18 mg of the hormone (Melovine®, CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain) at the base of the left ear. At this moment, the LD-M group was kept in the same communal yard as the C group.

To avoid a possible male effect that could modify the reproductive activity in experimental does, before the onset of the experiment, 12 bucks were allocated close to them in a separate barn. Seven of them were treated similarly to treated females (long days and melatonin) and five were not treated (Zarazaga *et al.*, 2010). The photoperiodic treatment of the males was simultaneous to that of the females. For this reason, during the photoperiodic treatment of the LD-M group, it was in contact with the treated males but in a separate barn.

Measurements

Oestrous activity was tested daily using aproned bucks. From 4 November 2005 until the end of the experiment, males were introduced in pairs during at least 30 min, at 0900 h, into the experimental female groups (LD-M and C groups) for three consecutive hours. During the rest of the day, bucks were isolated in their barn but remained close to the females. Females standing at mounting by the male were considered in oestrus. Ovulation rate was evaluated by laparoscopy 7 days after positive identification of the oestrus. The goats received a sedative intramuscular injection (Rompun®, Bayer, Spain) prior to laparoscopy. During laparoscopy, the animals were placed in dorsal recumbency on a cradle at a 45° angle. A 7-mm laparoscope (Karl-Storz, Tuttlingen, Germany) was used for visualisation, and the ovaries were exposed by pulling the fimbria in different directions with atraumatic forceps. In order to determine the occurrence of silent ovulations and to confirm ovarian activity, blood samples were collected weekly from each animal by jugular venipuncture and assayed for progesterone. Immediately after collection, samples were centrifuged

and plasma was stored at −20°C until assay. LW and BCS were recorded weekly by the same handler (Hervieu *et al.*, 1991).

Plasma progesterone concentrations were assayed by radioimmunoassay, using the technique described by Terqui and Thimonier (1974). The sensitivity of the assay was 0.125 ng/ml. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 7.0% and 1.6%, respectively.

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

Definitions of reproductive activity

The non-breeding season (seasonal anoestrus) and the natural breeding season were defined according to the results obtained at the same latitude and with a similar method by Zarazaga *et al.* (2005) and Zarazaga *et al.* (2009b). The reproductive activities measured during the non-breeding season induced by the treatment were: the first ovulatory activity, the first oestrus, the last ovulatory activity, the last oestrus, the length of the cyclic ovulatory activity and the length of the cyclic oestrus activity. The reproductive activities at the reactivation of reproductive activity in the natural breeding season were: the first ovulatory activity and the first oestrus.

Ovulatory activity was confirmed when two or more consecutive plasma samples had progesterone concentrations above baseline (0.5 ng/ml; Zarazaga *et al.*, 2009b) with subsequent cyclicity. For each goat, the date of the last plasma progesterone value below baseline, which was followed by the first extended cyclic pattern, was taken as the onset of ovulatory activity. Cessation of ovulatory activity was considered to have occurred when three or more consecutive plasma samples had concentrations below baseline. The date of the first plasma progesterone value below baseline at the completion of the last ovarian cycle, according to the progesterone pattern, was taken as the end of ovulatory activity.

Sexual activities observed during the experiment were grouped as (i) oestrous cycle, when detected oestrous behaviour was accompanied by a later increase in plasma progesterone levels above 0.5 ng/ml; (ii) ovulatory activity, when an increase in plasma progesterone levels above 0.5 ng/ml in at least two consecutive samples occurred but was not preceded by detected oestrous behaviour (silent ovulation) and (iii) ovulation rate of each detected cycle.

Statistical analysis

The effect of the treatment and time on LW, BCS and progesterone was analysed using an analysis of variance for repeated measures. Daily changes of LW or monthly changes of BCS were calculated for each goat, and differences between groups were analysed by one-way ANOVA. The date of the first detected oestrus or first ovulatory activity induced by the treatment during the seasonal anoestrus, and the date of the first detected oestrus or the first ovulatory activity in the natural breeding season were determined for each goat. The one-way ANOVA was used to evaluate the effect of treatment on these reproductive parameters. The ovulation rate of each detected oestrus in each period (seasonal anoestrus and natural breeding season) was compared using a non-parametric *t*-test (the Mann–Whitney *U*-test). The incidence of ovarian activity and oestrus induced after the melatonin implant insertion detected during the seasonal anoestrus or during the natural breeding season was compared between groups, using the χ^2 test.

To study the effect of LW or BCS on ovulation rate at each detected oestrus, females were divided into groups depending on their LW at each oestrus: group 1 (LW $\leqslant$ 50 kg) and group 2 (LW $>$ 50 kg), or depending on their BCS at the same time: group A (BCS $\leqslant$ 2.50) and group B (BCS $\geqslant$ 2.75). They were compared using a non-parametric *t*-test (the Mann–Whitney *U*-test).

Differences were considered significant at $P < 0.05$. Analysis of data was computed using the SPSS package (Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), 2006).

Results

Effect of treatment on LW and BCS

The statistical analysis for repeated measures showed a clear effect of time ($P < 0.001$) on LW (Figure 1a). Moreover, a significant interaction of time–treatment was observed for LW ($P < 0.05$). The LD-M group clearly increased their LW during the photoperiodic treatment from November to February, with a mean LW gain of 53.9 ± 7.7 g/day; however, during this period the C group had a mean LW gain of 27.4 ± 8.0 g/day ($P < 0.05$). In April, the treated group had losses in LW, and the C group continued with a slight increase in LW (−25.5 ± 11.3 g/day *v.* 19.9 ± 10.7 g/day, for the LD-M and C groups, respectively, $P < 0.01$). Finally, until the end of the experiment, both groups had a relatively stable LW.

Similarly, the statistical analysis for repeated measures showed a clear effect of time ($P < 0.001$) on BCS (Figure 1b), with a marked decrease from the start of the experiment (2.66 ± 0.06) until the end (2.33 ± 0.07). However, no effect of treatment or interaction of time and treatment was observed for this variable.

Effect of treatment on the end of the breeding season

Figure 2 shows the changes in progesterone concentrations during the experiment. A clear effect of time and a treatment–time interaction ($P < 0.001$) was shown. However, no effect of treatment was observed on this variable. The progesterone concentrations in the LD-M group decreased earlier than in the control group. From 6 January 2006 to 3 February 2006, the progesterone concentrations in the C group were higher than in the LD-M group (with differences of at least $P < 0.05$). This reveals significant differences between groups at the onset of the reproductive rest (Table 1).

Effect of treatment during the seasonal anoestrus

The concentrations of progesterone in the two groups were similar until 14 April 2006, when the concentrations for the LD-M group began to rise, whereas the concentrations of the C group remained at basal levels until 2 June 2006 (with differences of at least $P < 0.05$; Figure 2). Progesterone concentrations rose above baseline 46.9 ± 2.4 days following

implant insertion. The mean duration of the ovarian activity induced by the treatment was 55.1 ± 5.9 days. Any female in the control group showed ovarian activity during this period of the natural seasonal anoestrus. Furthermore, the treated group was characterised by 94.1% of the animals presenting ovarian activity in response to the treatment used (Figure 3).

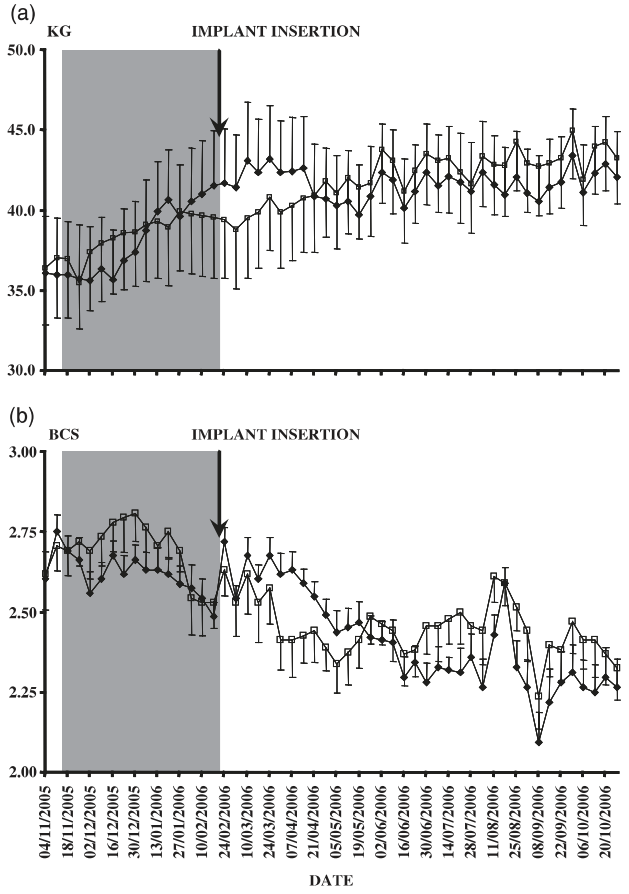


Figure 1 Weekly means (±s.e.m.) for live weight (a) and body condition score (b) of Mediterranean goat females subjected to natural changes in day length (C group, □) or artificial long days from 14 November 2005 to 20 February 2006, and then treated with one s.c. melatonin implant (LD-M group, ◆). The shaded area indicates the duration of the long-day treatment.

During this period, no oestrous activity was observed in the C group, despite the animals being in contact with those of the LD-M group and bucks. However, in the LD-M group, 88.2% of the animals showed oestrous activity (Figure 3). The ovulation rate of the first detected oestrus in the LD-M group was 1.93 ± 0.20 corpora lutea.

Effect of treatment on the natural breeding season

The C group resumed the natural breeding season (ovarian activity) at an earlier date than was observed for the LD-M group ($P < 0.05$; Table 1). During the reactivation of the natural breeding season, only on 1 September were there differences between groups in progesterone concentrations.

No differences between groups were observed on the reactivation of the oestrous activity (Table 1) or the ovulation rate for the first oestrus (1.82 ± 0.3 *v.* 1.60 ± 0.1 corpora lutea for the LD-M and C groups, respectively). Similarly, no effect or interaction between treatment and the categories of LW or BCS was observed.

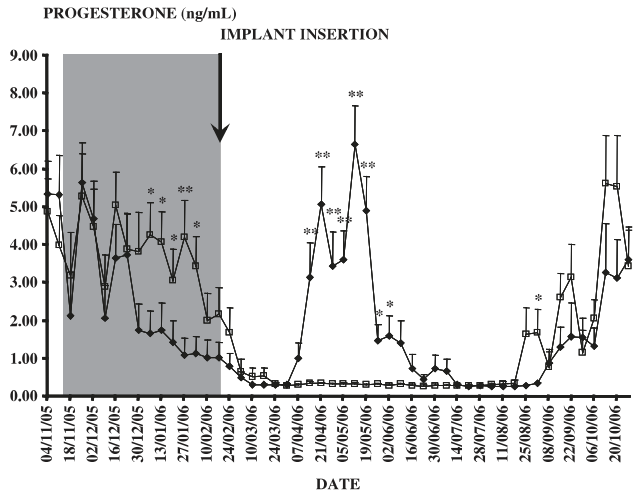


Figure 2 Weekly means (±s.e.m.) of progesterone concentrations (ng/ml) of Mediterranean goat females subjected to natural changes in day length (C group, □) or artificial long days from 14 November 2005 to 20 February 2006, and then treated with one s.c. melatonin implant (LD-M group, ◆). The shaded area indicates the duration of the long-day treatment. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

Table 1 *Mean (±s.e.m.) date of the onset of the reproductive rest, the first ovarian activity, the first oestrus and last ovarian activity after the treatment and date of the first ovarian activity and the first oestrus of the natural breeding season in Mediterranean goat females subjected to artificial long days from 14 November 2005 to 20 February 2006 and then treated with s.c. melatonin implants (LD-M group) or in goats subjected to natural changes in day length (C group)*

		After treatment			Natural breeding season	
Variable	Onset of reproductive rest	First ovarian activity	First oestrus	Last ovarian activity	First ovarian activity	First oestrus
LD-M group ($n = 17$)	8 January 2006 (±9.0 days)[a]	7 April 2006 (±2.4 days)	11 April 2006 (±2.5 days)	2 June 2006 (±4.6 days)	22 September 2006 (±4.5 days)[A]	28 September 2006 (±6.1 days)[A]
C group ($n = 17$)	18 February 2006 (±4.9 days)[b]				8 September 2006 (±4.9 days)[B]	18 September 2006 (±5.2 days)[A]

Values with different letters in the same column (a, b) are significantly different at $P < 0.001$.
Values with different letters in the same column (A, B) are significantly different at $P < 0.05$.

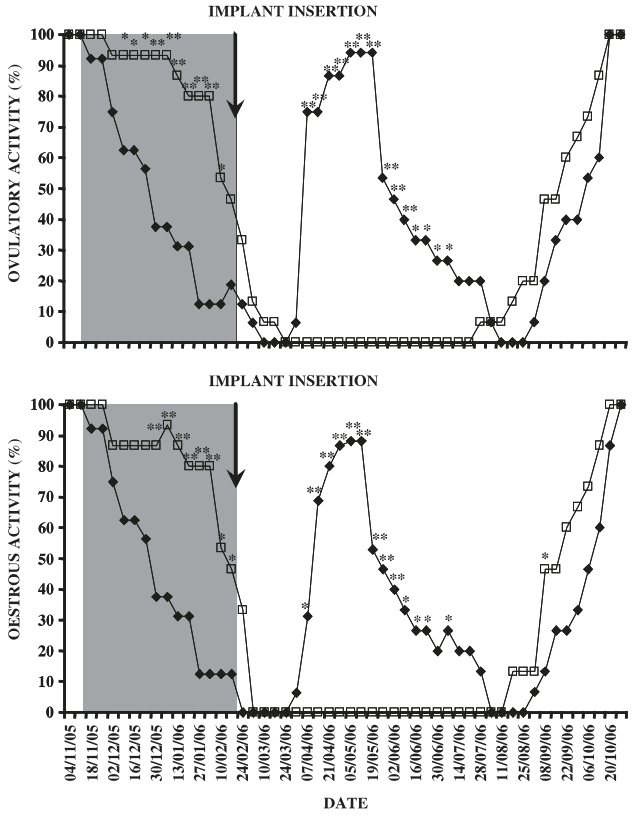


Figure 3 Percentages of Mediterranean goat females showing reproductive activity: ovarian activity (top) or oestrous activity (bottom) subjected to natural changes in day length (C group, □) or artificial long days from 14 November 2005 to 20 February 2006, and then treated with one s.c. melatonin implant (LD-M group, ◆). The shaded area indicates the duration of the long-day treatment. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$.

Discussion

This study demonstrated that, in Mediterranean goat females, the treatment associating 3 months of long days and exogenous melatonin and daily contact with bucks is able to induce reproductive activity during the natural seasonal anoestrus (short-term effect). During this period, none of the females from the control group was stimulated by contact with the treated females or with males. Finally, this treatment induces a slight retardation in the onset of ovarian activity in the natural breeding season (medium-term effect). In the two cases (short- and medium-term effect), the reproductive activity or the ovulation rate was not influenced by LW or the BCS.

As has been described by our group in other experiments, a pattern of LW changes, associated with reproductive activity, was observed in all groups, despite the fact that the animals were fed to maintain their LW; such variations in LW have been reported previously in this species (Zarazaga *et al.*, 2005). The changes occurred differently between the LD-M and C groups, due to the photoperiodic-melatonin treatment. The increase in LW in the LD-M group following the long-day treatment could be due to a direct effect of the long-day treatment, probably by increasing the food intake (Barenton *et al.*, 1988). After, the LW decrease in the same group was probably due to the greater activity of animals as a consequence of the sexual activity induced (Walkden-Brown *et al.*, 1997), and/or due to the decrease in food intake mediated by melatonin (Argo *et al.*, 1999; Marie *et al.*, 2001).

The treatment with photoperiod establishes that the LD-M group started the induced seasonal reproductive rest (ovarian and oestrous activity) before the C group, indicating that photoperiod controls reproductive activity.

The date of the start of the treatment-induced reproductive activity during the seasonal anoestrous demonstrates the effectiveness of inserting melatonin implants after a photoperiodic treatment of 3 months of long days at Spanish latitudes in goats in daily contact with bucks. Similar results have been observed by our group following the insertion of exogenous melatonin implant around the spring equinox, without a previous long-day treatment (Zarazaga *et al.*, 2009a). However, it will be necessary to study the oestrus/ovulatory response to the LD-M treatment in entire females isolated from males and in contact with males to confirm that the presence of males did not modify the response to the LD-M treatment in entire females. Véliz *et al.* (2006) suggest that previous isolation of seasonally anovulatory does from bucks to stimulate their reproductive activity by the male effect is unnecessary if sexually active bucks are introduced to them. With regard to the results obtained at Mediterranean latitudes, this assumption might not be applicable, because in our experiment none of the control females showed oestrous activity although the males were sexually active, as they were treated similarly to females (Zarazaga *et al.*, 2010). Another factor that can stimulate the reproductive activity in non-treated females is the presence of females in oestrus. In a study by Walkden-Brown *et al.* (1993), 87% of goats responded to the male effect when oestrous females were present at the time of male introduction *v.* 72% in their absence. In fact, the presence of only a few oestrous ewes or goats may induce sexual activity in the rest of the females, even in the absence of any male (Bouillon *et al.*, 1982; Restall *et al.*, 1995). However, in our study, no control female showed oestrous or ovarian activity independent of the fact that they were in contact with males or stimulated females.

Together with the data obtained by our group using a treatment with melatonin implants (Zarazaga *et al.*, 2009a), our findings are, as far as we are aware, the first of this type observed in melatonin-implanted goats, because the male effect is a normal practice when melatonin implants are used. The only results in the bibliography, from a similar study of the effectiveness of melatonin implants without separation of the males, are those obtained in ewes (Forcada *et al.*, 1995). The treated ewes showed no reproductive activity during the seasonal anoestrus (the melatonin implants were inserted later than in our experiment); they did, however, exhibit an earlier onset of the natural breeding season.

The reactivation of the ovarian activity, according to the progesterone concentrations, in the natural breeding season in the treated females was later than in the control group. To our knowledge, no data exist about the medium-term effect

of this treatment in goats. However, in bucks, the differences between groups are similar to those described by Delgadillo *et al.* (2001) working with Creole bucks at subtropical latitudes, and by Guzmán *et al.* (2008) working at the same latitude and with a similar treatment to that used in this experiment. The reason for the difference in the onset of reproductive activity between groups treated with melatonin after the long-day treatment or those exposed to natural photoperiod was probably the exhaustion of the melatonin implant, which delayed perception of the natural long days. Indeed, the increasing photoperiod between the winter and the summer solstices has a critical role in the regulation of the onset of the breeding season (Malpaux *et al.*, 1989).

In conclusion, the results of this experiment indicate first that photoperiodic-melatonin treatment is able to induce reproductive activity during the seasonal anoestrus of goats with daily contact with males; second, the results suggest that at Mediterranean latitudes the use of sexually active males or contact between reproductively active (treated females) and non-active females (control females) does not stimulate reproductive activity in non-treated does; and finally, this treatment induces a slight delay in the onset of the natural breeding season in the treated females, because only the onset of ovarian activity was modified.

Acknowledgements

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. This work was supported by Grant PETRI 95-0964.OP from C.I.C.Y.T. (Spain). The authors are grateful to CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain for providing Melovine® implants. 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

Argo CM, Smith JS and Kay RNB 1999. Seasonal changes of metabolism and appetite in Soay rams. Animal Science 69, 191–202.

Barenton B, Ravault JP, Chabanet C, Daveau A, Pelletier J and Ortavant R 1988. Photoperiodic control of growth hormone secretion on body weight. Domestic Animal Endocrinology 5, 247–255.

Bouillon J, Lajous A and Fourcaud P 1982. Mise en évidence d'un effet chèvres induites, comparable à l'effet bouc chez les caprins. 7èmes Journées de la Recherche Ovine et Caprine, INRA-ITOVIC-SPEOC, Paris, 325–333pp.

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

Chemineau P, Malpaux B, Delgadillo JA, Guerin Y, Ravault JP, Thimonier J and Pelletier J 1992b. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. Animal Reproduction Science 30, 157–184.

Chemineau P, Pelletier J, Guérin Y, Colas G, Ravault JP, Touré G, Almeida G, Thimonier J and Ortavant R 1988. Photoperiodic and melatonin treatments for the control of seasonal reproduction in sheep and goats. Reproduction Nutrition Development 28, 409–422.

Delgadillo JA, Cortez-López ME, Duarte G and Malpaux B 2000. El fotoperiodo modifica la actividad sexual de los machos cabríos Criollos del subtrópico Mexicano. XLIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas y 20° Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas, Cancún, Quintana Roo, Mexico, C 191.

Delgadillo JA, Canedo GA, Chemineau P, Guillaume D and 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, Cortez MA, Duarte G, Chemineau P and Malpaux B 2004. Evidence that the photoperiod controls the annual changes in testosterone secretion, testicular and body weight in subtropical male goats. Reproduction Nutrition Development 44, 183–193.

Delgadillo JA, Gelez H, Ungerfeld R, Hawken PAR and Martin GB 2009. The 'male effect' in sheep and goats-revisiting the dogmas. Behavioural Brain Research 200, 304–314.

Delgadillo JA, Carrillo E, Morán J, Duarte G, Chemineau P and 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.

Forcada F, Zarazaga L and 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.

Guzmán JL, Gatica MC and Zarazaga LA 2008. Reactivation of sexual activity in Mediterranean bucks after a treatment with artificial long days and exogenous melatonin during seasonal anoestrous. 9th International Congress of the Spanish Association of Animal Reproduction. Gijón, Spain. Reproduction in Domestic Animal 43, 78pp.

Hervieu J, Morand-Fehr P, Schmidely Ph, Fedele V and 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.

Malpaux B, Robinson JE, Wayne NL and 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.

Marie M, Findlay PA, Thomas L and Adam CL 2001. Daily patterns of plasma leptin in sheep: effects of photoperiod and food intake. Journal of Endocrinology 170, 277–286.

Morand-Fehr P and Sauvant D 1988. Alimentation des caprins. In Alimentation des Bovins, Ovins et Caprins (ed. R Jarrige), pp. 281–304. INRA, Paris.

Restall BJ, Restall H and Walkden-Brown SW 1995. The induction of ovulation in anovulatory goats by oestrous females. Animal Reproduction Science 40, 299–303.

Rivera GM, Alanis GA, Chaves MA, Ferrero SB and Morello HH 2003. Seasonality of estrus and ovulation in Creole goats of Argentina. Small Ruminant Research 48, 109–117.

Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 2006. Manual del Usuario Version 15.0, pp. 779. SPSS Inc., Chicago.

Terqui M and Thimonier J 1974. Nouvelle méthode radioimmunologique rapide pour l'estimation du niveau de progestérone plasmatique. Application pour le diagnostic précoce de la gestation chez la brebis et la chèvre. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris 279, 1109–1112.

Véliz FG, Poindron P, Malpaux B and Delgadillo JA 2006. Maintaining contact with bucks does not induce refractoriness to the male effect in seasonally anestrous female goats. Animal Reproduction Science 92, 300–309.

Walkden-Brown SW, Restall BJ and Henniawati 1993. The male effect in the Australian cashmere goat. 3. Enhancement with buck nutrition and use of oestrous females. Animal Reproduction Science 32, 69–84.

Walkden-Brown SW, Restall BJ, Scaramuzzi RJ, Martin GB and 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.

Yeates NTM 1949. The breeding season of the sheep with particular reference to its modification by artificial means using light. Journal of Agricultural Science 39, 1–43.

Zarazaga LA, Guzmán JL, Domínguez C, Pérez MC and 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 and Malpaux B 2009a. Effect of melatonin implants on sexual activity in Mediterranean goat females without separation from males. Theriogenology 72, 910–918.

Zarazaga LA, Guzmán JL, Domínguez C, Pérez MC, Prieto R and Sánchez J 2009b. Nutrition level and season of birth do not modify puberty of Payoya goat kids. Animal 3, 79–86.

Zarazaga LA, Gatica MC, Celi I, Guzmán JL and Malpaux B 2010. Effect of artificial long days and/or melatonin treatment on the sexual activity of Mediterranean bucks. Small Ruminant Research 93, 110–118.

Artículo 3: se corresponde con el objetivo 3:

Los días largos artificiales y el contacto diario con machos cabríos provoca actividad ovárica pero no actividad estral durante el periodo de anestro estacionario en hembras caprinas Mediterráneas.

Artificial long days and daily contact with bucks induce ovarian but not oestrous activity during the non-breeding season in Mediterranean goat female.

Luis Ángel Zarazaga, María Carolina Gatica, Irma Celi, José Luis Guzmán, Benoît Malpaux.

Animal Reproduction Science (2011) 125:81-87.

Animal Reproduction Science 125 (2011) 81–87

Contents lists available at ScienceDirect

Animal Reproduction Science

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

Artificial long days and daily contact with bucks induce ovarian but not oestrous activity during the non-breeding season in Mediterranean goat females

L.A. Zarazaga [a,*], M.C. Gatica [a], I. Celi [a], J.L. Guzmán [a], B. Malpaux [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 INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux, Centre INRA de Tours, 37380 Nouzilly, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 September 2010
Received in revised form 14 February 2011
Accepted 23 February 2011
Available online 9 March 2011

Keywords:
Goat
Seasonality
Photoperiod
Oestrous activity
Luteal activity

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine whether a treatment of 3 mo of artificial long days and daily contact with bucks can stimulate reproductive activity during the normal seasonal anoestrous in female goats, and whether such treatment modifies the onset of the normal breeding season. Thirty-nine adult, open does were assigned to two treatments of similar mean body weight (BW) and body condition score (BCS). One treatment (LD; $n = 18$) was housed in a light-proof building and exposed to long days (16 h of light/d) from 17 November to 5 February, and then exposed to the natural photoperiod in an open shed. The remaining females were housed in an open shed under natural photoperiod conditions throughout the experiment (control [C]; $n = 21$). Plasma samples for progesterone, BW and BCS were recorded every wk. Oestrous activity was checked daily using aproned bucks. Bucks were housed close to females in a separate barn from the onset of the experiment. Ovulation rate was determined by laparoscopy 7 d after positive identification of oestrus. The interaction of treatment by time for temporal concentrations patterns of progesterone concentrations indicated that luteal activity in LD does were greater ($P < 0.001$) than those of C does during the natural seasonal anoestrous season. None of the C does exhibited oestrous or luteal activity during the non-breeding season; whereas, 72% of LD does exhibited luteal activity only 33% of them showed oestrous activity and during this season ($P < 0.01$). Differences in resumption of the oestrous or luteal activity were not observed ($P > 0.05$) in the subsequent breeding season between treatments. In conclusion, 3 mo of exposing does to long days and daily contact with bucks during the breeding season appears to stimulate reproductive processes that normal would not occur during the anoestrous season. However, this treatment does not induce oestrus is adequate numbers of does to be of practical value. Finally, this treatment does not modify the onset of the subsequent natural breeding season.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Seasonal changes in reproductive activity are accompanied by variations in the availability of milk or meat over the year. Out-of-breeding-season reproduction is attractive as a means of ensuring milk and meat production throughout the year in accordance with commercial needs and consumer expectations. To induce such reproductive activity, producers are moving towards practices that reduce or dispense with the use of synthetic chemicals and hormone treatments and that do not compromise animal welfare (Martin et al., 2004). Strategies such as the male effect or photoperiod treatments to control the timing of reproductive events have been proposed in order to attain the

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

0378-4320/$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.anireprosci.2011.02.029

partial reduction or elimination of exogenous hormone use (Pellicer-Rubio et al., 2007).

Since the seasonality of reproduction is under photoperiod control (Bittman et al., 1983), reproduction during seasonal anoestrus can be achieved by artificially altering photoperiods (Chemineau et al., 1986, 1988, 1999; Delgadillo et al., 2002; Zarazaga et al., 2009a, 2011). Treatments involving artificial photoperiods are based on the alternation of long and short days. Animals are first subjected to long days for 2.5–3 mo to prepare them to respond to the stimulatory effects of subsequent short days (Chemineau et al., 1986, 1988; Malpaux et al., 1989). Under field conditions, long days can easily be provided by extra illumination either indoors or outdoors, and the effects of short days can be induced with melatonin implants or natural short days. In the subtropics, photoperiodic treatment based on artificial long days alone, without the use of melatonin, has been successful in inducing sexual activity in male goats (Delgadillo et al., 2002).

Treatments that use artificial photoperiods usually require the use of additional natural methods based on the manipulation of the sociosexual structure of the group; namely, introduction of a male into a group of females that had been previously isolated from males (Chemineau, 1987; Ungerfeld et al., 2004). Isolating males from females is difficult to accomplish due to management considerations and availability of necessary equipment on farms. Véliz et al. (2006) showed that, at subtropical latitudes, previous isolation of seasonally anovulatory goats from the bucks is not a requisite to obtain stimulation of their reproductive activity by the male effect as long as novel, sexually active bucks are introduced to them.

There are very few reports on the use of artificial long days without separation from males on the reproductive activity of females Mediterranean goats. We thus tested the hypothesis that a period of breeding activity (oestrous and luteal activity) of Mediterranean goat females that are in daily contact with bucks can be induced during the natural seasonal anoestrus using 3 mo of long days during the breeding season (short-term effect). And whether, this treatment causes a variation in the reactivation of reproductive activity in the subsequent natural breeding season (medium-term effect).

2. Materials and methods

2.1. Animals

All animal handling and experimental procedures were performed by trained personnel in strict accordance with Spanish guidelines (which conform to European Union Directive 86/609) for the protection of experimental animals (RD 1201/2005).

The study was conducted at the University of Huelva (Spain) experimental farm (latitude 37°12′N; longitude 6°54′W), which meets the requirements of the European Community Commission for Scientific Procedures Establishments (1986). The experimental animals were intact, non-pregnant, adult, Payoya female goats, all of which had kidded at least 5 months before the start of the study. These does were allocated to two treatments to achieve a similar mean body weights (BW) and body condition score (BCS) (Hervieu et al., 1991). Does in the control treatment (C; $n = 21$) were kept in a communal, uncovered yard with no supplementary light throughout the experiment. The remaining 18 entire does (LD) were housed in a light-proof building and exposed to artificial long days for 80 d beginning on November 17 (16 h light: 8 h dark; lights on 06:00 h: lights off 22:00 h). The duration and the moment of the light treatment was defined according to previous results that indicate the efficacy of this treatment in male goats (Delgadillo et al., 2002). Light was provided by white florescent strip lights, controlled by an electric timer. These provided approximately 200 lux at goat eye level during the light phase. A ventilator system was used for air renewal. The non-breeding season and the normal breeding season were defined according to Zarazaga et al. (2005).

On February 5, LD does were re-exposed to natural light variations and kept in the same communal yard as C does until the end of the experiment on October 26 of the following fall. During the entire experiment, animals were maintained under intensive management and were fed daily with lucerne hay, barley straw and commercial concentrate, according to INRA standards (Morand-Fehr and Sauvant, 1988), to maintain BW. The concentrate was a commercial mixture of maize (26.3%), bean (20%), oats (14.1%), cotton-seed (13.7%), pea (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.

2.2. Management

To avoid a male effect that might modify the reproductive activity of the does, bucks were housed close to them in a separate barn separated by a fence before the onset of the experiment. Twelve entire bucks were used for this purpose. Six were not treated and the other six received three subcutaneous melatonin implants, each containing 18 mg of the hormone (Melovine®, CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain) after a treatment with 80 d of artificial long days beginning on November 17. The photoperiod regime was simultaneous with the LD does. The reason was to ensure that the LD does maintained contact with bucks during the artificial photoperiod regime and to enhance the reproductive behaviour of the bucks during the seasonal anoestrus (Zarazaga et al., 2010).

Oestrous activity was checked daily between November 6 until the end of the experiment by introducing aproned bucks to LD and C does. This was performed by introducing two bucks – one treated and one non-treated – simultaneously at 09:00 h for at least 30 min. This pair of bucks was then removed and a second pair introduced, until six pairs had been introduced to the females (total buck–doe contact time = 3 h). For the rest of the day bucks were isolated in their barn. Does that remained standing when a buck tried to mount, were deemed to be in oestrus. Ovulation rate was assessed by laparoscopy 7 d after oestrus.

2.3. Sampling and hormone assays

Blood samples were collected weekly from each doe by jugular venipuncture and assayed for progesterone to determine the occurrence of ovulations in the absence of oestrous behaviour and to confirm luteal activity. Immediately after collection, plasma was separated and stored at −20 °C until later use. Body weight and BCS (Hervieu et al., 1991) from each doe were assessed weekly by the same handler.

Concentration of plasma progesterone was determined by radioimmunoassay, using the technique described by Terqui and Thimonier (1974). The sensitivity of the assay was 0.125 ng/mL. The intra- and interassay CV were 8.1% and 2.1% respectively. All hormonal analyses were performed at the INRA (Nouzilly, France) hormonal analysis laboratory.

2.4. Definitions of reproductive activity

Photoperiod treatment-induced reproductive activity during the natural non-breeding season at this latitude (spring) was deemed to have begun when does exhibited their first oestrus or luteal phase. Reactivation of oestrous activity and luteal activity in the normal breeding season (autumn) was defined in a similar manner. The duration of anoestrus for each LD doe was defined as the number of days between the last detected oestrus induced by the treatment and the first detected oestrus of the following season, or the last ovulation induced by the treatment and the first ovulation of the following breeding season. The duration of anoestrus for each C doe was defined as the number of days between the last detected oestrus and the first detected oestrus of the following breeding season, while the anovulatory season was defined as the time between the last ovulation of the previous breeding season and the first ovulation of the following season (Chemineau et al., 1992).

Luteal activity was confirmed when two or more consecutive plasma samples showed progesterone concentrations above baseline (0.5 ng/mL; Zarazaga et al., 2009c) with subsequent cyclicity. For each doe, the onset of luteal activity was taken as the date of the last plasma progesterone concentration below baseline that was followed by the first extended cyclic pattern. Cessation of luteal activity was considered to have occurred when three or more consecutive plasma samples had concentrations below baseline. The date of the first plasma progesterone concentration below baseline at the completion of the last extended cyclic progesterone pattern was taken as the end of luteal activity.

Variables associated with establishment of cyclicity included: (i) oestrous activity (oestrous behaviour accompanied by an increase in plasma progesterone concentrations above 0.5 ng/mL in at least two consecutive samples), (ii) luteal activity (with an increase in plasma progesterone concentrations above 0.5 ng/mL in at least two consecutive samples but not preceded by detected oestrous behaviour), and (iii) ovulation rate of each detected cycle of does that exhibited oestrus.

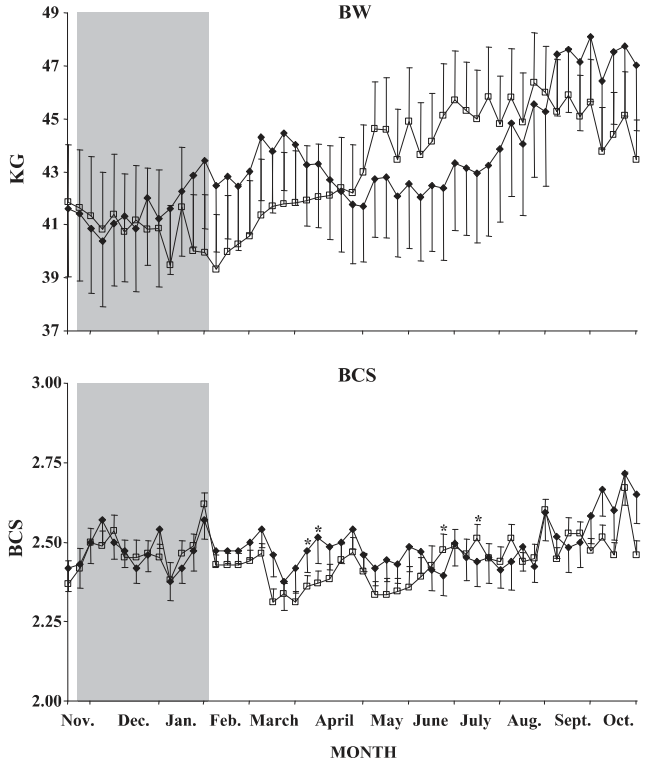


Fig. 1. Weekly means for body weight (BW) and body condition score (BCS) in Mediterranean does subjected to natural changes in day length (C treatment, □) or after exposure to 16 h photoperiod from November 17 to February 5 and then exposed to the natural photoperiod (LD treatment, ♦). The shaded area indicates the duration of the exposure to long days. Bars associated with means represent SE for each mean. Interaction of treatment by time ($P < 0.001$) for BW but not for BCS.

2.5. Statistical analysis

All calculations were made using SPSS software (SPSS, 2006). The effect of the treatment and time on BW, BCS and progesterone was analysed using repeated measures analysis with time (week) and treatments (LD and C treatment) as sources of variation. ANOVA was used to examine the effect of treatment on the date of the first detected oestrus, and the first luteal activity in the normal breeding season. The effect of treatment on ovulation rate of the first detected oestrus of the natural breeding season was compared using the Mann–Whitney *U*-test. The percentage luteal and oestrus activity detected in the two treatments during the natural breeding season was compared using the χ^2 test.

3. Results

3.1. Body weight and body condition score

There was a treatment by time interaction effect ($P < 0.001$) for changes in BW. Body weight increased slightly in LD does during the artificial long-day period; whereas, C does lost ($P < 0.01$) BW during this same period (Fig. 1). Thereafter, LD does experienced losses of BW (-56.7 ± 14.9 g/d) whereas the C does experienced gains in BW (24.3 ± 15.2 g/d) ($P < 0.001$). Finally, during the reactivation of reproductive activity in the normal breeding

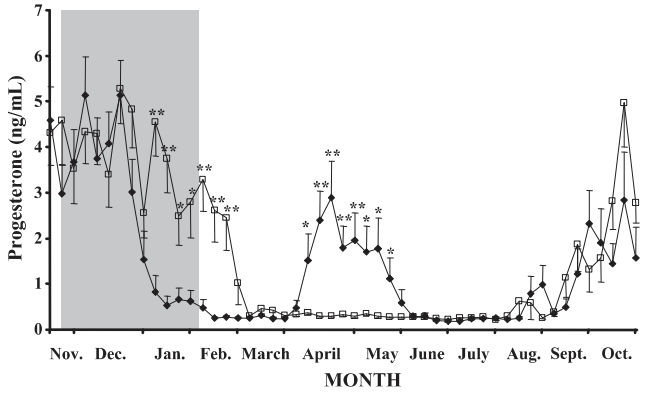


Fig. 2. Weekly mean concentration of plasma progesterone (ng/mL) in Mediterranean does subjected to natural changes in day length (C treatment, □) or after exposure to 16 h photoperiod from November 17 to February 5 and then exposed to the natural photoperiod (LD treatment, ♦). The shaded area indicates the duration of the exposure to long days. Bars associated with means represent SE for each mean. Interaction of treatment by time ($P < 0.001$) for progesterone concentrations ($^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$).

season (September) until the end of the experiment, the C does experienced losses of BW (−38.9 ± 12.8 g/d) whereas the LD does maintained their BW (−2.1 ± 8.2 g/d) ($P < 0.05$).

An effect of time ($P < 0.001$) was observed on BCS (Fig. 1). There was a slight decrease in both treatments one month after the end of the photoperiod protocol and a slight increase until the end of the experiment but neither treatment nor the interaction of treatment by time had any influence.

3.2. Plasma progesterone concentrations

Fig. 2 shows the changes in plasma progesterone concentrations and as a consequence the luteal activity. There was a treatment by time interaction effect ($P < 0.001$) for temporal concentration patterns. Progesterone concentration in LD does decrease earlier (13 January ± 5.4 d) than those in C does (21 February ± 4.6 d) and remained low in does of both treatments after late February until mid-April. The LD does showed higher progesterone concentrations during the seasonal anoestrus than C does. Progesterone concentrations rose in LD does 60.5 ± 4.4 d after the end of the artificial long days, and remained high until late May. Thereafter it decreased to baseline concentrations in LD does, however, in C does, remained at baseline concentrations during this time.

On the whole, more LD does (72%) (Fig. 3) exhibited luteal activity ($P < 0.05$) during a 50.6 ± 6.6-d period from early-April to late-May, whereas, none of the C does showed luteal activity during this time. However, the incidence of ovulation without oestrus was 54% for LD does that exhibited luteal activity. The incidence of short cycles (less than 16 d) during this period was 14.3% for the LD does.

Differences in the onset of the luteal activity, as measured by plasma concentrations of progesterone, were not observed between both treatments in the subsequent breeding season (September 18 ± 3.3, $P > 0.05$) when LD treated does were placed under natural photoperiod. Luteal quietude between last luteal phase at the end of the natural breeding season and the first of the next breeding season was longer ($P < 0.001$) in C (214.1 ± 8.1 d) than LD (107.9 ± 5.8 d) does. The onset of the normal breeding season was characterised by a very high incidence of short cycles in both treatments (70% vs 40% for LD and C does, respectively) and silent ovulations (36% vs 44% for LD and C does, respectively).

3.3. Oestrous activity and ovulation rate

Interval from initiation of artificial long days to cessation of behavioural oestrus was shorter ($P < 0.001$) for LD does (11 January ± 5.7 d) than for C does (19 February ± 4.6 d). During natural seasonal anoestrus, no oestrous activity was observed in C does and the mean date for the first detected oestrus of the LD does was April 12 ± 8.9 d. On the whole, 33% of LD does showed oestrus during the natural anoestrous season and was higher ($P < 0.05$) than in C does (Fig. 3).

Differences in resumption of the rest oestrous activity (220.9 ± 8.6 d) ($P > 0.05$) and in the onset of the subsequent breeding season (September 27 ± 3.3 d) between treatments ($P > 0.05$) were not observed.

Ovulation rate for the first detected oestrus during the natural anoestrous season in LD does was 1.67 ± 0.2 corpora lutea (none female of the C group showed oestrus). Treatment had no effect on this variable for the first detected oestrus of the subsequent natural breeding season (1.67 ± 0.1 corpora lutea) ($P > 0.05$).

4. Discussion

The results of the present study demonstrate that artificially increasing the photoperiod for 3 mo during the breeding season to 16 h/d reduced the length of the breeding season in LD does compared to that of control does and caused early onset of seasonal anoestrus. Thereafter, this treatment caused a reactivation of progesterone concentration in these does during the natural seasonal anoestrus at Spanish latitudes. This indicates that photoperiod could be a major factor that regulates the occurrence and cessation of ovarian activity of Payoya does. The natural photoperiod following a period of artificially increased photoperiod was interpreted by the animals as one of short days despite it being a time of increasing day length. Two hypotheses, perhaps not mutually exclusive, might explain this. Firstly, in sheep, it is well documented that seasonal variations in reproductive activity are the expression of an endogenous rhythm and that the perception of long days in the spring is a critical synchronizing signal of the rhythm involved in timing the onset of the breeding season (Woodfill et al., 1994; Malpaux et al., 2001). Although this mechanism has not been demonstrated in goats, it might be assumed to act in the same way. Therefore, the exposure of the animals to long days from November to February likely causes a phase advance of the reproductive rhythm. Secondly, the drop from artificially long days (16 h of light/d) to the natural short days of February (about 10 h 30 min of light/d) could have caused an acute stimulation of reproductive activity. However, it must be noted that, after this initial stimulation, day length increased progressively and pro-

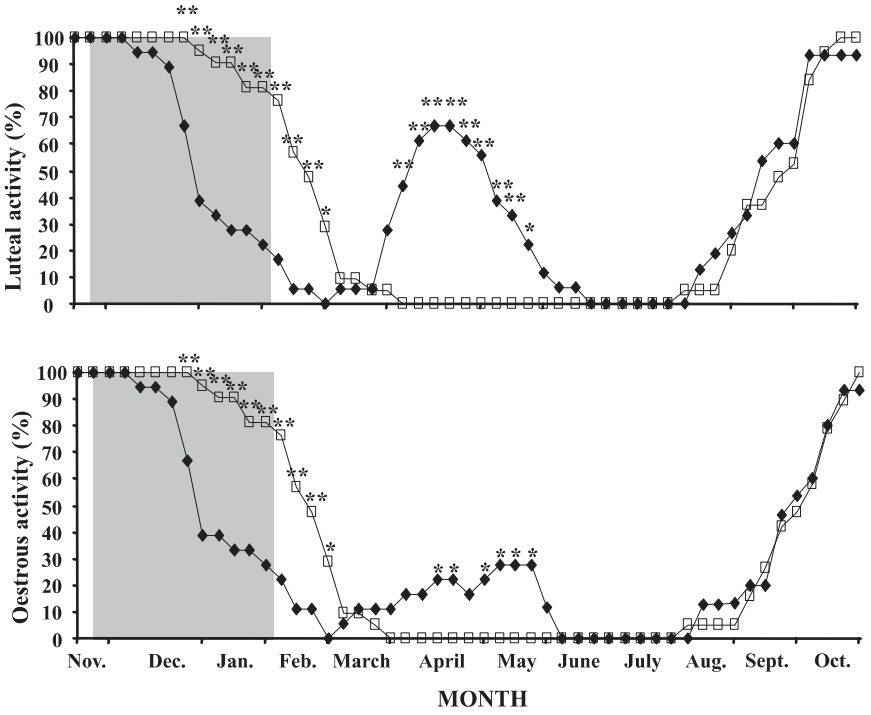


Fig. 3. Weekly percentages of entire Mediterranean goat females showing luteal activity (top) as measured indicated by changes in plasma concentrations of progesterone or oestrous activity (bottom) – subjected to natural changes in day length (C treatment, □) or after exposure to 16 h photoperiod from November 17 to February 5 and then exposed to the natural photoperiod (LD treatment, ♦). The shaded area indicates the duration of the long day treatment ($^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$).

vided a potentially inhibitory signal (Malpaux et al., 1989). Nevertheless, the induction of ovulatory cycle during the natural anoestrous season obtained by the phase shift in the endogenous rhythm due to the shortened photoperiod is not cancelled out by this inhibitory signal. This observation, made under Mediterranean conditions in which the change in day length between the winter solstice and the spring equinox is about 2 h 34 min, is similar to that seen under subtropical conditions where the change is only about 1 h 40 min (Delgadillo et al., 2002). It would be interesting to determine whether this observation holds at higher latitudes where the change in day length, and therefore strength of the inhibitory increasing day length, is greater.

Three months of long photoperiod during the natural breeding season induced luteal activity in does during the natural anoestrous season but did not appear to alter the occurrence of oestrus in these does. These results differ from those of Gatica et al. (2007) who used a melatonin implant at the end of the 3-mo increase in photoperiod during the natural breeding season and reported that most does showed oestrus and ovulated in the natural anoestrous season. The results of the present study in relation to other studies may indicate that, in Mediterranean goats, 3 mo of long photoperiod exposure during the breeding season need to be associated with other practices as the male effect, or melatonin insertion at the end of the photoperiod regime, to increase the occurrence of oestrus.

Moreover, in the present work none of the C does showed luteal or oestrous activity during the anoestrous season even they were in daily contact with sexually active does and bucks. However, in a study by Walkden-Brown et al. (1993), 87% of goats responded to the male effect when other oestrual does were present compared to 72% when such females were absent. In fact, the presence of only a few oestrous ewes or goats may induce sexual activity in the remaining females of a flock, even in the absence of any male (Bouillon et al., 1982; Restall et al., 1995). Similarly, Véliz et al. (2006) showed that, at subtropical latitudes, previous isolation of seasonally anovulatory goats from the bucks is not a requisite to obtain stimulation of their reproductive activity by the male effect as long as novel, sexually active bucks are introduced to them.

In addition, a very high incidence of irregular reproductive activity (silent ovulation, short cycles) was observed in the present study. This has been described as a regular occurrence at the onset of the breeding season before the start of normal reproductive activity. The reason for this may be that progesterone may increase the sensitivity to LH after a period of anovulation (Legan et al., 1985).

The occurrence of oestrus and luteal activity in the subsequent normal breeding season did not differ between LD and C does. These results differ from those obtained by our group using photoperiod-melatonin-treated bucks or bucks treated with melatonin at the spring equinox (Zarazaga et al., 2010) or does treated with melatonin at the spring equinox (Zarazaga et al., 2009a) or photoperiod-melatonin-treated does (Gatica et al., 2007). In all of these studies, the onset of the normal breeding season for bucks and does was delayed. The disparity between those studies and the present study might be explained because the time of reproductive onset in autumn depends on the time of exposure to long days after the winter solstice

(Malpaux et al., 1989). The reason for the previous results probably lies in the exhaustion of the melatonin implant, which delayed perception of the natural long days. However, in the present experiment, no melatonin treatment was performed; consequently, the moment of the year that determined the onset of the normal breeding season was not modified.

Exposing does artificially to long days during the natural breeding season did not appear to influence ovulation rate early in the next normal breeding season. This observation may mean that follicular wave dynamics of does may not be altered by inducing luteal activity during the natural anoestrous season of Mediterranean goats. As far as we know this is the first report of this observation in goats.

The reproductive changes observed were linked to changes of BW observed in both treatments. Body weight increased during periods of reproductive rest and losses of BW were observed during the periods of increased reproductive activity, despite the fact that the animals were fed to maintain BW. Our group (Zarazaga et al., 2005, 2009a,b, 2010) has previously reported such variations in BW in this species. However, the changes in body weight differed between LD and C does. Differences in food intake could be the origin of these changes (Argo et al., 1999). One reason for this is likely to be that the higher steroid concentrations recorded during the breeding periods directly inhibits voluntary feed intake (Newman et al., 1992; Walkden-Brown et al., 1997) and changing metabolic status during the year (Walkden-Brown et al., 1997). Another possibility it is that photoperiod has a direct effect on body weight, and it is known that weight gain is stimulated by long days and inhibited by short days (Barenton et al., 1988).

In conclusion, the results of this study support the hypothesis that artificially increasing the photoperiod for three months during the natural breeding season and daily contact with bucks can induce the occurrence of endocrine reproductive activity during the natural anoestrous season in Mediterranean does without affecting the onset of the next natural breeding season. However, very few does respond in terms of oestrous activity, indicating that by itself such stimulation is insufficient to induce a sufficient number of does to exhibit oestrus and be used as reproductive management strategy for out-of-season breeding in Mediterranean goats. Further study is required to determine what other treatments might be associated with this photoperiod treatment in order to obtain adequate oestrus activity.

Acknowledgments

The authors thank the Assay Laboratory of the Station de Physiologie de la Reproduction et des Comportements (INRA, Nouzilly, France) for performing the radioimmunoassays. This work was funded by Grant PETRI 95-0964.OP from the C.I.C.Y.T. (Spain). The authors are grateful to CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain, for providing the Melovine® implants used with the males goats in the present work.

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.
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, 255–274.
Bittman, E.L., Dempsey, R.J., Karch, F.J., 1983. Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. Endocrinology 113, 2276–2283.
Bouillon, J., Lajous, A., Fourcaud, P., 1982. Description of the female effect, comparable with the buck effect in goats (In French, with English abstract). 7èmes Journées de la Recherche Ovine et Caprine, INRA-ITOVIC-SPEOC, Paris, pp. 325–333.
Chemineau, P., 1987. Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and estrous cycles in anovulatory goats. A review. Livest. Prod. Sci. 17, 135–147.
Chemineau, P., Baril, G., Leboeuf, B., Maurel, M.C., Roy, F., Pellicer-Rubio, M., Malpaux, B., Cognie, Y., 1999. Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. J. Reprod. Fertil. Suppl. 54, 129–142.
Chemineau, P., Daveau, A., Maurice, F., Delgadillo, J.A., 1992. Seasonality of estrus and ovulation is not modified by subjecting female alpine goats to a tropical photoperiod. Small Rumin. Res. 8, 299–312.
Chemineau, P., Normant, E., Ravault, J.P., Thimonier, J., 1986. Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goats after a treatment combining a skeleton photoperiod, melatonin and the male effect. J. Reprod. Fertil. 78, 497–504.
Chemineau, P., Pelletier, J., Guérin, Y., Colas, G., Ravault, J.P., Touré, G., Almeida, G., Thimonier, J., Ortavant, R., 1988. Photoperiodic and melatonin treatments for the control of seasonal reproduction in sheep and goats. Reprod. Nutr. Dev. 28, 409–422.
Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Véliz, F.G., Hernández, H.F., Duarte, G., Vielma, J., Poindron, P., Chemineau, P., Malpaux, B., 2002. Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. J. Anim. Sci. 80, 2780–2786.
European Community Commission, 1986. Scientific procedure and breeding of animals for use in scientific procedure establishments. Directive 86/609/EEC 1986.
Gatica, M.C., Guzmán, J.L., Martin, S., Zarazaga, L.A., 2007. Effect of exogenous melatonin associated with artificial long days on sexual activity in Mediterranean goat does without male effect. 11th Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. Reprod. Domest. Anim. 42, 138.
Hervieu, J., Morand-Fehr, P., Schmidely, Ph., Fedele, V., Delfa, R., 1991. Anatomical measures allowing explaining the variations of sternal, lumbar and caudal measurements used to consider the body condition score of dairy goats (In French, with English abstract). Options Méditerranéennes, 13, pp. 43–56.
Legan, S.J., Goodman, R.L., Ryan, K.D., Foster, D.L., Karsch, F.J., 1985. Can the transition into anestrus in the ewe be accounted for solely by insufficient tonic LH secretion? J. Endocrinol. 106, 55–60.
Malpaux, B., Robinson, J.E., Wayne, N.L., Karsch, F.J., 1989. Regulation of the onset of the breeding season of the ewe: importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. J. Endocrinol. 122, 269–278.
Malpaux, B., Migaud, M., Tricoire, H., Chemineau, P., 2001. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. J. Biol. Rhythms 16, 336–347.
Martin, G.B., Milton, J.T.B., Davison, R.H., Banchero Hunzicker, G.E., Lindsay, D.R., Blache, D., 2004. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. Anim. Reprod. Sci. 82–83, 231–246.
Morand-Fehr, P., Sauvant, D., 1988. Alimentation des caprins. In: Jarrige, R. (Ed.), Alimentation des Bovins, Ovins et Caprins. INRA, Paris, pp. 281–304.
Newman, R., Weston, R., Foldes, A., Jarratt, P., Wynn, P., 1992. Administration of exogenous testosterone reduces feed intake in male fallow deer. Proc. Aust. Soc. Anim. Prod. 19, 420.
Pellicer-Rubio, M.T., Leboeuf, B., Bernelas, D., Forgerit, Y., Pougnard, J.L., Bonne, J.L., Senty, E., Chemineau, P., 2007. Highly synchronous and fertile reproductive activity induced by the male effect during deep anoestrous in lactating goats subjected to treatment with artificially long days followed by a natural photoperiod. Anim. Reprod. Sci. 98, 241–248.
Restall, B.J., Restall, H., Walkden-Brown, S.W., 1995. The induction of ovulation in anovulatory goats by oestrous females. Anim. Reprod. Sci. 40, 299–303.
SPSS, 2006. User's Guide Version 15.0. SPSS Inc., Chicago, p. 779.
Terqui, M., Thimonier, J., 1974. Nouvelle méthode radioimmunologique rapide pour l'estimation du niveau de progestérone plasmatique.

Application pour le diagnostic précoce de la gestation chez la brebis et la chèvre. CR Acad. Sci. Paris 279, 1109–1112.
Ungerfeld, R., Forsberg, M., Rubianes, E., 2004. Overview of the response of anoestrous ewes to the male effect. Reprod. Fertil. Develop. 16, 479–490.
Véliz, F.G., Poindron, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A., 2006. Maintaining contact with bucks does not induce refractoriness to the male effect in seasonally anestrous female goats. Anim. Reprod. Sci. 92, 300–309.
Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Henniawati, 1993. The male effect in the Australian cashmere goat. 3. Enhancement with buck nutrition and use of oestrous females. Anim. Reprod. Sci. 32, 69–84.
Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Scaramuzzi, R.J., Martin, G.B., Blackberry, M.A., 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 Rumin. Res. 26, 237–250.
Woodfill, C.J.I., Wayne, N.L., Moenter, S.M., Karsch, F.J., 1994. Photoperiodic synchronization of a circannual reproductive rhythm in sheep: identification of season-specific time cues. Biol. Reprod. 50, 965–997.
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., Gatica, M.C., Celi, I., Guzmán, J.L., Malpaux, B., 2009a. Effect of melatonin implants on sexual activity in Mediterranean goat females without separation from males. Theriogenology 72, 910–918.
Zarazaga, L.A., Guzmán, J.L., Domínguez, C., Pérez, M.C., Prieto, R., 2009b. Effects of season and feeding level on reproductive activity and semen quality in Payoya buck goats. Theriogenology 71, 1316–1325.
Zarazaga, L.A., Guzmán, J.L., Domínguez, C., Pérez, M.C., Prieto, R., Sánchez, J., 2009c. Nutrition level and season of birth do not modify puberty of Payoya goat kids. Animal 3, 79–86.
Zarazaga, L.A., Gatica, M.C., Celi, I., Guzmán, J.L., Malpaux, B., 2010. Effect of artificial long days and/or melatonin treatment on the sexual activity of Mediterranean bucks. Small Rumin. Res. 93, 110–118.
Zarazaga, L.A., Celi, I., Guzmán, J.L., Malpaux, B., 2011. The role of nutrition in the regulation of LH secretion by the opioidergic, dopaminergic and serotoninergic systems in female mediterranean goats. Biol. Reprod. 84, 447–454.

Artículo 4: se corresponde con el objetivo 4:

Los resultados reproductivos mejoran durante el periodo de anestro estacionario cuando las hembras y los machos de la raza caprina Murciano-Granadina son tratados con melatonina y en la raza Payoya cuando las hembras son también implantadas con melatonina.

Reproductive performance is improved during seasonal anoestrus when female and male Murciano–Granadina goats receive melatonin implants and in Payoya goats when females are thus treated.

Luis Ángel Zarazaga, María Carolina Gatica, Irma Celi, José Luis Guzmán.

Reproduction in Domestic Animals (2012) doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01899.x

Reprod Dom Anim doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01899.x
ISSN 0936-6768

Reproductive Performance is Improved During Seasonal Anoestrus when Female and Male Murciano–Granadina Goats Receive Melatonin Implants and in Payoya Goats when Females are thus Treated

LA Zarazaga, MC Gatica, I Celi and JL Guzmán

Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Huelva, Spain

Contents

This work investigates whether the reproductive performance of Mediterranean goats achieved using melatonin implants at around the spring equinox is affected by the protocol followed, i.e. implanting females only, males only, both sexes or neither sex. In a first experiment, Murciano–Granadina females (n = 419, 510 and 631 for three consecutive years) were divided into four groups: treated with melatonin (FM) and not treated with melatonin (FC), mounted by males treated with melatonin (MM) or not (MC). In a second experiment, performed during 2009, the same protocols were used with 635 Payoya females and the results compared with those obtained for the same year for the Murciano–Granadina breed. Fertility (percentage of goats kidding), litter size (number of kids born per female kidded) and productivity (number of kids per female in each mating group) were calculated. In the first experiment, better reproductive performances were obtained when females (overall fertility: 71.1% vs 57.0% for the FM and FC animals; productivity 1.37 ± 0.04 kids per female vs 1.12 ± 0.03 kids per female for the FM and FC animals; $p < 0.01$) or males (overall fertility: 65.9% vs 58.4 for the MM and MC animals; productivity 1.28 ± 0.03 kids per female vs 1.13 ± 0.04 kids per female for MM and MC groups, respectively; $p < 0.01$) were implanted with melatonin. Moreover, the interaction sex × melatonin treatment had a significant effect ($p < 0.05$) on productivity. In the second experiment, for the Murciano–Granadina breed, the greatest increase in the number of kids born per female was obtained when the females were treated with melatonin, in either the FM/MC or FM/MM protocols (0.54 extra kids and 0.53 extra kids per female, respectively) ($p < 0.01$). In the Payoya breed, the greatest increase was obtained using the FM/MC protocol (0.19 extra kids per female). Thus, improved reproductive performances are obtained when female Murciano–Granadina and Payoya goats are implanted with melatonin, although important differences in reproductive performance are seen between the breeds.

Introduction

Some breeds of goat originating from mid and high latitudes show seasonal variation in their reproductive activity. This leads to variations in the availability of their products (milk and meat) over the year. Out-of-breeding-season reproduction would, however, allow milk and meat to be produced throughout the year, in accordance with commercial requirements and consumer expectations. The timing of reproductive seasonality in these small ruminants, as well as in most mammals of the temperate zones, is controlled by photoperiod (Chemineau et al. 2007). Photoperiod information is conveyed to the neuroendocrine system by the circadian secretion of melatonin from the pineal gland (Bittman et al. 1983). This hormone is synthesized and secreted according to a light-dependent daily rhythm generated by an endogenous circadian clock, with strong secretion during the dark phase of a light/dark illumination cycle and weak secretion during the light phase (Reiter 1991). As goats are short-day breeders, attempts have been made to mimic the effect of short days by artificially prolonging the duration of high levels of circulating melatonin. Exogenously administered melatonin from continuous slow-release implants has been shown to advance the onset of the breeding season (Chemineau et al. 1996).

In higher latitudes, melatonin implants have traditionally been inserted around the summer solstice to advance the breeding season (Chemineau et al. 1996). However, in commercial Mediterranean flocks, they are usually inserted at approximately the time of the spring equinox (Chemineau et al. 1996; Zarazaga et al. 2009b). This treatment is followed by a separation of the males and females for 45 days, providing the conditions necessary for obtaining a successful male effect, and therefore greater synchronization at mounting. The females are usually treated with melatonin implants, although the results achieved vary depending on the farm to which they belong, their breeding month and their reproductive history (Chemineau et al. 1991). As the teasing period occurs during seasonal anoestrous, it might also be of use to implant the males, which suffer dramatic reductions in their reproductive activity during the time of female anoestrous; certainly, this has been recorded in Murciano–Granadina bucks (Arrebola et al. 2010) and Payoya buck (Zarazaga et al. 2009a, 2010). Unfortunately, the literature contains no information regarding the benefits of treating males or females or both.

The Murciano–Granadina goat breed, which is well adapted to Mediterranean environmental conditions, is the most important Spanish milk goat breed, with a total of some 500 000 animals kept in the Murcia and Andalusia regions. The females experience a reduction in their reproductive activity from February to May (Falagan et al. 1989), and the bucks experience longer reaction times during the spring (Arrebola et al. 2010). The Payoya goat, an endangered Spanish goat breed, is also well adapted to the Mediterranean area and experiences seasonal anoestrous between the second fortnight of January and the second fortnight of August (Zarazaga et al. 2005). The bucks of this breed showed lower testosterone concentrations during winter and spring and also experience longer reaction times (Zarazaga et al. 2009a). As described, the bucks and females of both breeds experience a reduction in their

© 2011 Blackwell Verlag GmbH

reproductive activity during seasonal anoestrous, and melatonin implants have been shown to stimulate reproductive activity in both sexes (Zarazaga et al. 2009b, 2010). In this way, the aim of the present work was to determine whether the reproductive performance of Mediterranean goats achieved using melatonin implants at around the spring equinox is affected by the sex implantation protocol followed, i.e. implanting females only, males only, both sexes or neither sex.

Materials and Methods

Animals and farms

Experiments were performed between 2007 and 2009 at a Murciano–Granadina goat farm and a Payoya goat farm (separated by < 2 km) in the north of the Province of Cádiz, Spain (35°N). The female experimental animals used in 2007, 2008 and 2009 were 419, 510 and 631 multiparous lactating Murciano–Granadina goats. In 2009, 635 multiparous lactating Payoya goats were also involved. All females were lactating between the sixth and seventh months of lactation. The experimental adult males (see Fig. 1 for numbers per breed and year) belonged to the corresponding farms. For the Murciano–Granadina goats, the mean live weight was for the males around 75 kg and for the females around 50 kg and for the Payoya breed males around 80 kg and females around 55 kg. In both experimental farms, animals were raised using the same semi-extensive system based on the grazing of natural pastures (Mena et al. 2009). The systems are characterized by a large land surface per animal, few sanitary problems and grazing as an integral part of animal feeding. A supplementary feed concentrate was added at a flat rate of 1.0 kg/head per day. On the rangeland, the diet was composed of herbaceous plant species and leaves and stems from Mediterranean shrubs and trees (mainly *Mirtus communis*, *Pistacia lentiscus*, *Quercus ilex*, *Cistus salvifolius* and *Arbutus unedo*). Both farms employed the same animal handlers (both were owned by the same company). The goats were housed at night in open barns provided only with natural light.

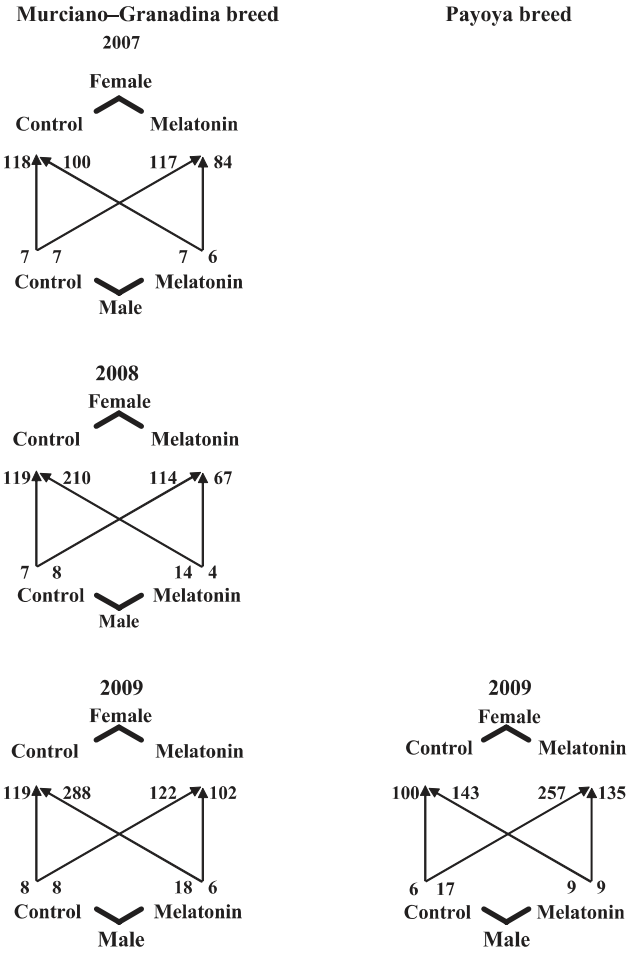


Fig. 1. Diagram showing the different experimental sex implantation protocols and the number of females and males involved in each. Note: arrows indicate the experimental groups (the origin corresponds to the males and the arrowhead to the females)

Mating experiments

Experiment 1: reproductive performance of melatonin-implanted Murciano–Granadina goats

The aim of this experiment, performed with the Murciano–Granadina flock, was to compare the effect of melatonin treatment and the male effect depending on whether females, males or both had received implants.

The female and male goats were divided into those implanted and those not implanted with melatonin: females implanted FM; females not implanted (control) FC; males implanted MM; males not implanted (control) MC. Four types of mating, based on implantation protocol, were then allowed – females control mated with males control (FC/MC), females control mated with males implanted with melatonin (FC/MM), females implanted with melatonin mated with males control (FM/MC) and females implanted with melatonin mated with males implanted with melatonin (FM/MM) (Fig. 1) – after appropriately inducing the male effect.

Experiment 2: comparison of reproductive performance of Murciano–Granadina and Payoya goats implanted with melatonin

The aim of this experiment was to determine whether breed influences the response to the male effect and melatonin treatment. The data obtained in 2009 for the Murciano–Granadina flock in Experiment 1 were compared to those obtained for the Payoya flock subjected to the same experimental protocols: female controls mated with male controls (FC/MC), female controls mated with males implanted with melatonin (FC/MM), females implanted with melatonin mated with male controls (FM/MC) and females implanted with melatonin mated with males implanted with melatonin (FM/MM) (Fig. 1) – after appropriately inducing the male effect.

Melatonin treatment

On 21 April 2007, 26 April 2008 and 17 April 2009, following the manufacturer's instructions, females

© 2011 Blackwell Verlag GmbH

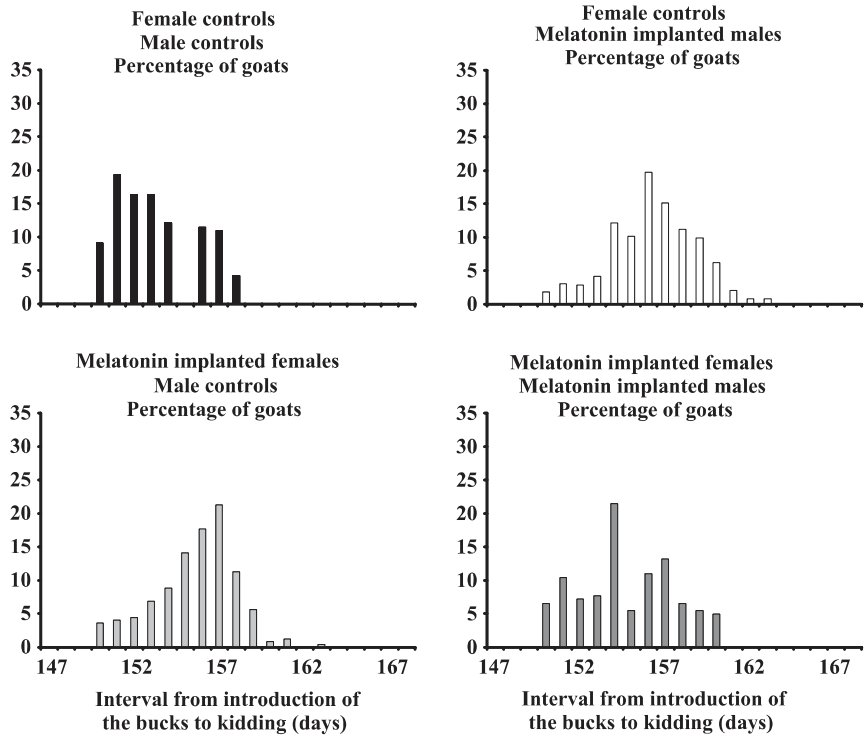


Fig. 2. Daily percentage kidding in Murciano–Granadina goats depending on the time elapsed since the introduction of the males to the females. Experimental groups: female controls mated with male controls (■), female controls mated with males implanted with melatonin (□), females implanted with melatonin mated with male controls (▨), females implanted with melatonin mated with males implanted with melatonin (▩)

received one and males three subcutaneous melatonin implants (Zarazaga et al. 2009b, 2010), (base of the left ear) containing 18 mg of the hormone (Melovine®; CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain).

Induction and synchronization of ovarian activity

The male effect was used to induce ovarian activity in female goats subjected to melatonin implantation; the control females were subjected to no such hormone treatment but were subjected to the male effect.

Intact adult males joined the females in their pens at both farms 45 days after melatonin implantation and at a ratio of one buck to 14–17 females depending on the year and mating group (Fig. 1). The bucks were kept with the dams for about 1 month to ensure fertilization by natural mating. The distance between the different experimental groups was more than 100 m.

Measurements

Reproductive performance: fertility, litter size and productivity

The criteria used to evaluate the effect of the treatment were fertility (percentage of goats kidding), litter size (number of kids born per female kidding) and productivity (number of kids per female in each mating group). To obtain an objective measurement of the reproductive performance, the number of additional kids born per goat compared to the control protocol (FC/MC matings) was recorded and the percentage increase calculated. The date of kidding for each female was recorded as well as the time elapsed between the introduction of the males (Day 0) and kidding.

Statistical analysis

In the first experiment, the effect of the year on each reproductive variable was analysed. Litter sizes were compared using the Kruskall–Wallis test followed by the Mann–Whitney *U*-test. Fertility and the daily proportion of kidding females were compared between groups using the Fisher–Freeman–Halton exact probability test for multiple group comparisons and the Fisher exact probability test for two-group comparisons. In addition, these analyses were performed to test the effect of the melatonin treatment within sex (melatonin vs control). Productivity was compared using factorial ANOVA with 'sex' and 'melatonin treatment' as fixed effects, as well as 'breed' with respect to the second experiment. The daily percentage of goats kidding was compared using the χ^2 squared test. Data are reported as mean ± SE of the mean. All calculations were performed using SPSS software (SPSS, 2007 Manual del Usuario Version 16.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Significance was set at $p < 0.05$.

Results

Experiment 1: reproductive performance of melatonin-implanted Murciano–Granadina goats

The data for all 3 years were pooled to analyse the variability of the response to the different treatments because no differences were observed between years for any of the studied variables. Greater overall fertility (%) and productivity (kids/female) were recorded when the females or males were implanted with melatonin (71.1% and 1.37 ± 0.04 kids/female vs 57.0% and 1.12 ± 0.03 kids/female for implanted and control females, respectively; $p < 0.01$ and 65.9% and 1.28 ± 0.03 kids/female

© 2011 Blackwell Verlag GmbH

vs 58.4% and 1.13 ± 0.04 kids/female for implanted and control males, respectively; $p < 0.01$), independent of whether the other sex was implanted. Moreover, the interaction sex × melatonin treatment had a significant effect on productivity ($p < 0.05$) (Table 1). The treatment of males with melatonin did not improve the productivity of melatonin-treated females. In contrast, the productivity of control females was higher in groups joining melatonin-treated rather than control bucks, although the differences were not significant. The productivity of control females joining implanted or control bucks remained lower than those observed in melatonin-treated females. Compared to the control protocol (females and males not treated with melatonin), the percentage of additional kids born per female was significantly higher when females were treated with melatonin (43% and 48% for females treated with melatonin when joined with males not treated and treated with melatonin, respectively, $p < 0.05$).

Differences were seen in the daily percentage of females giving birth over time ($p < 0.001$) for all protocols, indicating that mating peaks occurred after the introduction of the males (Fig. 2). The shortest interval from buck introduction to kidding was recorded for the control protocol ($p < 0.01$) (Table 1). The time elapsed between the onset and the end of the kidding period was more synchronized in the control females that had joined control bucks, with 100% of the females kidding over nine days ($p < 0.01$).

Table 1. Murciano–Granadina females: fertility, litter size, productivity and interval between buck introduction and kidding in the different mating groups/implantation protocols

Group	Fertility (%)	Litter size (mean ± SEM)	Productivity (mean ± SEM)	Interval between buck introduction and kidding (days)
Female controls male controls	46.3b	2.01 ± 0.02a	0.93 ± 0.05b	153.3 ± 0.2a
Female controls – melatonin-implanted males	63.4b	1.92 ± 0.02b	1.23 ± 0.04b	156.3 ± 0.1b
Melatonin-implanted females – male controls	70.5a	1.89 ± 0.03b	1.33 ± 0.05a	155.6 ± 0.2b
Melatonin-implanted females – melatonin-implanted males	71.9a	1.96 ± 0.03ab	1.41 ± 0.06a	154.7 ± 0.2b

Different letters in the same column indicate significant differences $p < 0.05$.

Experiment 2: comparison of reproductive performance of Murciano–Granadina and Payoya goats implanted with melatonin

Strong differences ($p < 0.001$) were seen between the breeds in terms of fertility, with overall values of 65% for the Murciano–Granadina breed and 55% for the Payoya breed. The overall litter size of the Murciano–Granadina breed was larger at 1.93 ± 0.02 kids per female compared to 1.82 ± 0.03 kids per female for the Payoya breed ($p < 0.01$). The overall productivity of the Murciano–Granadina breed was also higher than that of the Payoya breed (1.26 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.04 kids born per female) ($p < 0.01$).

In the Murciano–Granadina breed, higher fertility and productivity were observed when females ($p < 0.01$) or males ($p < 0.05$) were implanted with melatonin, and the interaction sex × melatonin treatment had a significant effect on productivity ($p < 0.01$) (Table 2), as in the first experiment. However, for the Payoya breed, higher fertility and productivity were observed when females were implanted ($p < 0.01$), but a lower reproductive performance was obtained when the males were implanted ($p < 0.05$) (Table 2).

Table 2 summarizes the differences between breeds and protocols. Compared to the control protocol, the number of additional Murciano–Granadina kids born per female was significantly higher for all protocols ($p < 0.01$). For the Payoya breed, and compared to the appropriate control protocol results, only the control females mated with melatonin-treated males showed a

Table 2. Murciano–Granadina (MG) and Payoya goats females: fertility, litter size, productivity and interval between buck introduction and kidding in different mating groups/implantation protocols

	Fertility (%)		Litter size (mean ± SEM)		Productivity (mean ± SEM)		Interval between buck introduction and kidding (days)	
Group	MG	Payoya	MG	Payoya	MG	Payoya	MG	Payoya
Female controls – male controls	46.2c	49.0bc	1.98 ± 0.05	2.06 ± 0.03c	0.92 ± 0.09a	1.01 ± 0.11b	153.2 ± 0.3b	153.6 ± 0.4b
Female controls – melatonin-implanted males	64.6bA	40.6bB	1.90 ± 0.03A	1.67 ± 0.06bdB	1.24 ± 0.06bA	0.68 ± 0.07aB	155.3 ± 0.2aA	154.4 ± 0.2abB
Melatonin-implanted females – male controls	76.2aA	65.8aB	1.91 ± 0.05	1.82 ± 0.04a	1.46 ± 0.08bA	1.20 ± 0.06bB	155.2 ± 0.2a	155.9 ± 0.4a
Melatonin-implanted females – melatonin-implanted males	73.5abA	53.3cB	1.97 ± 0.04A	1.79 ± 0.06adB	1.45 ± 0.09bA	0.96 ± 0.08abB	153.3 ± 0.3b	153.9 ± 0.2b

Different letters in the same column for the same variable and breed indicate significant differences between groups (a,b,c,d): $p < 0.05$
Different letters in the same row for the same variable in each group indicate significant differences between breeds (A,B): $p < 0.05$.

© 2011 Blackwell Verlag GmbH

large reduction in productivity (a 33% reduction in the number of kids, $p < 0.05$).

Differences in the daily percentage of females giving birth over time ($p < 0.001$) were seen between protocols in both Murciano–Granadina and Payoya breeds (Table 2, Fig. 3). In general, female controls mated with control males and melatonin-treated females joining melatonin-treated males kidded earlier than female goats from the other groups. The interval from buck introduction to kidding was similar between breeds for all protocols, except for female controls that were mated with melatonin-implanted males (Table 2, Fig. 3); in this case, Payoya goats kidded earlier. In addition, no clear kidding peaks occurred in the group of Payoya melatonin-implanted females mated with control males. This group had a very long period of kidding of 22 days. For this group, only 66% of females kidded during the first 10 days, while for the other protocols 100% of females kidded ($p < 0.01$).

Discussion

In both breeds, fertility was significantly improved by melatonin implantation of the females. These results are of practical importance because they indicate that, to optimize reproductive performances on farms, the females need to be implanted with melatonin. However, no effect on litter size was recorded. Therefore, the improvement in productivity associated with implantation recorded in both experiments and in both breeds was because only of the greater fertility of the treated female goats. The lowest fertility was observed in both non-treated Murciano–Granadina and Payoya females joined with non-treated males or treated males. This indicates that, for these breeds, the male effect alone is insufficient to improve reproductive performance. Nor is the use of melatonin-treated males sufficient. Rather, the females must be implanted. This agrees with previous results reported by our group (Zarazaga et al. 2009b, 2011), showing that in this breed the reproductive response of non-treated females to the male stimulus is scant during seasonal anoestrous when no additional treatments such as melatonin and/or photoperiod are used.

The lack of effect on litter size confirms earlier results in which no change was seen in the ovulation rate of females implanted at around the spring equinox (Zarazaga et al. 2009b). In contrast, several authors have reported an increase in ovulation rate and litter size in ewes treated with melatonin in both higher latitude (Robinson et al. 1991) and Mediterranean ewes (Forcada et al. 1995; Zúñiga et al. 2002). This phenomenon might be explained by exogenous factors having little influence on the ovulation rate of small ruminants with naturally high rates – the case in the present study (Gunn 1983; Smith 1985). However, and surprisingly, the litter size achieved with the Payoya female controls mounted by male controls was extraordinary; the prolificacy was the highest seen in both experiments. The reason might be that, although a very low percentage of control females responded to the male effect, those that did had larger litter sizes. Why this should be so, however, remains unknown.

The overall reproductive performance (fertility, litter size and productivity) of the Murciano–Granadina females was better than that of the corresponding

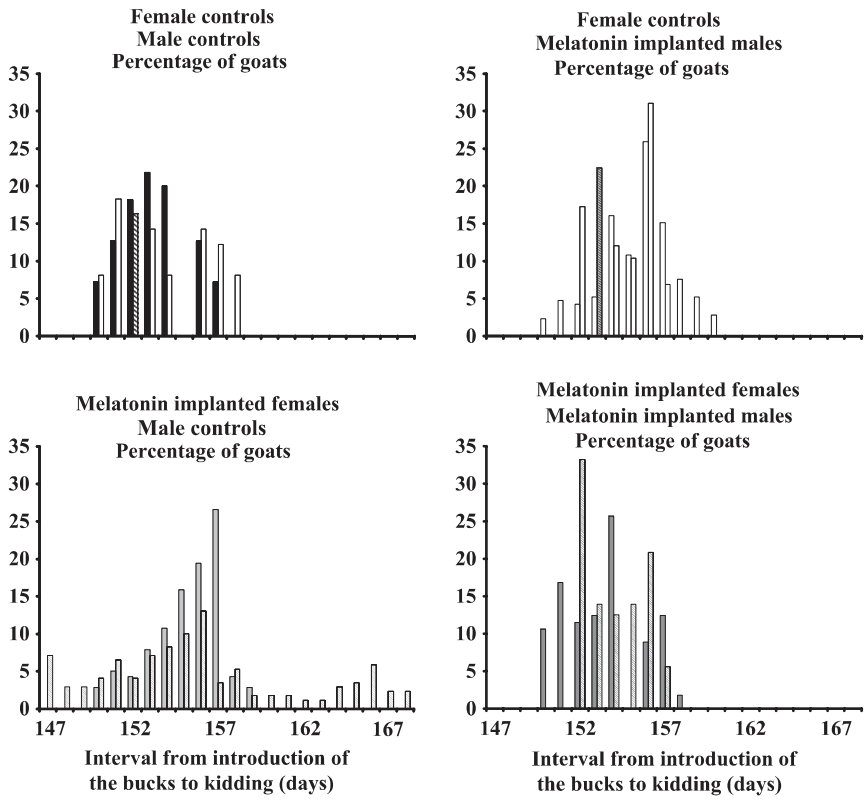


Fig. 3. Daily percentage of kidding in Murciano–Granadina (filled bars) and Payoya (barred bars) females depending on the time elapsed since the introduction of the males to the females Experimental groups: female controls mated with male controls (■ ▨), female controls mated with males implanted with melatonin (□ ▨), females implanted with melatonin mated with male controls (■ ▨), females implanted with melatonin mated with males implanted with melatonin (■ ▨)

© 2011 Blackwell Verlag GmbH

Payoya dams. Differences between breeds in terms of reproductive variables are, however, common. In this respect, the present results agree with those obtained by other authors working with the same breeds (González et al. 2002; Vázquez et al. 2010). The origin of the differences between breeds in terms of litter size may lie in the rate of follicular atresia (Driancourt et al. 1990; López et al. 1997).

Implantation of the Murciano–Granadina males increased reproductive performance compared to no treatment. However, this was not seen for the Payoya males. Delgadillo et al. (2002) showed that only artificially long days, and not melatonin, were necessary to induce sexual activity in male goats from subtropical latitudes and that sexual activity in anovulatory females was stimulated by the male effect. However, in previous work on the Payoya breed, the implantation of the males improved their reproductive activity in comparison with their non-implanted counterparts (Zarazaga et al. 2010). The reason for this discrepancy remains unclear, but might lie in differences between flocks and farms. Martín-Santana et al. (2009), for example, reported differences in reproductive performance between 17 flocks of Spanish Florida goats.

With respect to the daily percentage of females kidding, in both breeds, all the studied protocols – except for Payoya females implanted with melatonin mated with male controls – were associated with a kidding period of under 14 days, with peaks of kidding revealing a degree of synchronization of mating, which is compatible with that induced by the male effect (Flores et al. 2000; Delgadillo et al. 2002). Nevertheless, melatonin treatment of the males and females was unable to improve this synchronization, and no return to oestrus appeared to have occurred in treated and untreated goats.

Surprisingly, the daily percentage of kidding of Payoya females implanted with melatonin and mated with male controls was extended for 22 days, and kidding peaks were not observed over the time. These results suggest that, perhaps, in this group, most of the kidding females were cycling before male introduction. Why this group of Payoya goats was not anovulatory before the introduction of males remains unclear.

Conclusions

Together, the present results show that female Murciano–Granadina and Payoya goats show better fertility when implanted with melatonin. Implanting the males is of clear benefit for the Murciano–Granadina breed only when females are not implanted; the treatment of males with melatonin does not improve the reproductive results of implanted females in this breed. In contrast, in the Payoya breed, the treatment of males with melatonin is not beneficial in terms of the reproductive performance of either melatonin-treated or melatonin-untreated females.

Acknowledgements

This work was funded by Grant PETRI 95-0964.OP from C.I.C.Y.T. (Spain). The authors are grateful to CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain, for providing Melovine® implants. The authors wish to thank the collaboration of Oliete G. for supply animals. We also thank Adrian Burton for revision of the English manuscript.

Conflict of interest

None of the authors have any conflict of interest to declare.

Author contributions

Dr Guzmán has contributed actively for valuable discussion and drafted the paper and critical readings of the manuscript. Mss Gatica and Mss Celi have contributed to the handling of the animals and recovering data. Dr Zarazaga has designed the study, analysed the data and written the paper.

References

Arrebola FA, Pérez-Marín CC, Santiago-Moreno J, 2010: Limitation of seasonality in reproductive parameters of Mediterranean bucks, using photoperiod treatment. Small Rumin Res **89,** 31–35.

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

Chemineau P, Vandaele E, Brice G, Jardon C, 1991: Utilisation des implants de mélatonine pour l'amélioration des performances de reproduction chez la brebis (Use of melatonin implants to improve sheep reproductive performances). Rec Méd Vét **167,** 227–239.

Chemineau P, Malpaux B, Pelletier J, Leboeuf B, Delgadillo JA, Deletang F, Pobel T, Brice G, 1996: Use of melatonin implants and photoperiodic treatments to control seasonal reproduction in sheep and goats. (In French, with English abstract). INRA Prod Anim **9,** 45–60.

Chemineau P, Malpaux B, Brillard JP, Fostier A, 2007: Seasonality of reproduction and production in farm fishes, birds and mammals. Animal **1,** 419–432.

Delgadillo JA, Flores JA, Véliz FG, Hernández HF, Duarte G, Vielma J, Poindron P, Chemineau P, Malpaux B, 2002: Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. J Anim Sci **80,** 2780–2786.

Driancourt MA, Castonguay F, Bindon BM, Piper LR, Quirke JF, Hanrahan JP, 1990: Ovarian follicular dynamics in lines of sheep (Finn Merinos) selected on ovulation rate. J Anim Sci **68,** 2034–2041.

Falagan A, González C, López A, 1989: Períodos de anoestro de la cabra Murciano-Granadina en la región de Murcia. ITEA **9,** 298–300.

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

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.

González O, Pastor JM, Castel JM, Delgado M, 2002: Características reproductivas de la cabra Payoya. El Arca **5,** 151–152.

Gunn RG, 1983: The influence of nutrition in the reproductive performance of ewes. In: Haresign W (ed.), Sheep Production. Butterworths, London, pp. 99–110.

López A, González A, Santiago J, Gómez A, Townsend EC, Inskeep EK, 1997: Patterns of follicular development during the estrous cycle in monovular Merino del Pais ewes. Anim Reprod Sci **48,** 279–291.

Martín-Santana M, López-Fariñas MD, Carbajo-Rodríguez A, Rodríguez-Estévez V, Sánchez-Rodríguez M, 2009: Resultados reproductivos del servicio de asesoramiento de ACRIFLOR con el uso de implantes de melatonin y efecto macho. In: Proceedings of the XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Ovinotecnia y

© 2011 Blackwell Verlag GmbH

Caprinotecnia, September 16–19, 2009, Barbastro, España, pp. 376–381.
Mena Y, Ligero M, Ruiz FA, Nahed J, Castel JM, Acosta JM, Guzmán JL, 2009: Organic and conventional dairy goat production systems in Andalusian mountainous areas. Options Méditerranéennes A **91,** 253–256.
Reiter RJ, 1991: Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocr Rev **12,** 151–180.
Robinson JJ, Wigzell S, Aitken RP, Wallace JM, Ireland S, Robertson IS, 1991: The modifying effects of melatonin, ram exposure and plane of nutrition on the onset of ovarian activity, ovulation rate and the endocrine status of ewes. Anim Reprod Sci **26,** 73–91.
Smith JF, 1985: Protein, energy and ovulation rate. In: Land RB, Robinson DW (eds), Genetics on Reproduction in Sheep. Butterworths, London, pp. 349–359.
Vázquez JM, Mazariegos V, Salvador S, Garrido C, De La Fuente LF, 2010: The INRA96 diluent in the artificial insemination. In: Proceedings of the XXXV Congreso de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, September 22–24, 2010, Valladolid, España, pp. 191–194.
Zarazaga LA, Guzmán JL, Domínguez C, Pérez MC, Prieto R, 2005: Effect of plane of nutrition on seasonality of reproduction in Spanish Payoya goats. Anim Reprod Sci **87,** 253–267.
Zarazaga LA, Guzmán JL, Domínguez C, Pérez MC, Prieto R, 2009a: Effects of season and feeding level on reproductive activity and semen quality in Payoya buck goats. Theriogenology **71,** 1316–1325.
Zarazaga LA, Gatica MC, Celi I, Guzmán JL, Malpaux B, 2009b: 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, 2010: Effect of artificial long days and/or melatonin treatment on the sexual activity of Mediterranean bucks. Small Rumin Res **93,** 110–118.
Zarazaga LA, Gatica MC, Celi I, Guzmán JL, Malpaux B, 2011: Artificial long days in addition to exogenous melatonin and daily contact with bucks stimulate the ovarian and oestrous activity in Mediterranean goat females. Animal **5,** 1414–1419.
Zúñiga O, Forcada F, Abecia JA, 2002: The effect of melatonin implants on the response to the male effect and on the subsequent cyclicity of Rasa Aragonesa ewes implanted in April. Anim Reprod Sci **72,** 165–174.

Submitted: 10 Mar 2011; Accepted: 23 Aug 2011

Author's address (for correspondence): Luis Ángel Zarazaga, Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Carretera Huelva-Palos de la Frontera s/n, 21819, Palos de la Frontera, Huelva, Spain. E-mail: zarazaga@uhu.es

© 2011 Blackwell Verlag GmbH

Artículo 5: Se corresponde con el objetivo 5:

Efecto de los días largos artificiales y/o el tratamiento con melatonina sobre la actividad sexual de machos cabríos Mediterráneos

Effect of artificial long days and/or melatonin treatment on the sexual activity of Mediterranean bucks.

Luis Ángel Zarazaga, María Carolina Gatica, Irma Celi, José Luis Guzmán, Benoît Malpaux.

Small Ruminant Research (2010) 93:110-118.

Small Ruminant Research 93 (2010) 110–118

Contents lists available at ScienceDirect

Small Ruminant Research

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

Effect of artificial long days and/or melatonin treatment on the sexual activity of Mediterranean bucks

L.A. Zarazaga[a,*], M.C. Gatica[a], I. Celi[a], J.L. Guzmán[a], B. Malpaux[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 INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux, Centre INRA de Tours, 37380 Nouzilly, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 6 October 2009
Received in revised form 13 May 2010
Accepted 19 May 2010
Available online 11 June 2010

Keywords:
Seasonality
Photoperiod
Melatonin
Testosterone
Buck

ABSTRACT

The aim of this work was to determine whether treatments using photoperiod (long days) and/or exogenous melatonin are effective in enhancing reproductive activity during the natural anestrous season in Mediterranean bucks. Two experiments were carried out. In the first experiment, 19 adult bucks were allotted to 3 treatment groups. Fourteen bucks were exposed to 16 h of light/day (long day) for 98 days (late autumn–winter). At the end of the long day treatment, 7 bucks received 3 s.c. melatonin implants (LD-M group), and the other bucks remained a long day group (LD group, $n = 7$). The control group (C1, $n = 5$), remained under natural photoperiod. In the second experiment, 7 bucks received 3 s.c. melatonin implants (M group, $n = 7$), while the other 5 bucks acted as the control group (C2, $n = 5$) during the spring equinox. During the natural sexual anestrous season (spring), the treated groups recorded higher plasma testosterone concentrations than the control groups. Reactivation of the natural reproductive season was delayed only in the LD-M group. All treated bucks recorded a higher mean semen volume, than the control groups (Exp 1: 1.16 ± 0.04 mL, 1.16 ± 0.04 mL, and 1.08 ± 0.04 mL, for the LD-M, LD, and C1 groups, respectively $P < 0.01$; Exp 2: 1.04 ± 0.07 mL vs 0.77 ± 0.05 mL, for M and C2 groups, respectively; $P < 0.01$). The percentage of bucks that ejaculated was modified by treatment in the first experiment ($89 \pm 1.7\%$, $71 \pm 2.4\%$, and $88 \pm 1.9\%$ for LD-M, LD, and C1 groups, respectively, $P < 0.001$). Results demonstrate that treating bucks with artificial long days and/or melatonin at Mediterranean latitudes can induce an increase in plasma testosterone concentration during the natural anestrous season. The long day treatment alone resulted in a less effective method of inducing adequate out-of-season buck sexual activity.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Seasonal reproductive activity is regulated by an endogenous hormonal rhythm, synchronised by environmental stimuli, with photoperiod playing the most important role. Daylight stimuli are received by the retina and transmitted to the pineal gland, where it is converted to hormonal stimuli (melatonin), which regulates the endocrine reproductive axis (Gerlach and Aurichr, 2000). In brief, daylight thus suppresses the melatonin synthesis by modulating the activity of its biosynthetic enzymes. The melatonin signal, in combination with the photoperiodic nature, thus provides the exact information regarding the season (Minneman and Wurtmann, 1975).

The need of alternating "long" and "short" days to stimulate reproductive activity has been demonstrated in Suffolk rams by Hanif and Williams (1991) and in bucks by Delgadillo and Chemineau (1992). In ewes, it is well known that the onset of the reproductive season is mainly dependent on the increasing daylight length in spring, resetting the endogenous rhythm (Malpaux et al., 1989; Woodfill et al., 1994). Thereafter, animals become refrac-

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

0921-4488/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.smallrumres.2010.05.008

tory to inhibitory day length (Robinson et al., 1985). On the other hand, the end of the sexual season is thought to result following the occurrence of photorefractoriness to previously stimulatory short days (Lincoln, 1980; Robinson and Karsch, 1984).

Treatments with exogenous melatonin, mimicking the effect of short days, generally stimulate the reproductive activity in short day breeders. In sheep at temperate latitudes, subcutaneous implants are normally inserted around the summer solstice (Haresign et al., 1990). The Mediterranean breeds are generally treated around the spring equinox or summer solstice (Chemineau et al., 1996; Zarazaga et al., 1996; Zarazaga et al., 2009a). This fact indicates that animals need to perceive a preliminary period of increasing daylength or artificial long days. It was clear that the succession of 'long days' plus melatonin was more efficient in the induction and maintenance of cyclical sexual activity, than a succession of 'long days' alone—which in itself was more efficient than melatonin alone and in turn more efficient than the absence of treatment (Chemineau et al., 1986, 1988). In sub-tropical latitudes, the sexual activity of bucks has been induced using artificially long days in the period November to January (winter), followed or not by a melatonin treatment (Delgadillo et al., 2001, 2002).

The aim of this study was therefore to determine whether sexual activity can be induced in bucks during the natural anestrous season (spring) in Mediterranean goat bucks (Zarazaga et al., 2009b), using long days and/or exogenous melatonin implants. The onset of the subsequent natural reproductive season was also evaluated to determine whether these treatments have any medium-term effect.

2. Materials and methods

2.1. General

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

The study was conducted on the experimental farm of the University of Huelva, Spain (latitude 37°12′N; longitude 6°54′W). Thirty-one bucks (between 1.5 and 4 years of age at the onset of the experiment), previously trained to mount a teaser doe and ejaculate into an artificial vagina were used. Bucks were daily fed barley straw *ad libitum*, lucerne hay and a commercial concentrate, according to the INRA standards (Morand-Fehr and Sauvant, 1988), to maintain body weight and allow growth in younger bucks, throughout the experiment. All animals had free access to water and mineral blocks containing oligo-elements and vitamins. At the onset of each experiment, the animals were allocated to relatively uniform groups, according to their live weight (LW), testicular weight (TW) and age.

2.1.1. Experiment 1

In this experiment, the 19 adult bucks used were allocated to 3 groups. The control group (C1, $n = 5$) was housed in a communal yard with a covered area, throughout the trial, without any supplementary light. From 14th November 2005 (late autumn), until 20th February 2006 (end winter) during the natural short days, the 14 bucks in the treatment groups were placed in a light-proof building, and exposed to long days (16 h light: 8 h darkness; lights on 06:00:lights off 22:00). On the 20th February (end winter), during increasing natural photoperiod, all the bucks were again exposed to natural daylight, while half of the treated animals (LD-M, $n = 7$) simultaneously received 3 subcutaneous melatonin implants, each containing 18 mg of the hormone (Melovine®), in the base of the left ear. The other long day group (LD, $n = 7$) remained under natural photoperiod.

2.1.2. Experiment 2

In this experiment, 12 adult bucks were used. On the 18th March 2006 (spring equinox) with increasing natural photoperiod, the animals were allocated to two uniform groups. The melatonin-treated group (M, $n = 7$) received 3 subcutaneous melatonin implants simultaneously, similar to those in Experiment 1. The rest of the animals received no treatment and served as the control group (C2, $n = 5$). All animals were housed together in a communal yard, with a covered area throughout the experiment, and without any supplementary light.

2.2. Live (LW) and testicular weight (TW) measurements

Live weight and TW's were recorded weekly throughout the study. Testicular weight was assessed by comparative palpation using an orchidometer, using the same operator throughout the study (Oldham et al., 1978).

2.3. Plasma testosterone concentrations and reproductive status

Blood samples were obtained by jugular venipuncture into vacuum tubes containing heparin, once a week at 09:00 for the entire observation period. Plasma was recovered following centrifugation at 3000 × *g* for 30 min, and the plasma then stored at −20 °C until assayed by RIA for plasma testosterone concentration (Garnier et al., 1978). The intra- and interassay coefficients of variation were 9.3% and 11%, respectively.

The reproductive status of the bucks was assessed using the characteristics of the plasma testosterone profile (Zarazaga et al., 2009b). The parameters calculated were: (a) the interval between the onset of the experiment and the onset of the anestrous season (Exp 1); (b) the interval between the time of implant insertion (LD-M and M groups) or the end of the photoperiodic treatment (LD group), and the onset of induced reproductive activity; (c) the onset of the subsequent natural reproductive season.

2.4. Semen and sexual behaviour evaluation

The methodology to evaluate sexual behaviour and semen production was similar to that described previously by Zarazaga et al. (2009b). Briefly, the first 8 days of each month was subdivided into two 3 days periods of daily semen collection using the artificial vagina, separated by a 2 days rest period. The data obtained on the first day of each monthly semen collection was not considered in the analysis, to avoid a possible effect of sexual rest on semen quality. On each occasion, the sexual behaviour of each buck was assessed by presenting it with an intact oestrous-induced doe—and allowing the buck 5 min to ejaculate. The ejaculation latency and the percentage of bucks that ejaculated and the percentage of active males (bucks that attempted to ejaculate at least twice, but did not achieve ejaculation within 5 min), were recorded.

2.5. Statistical analyses

For each experiment, the effects of treatment on LW, TW and plasma testosterone concentrations were submitted to an ANOVA, for repeated measures. When treatments by time (week) interactions were recorded, treatment effects within time were analysed using the Tukey *t*-test. Results for the other studied variables were analysed using an analysis of variance (ANOVA). When differences between months or treatments (Experiment 1) were recorded, the Tukey *t*-test was applied. The percentage of bucks that ejaculated and the percentage of active males were compared using a χ^2-test. Analyses of data were computed using the SPSS package (SPSS, 2006).

3. Results

3.1. Experiment 1

3.1.1. Live body weight (LW) and testicular weight (TW)

The statistical analyses for repeated measures showed a definite time effect ($P < 0.001$), but the changes occurred

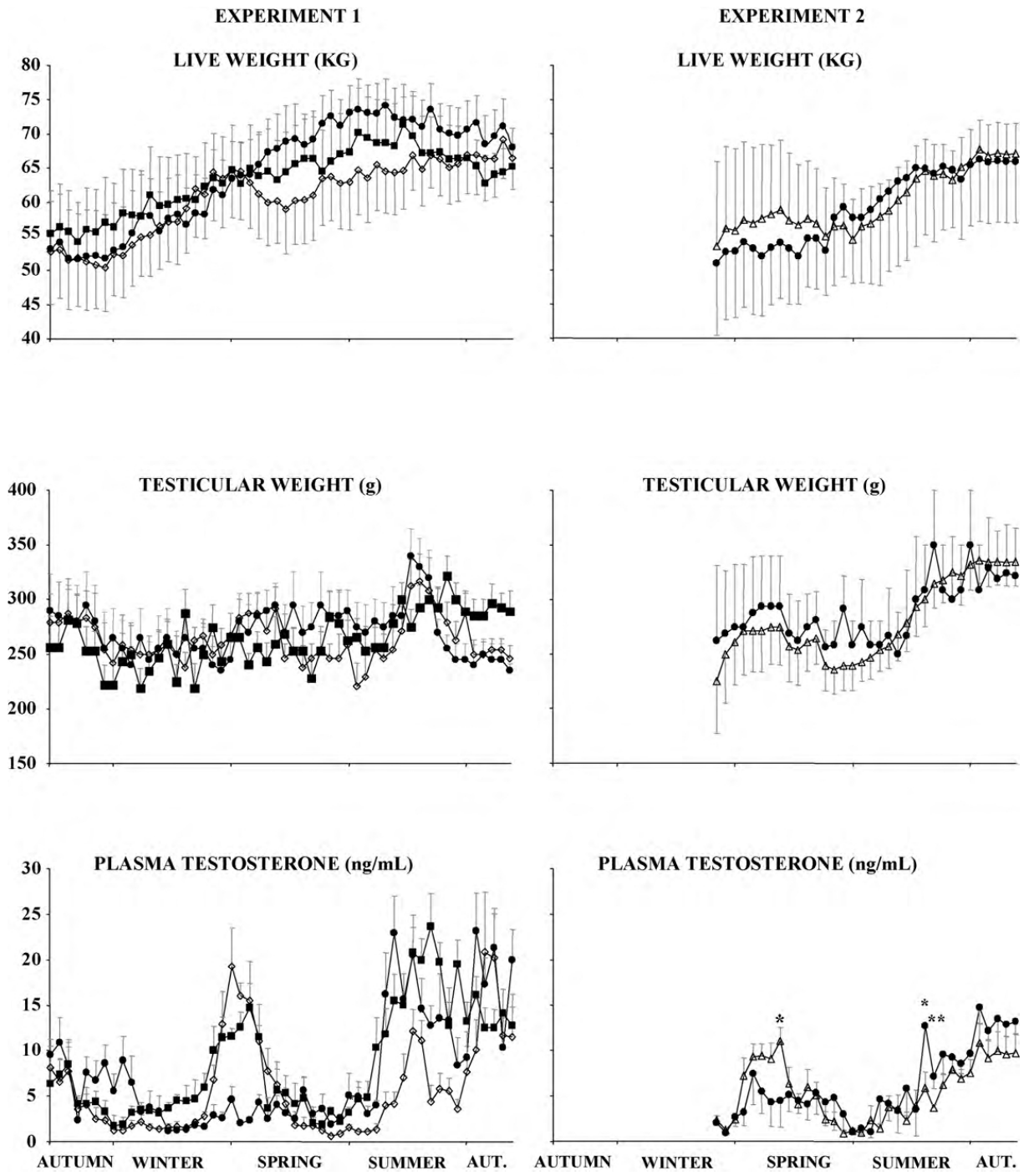


Fig. 1. Weekly means (±S.E.M.) of different variables in Mediterranean bucks subjected to natural changes in day length (●); to artificially long days followed either by natural photoperiod (■), or then treated with melatonin (◊) (left panel). The right panel shows the variables of Mediterranean bucks subjected to natural changes in daylength, treated (△) or not (●) with melatonin. *Indicate significant differences between groups (*$P<0.05$; **$P<0.01$).

at different times in the groups (group × week interactions, $P<0.05$ for LW) (Fig. 1). During March and April (spring) the LW of the LD-M group clearly decreased (−57.3 ± 19.6 g/day) or was relatively stable for the LD treatment (41.0 ± 33.3 g/day), whereas the C1 group increased (118.8 ± 22.6 g/day) ($P<0.001$). Later, from July (summer) to the end of the experiment the LD and C1 groups recorded losses in LW (−74.1 ± 22.9 g/day and −41.9 ± 12.4 g/day for the LD and C1 groups, respectively), while the LD-M group maintained a stable LW (28.6 ± 19.8 g/day) ($P<0.01$).

Weekly changes in TW (Fig. 1) ($P<0.001$), and group × time interactions were recorded ($P<0.001$). During March the LD group decreased in TW (−0.32 ± 0.18 g/day), while the LD-M and C1 groups increased (0.63 ± 0.27 g/day and 1.10 ± 0.15 g/day for LD-M and C1 group, respectively) ($P<0.001$). No differences in TW between groups were recorded until August, when the TW of the LD-M and C1 groups decreased (−0.90 ± 0.29 g/day and −2.18 ± 0.51 g/day for the LD-M and C1 groups respectively), while the LD bucks maintained their TW (0.20 ± 0.12 g/day) ($P<0.001$).

Table 1
Mean (±SEM) time of end of the reproductive activity (A); onset (B) and end (C) of the reproductive activity after treatment and onset of the natural reproductive season (D) of Mediterranean bucks.

Variable	C1 group ($n=5$)	LD group ($n=7$)	LD-M group ($n=7$)
A	December 23 (±11.4 days)[a]	November 27 (±4.3 days)[b]	November 25 (±7.0 days)[b]
B		March 4 (±4.0 days)[a]	March 13 (±2.4 days)[a]
C		April 13 (±6.0 days)[a]	April 25 (±7.2 days)[a]
D	July 16 (±6.1 days)[c]	July 13 (±4.3 days)[c]	September 6 (±14.6 days)[d]

Means with different superscripts (a–d) within the same column are significantly different ([a,b]$P<0.05$; [c,d]$P<0.01$).

3.1.2. Plasma testosterone concentration

Treated bucks recorded an earlier onset of the anestrous period (Table 1), i.e. the interval between the dates of the onset of the experiment and the onset of the anestrous period was significantly ($P<0.05$) shorter in LD-M (10.0 ± 4.3 days) and LD (11.0 ± 7.0 days) groups, compared to the C1 group (39.6 ± 11.4 days).

No differences between groups were recorded regarding the plasma testosterone concentrations, but there was a significant effect of time and a significant group × week interaction ($P<0.001$) (Fig. 1). An increase in plasma testosterone concentrations was observed in the LD-M and LD groups during the natural non-breeding season March and April (spring). However, none of the bucks in the control group showed an increase in plasma testosterone concentration above the base line level during this period. A second increase in plasma testosterone concentration was observed during the natural reproductive or breeding season—being earlier in the LD and in the C1 groups, than in the LD-M group (Table 1).

3.1.3. Sexual behaviour

A significant effect in the treatment groups (49.6 ± 2.7 s, 67.2 ± 3.1 s and 58.6 ± 3.3 s LD-M, LD, and C1 groups, respectively, $P<0.001$) regarding month effect and interaction between group and month ($P<0.001$) on ejaculation latency (Fig. 2) was recorded. In the control group the ejaculation latency was high in February (winter), but remained at low frequencies for the treated groups. In contrast, between August to the end of the experiment the LD group showed the highest levels of all the groups, for the entire experiment ($P<0.05$).

There were differences between groups in the percentage of bucks that ejaculated ($P<0.001$). Moreover, a significant month effect ($P<0.01$) and group × month interaction was also recorded ($P<0.001$) (Fig. 2). Similarly, for the active males, there were highly significant differences between treatments (89 ± 1.7%, 71 ± 2.4%, and 88 ± 1.9% for LD-M, LD, and C1 groups, respectively, $P<0.001$), and a marked effect by month ($P<0.001$).

3.1.4. Semen characteristics

The ejaculate volume was positively ($P<0.01$) affected by the treatments (1.16 ± 0.04 mL, 1.16 ± 0.04 mL, and 1.08 ± 0.04 mL, for LD-M, LD, and C1 groups, respectively) (Fig. 2). The highest semen concentration and the total number of sperm per ejaculate (Fig. 2) during the entire experiment was recorded in the LD group (effect of group $P<0.001$) (6346.4 ± 150.1 × 10^6 sperm/mL and 6859.8 ± 264.8 × 10^6 sperm/ejaculate)—with no significant differences recorded between the other two groups. Similarly, these two parameters varied with month ($P<0.001$), and there was a marked interaction between treatment and month ($P<0.001$) (Fig. 2).

3.2. Experiment 2

3.2.1. Live (LW) and testicular weight (TW)

The statistical analyses for repeated measures showed a significant effect of week on TW ($P<0.05$) (Fig. 1). The lowest values were recorded during June (late spring) and the highest values, during September and October (autumn) ($P<0.05$).

3.2.2. Plasma testosterone concentration

The plasma testosterone concentration varied throughout the study in both groups ($P<0.001$), but the treatment with melatonin modified the timing of these differences (group × week interaction) ($P<0.05$; Fig. 1). The mean plasma testosterone concentration was significantly higher in the M, than the C2 group in April 2006 (spring), and in the C2 than the M group in August 2006 (summer) ($P<0.05$).

The mean plasma testosterone concentration showed that, during the natural non-breeding season, exogenous melatonin induced reproduction activity, which started on 3 April 2006 (±1.5 days) and ended on 24 May 2006 (±4.7 days) (spring). Melatonin treatment effectively increased the plasma testosterone concentration in 100% of the bucks, while none of the control bucks showed an increase above 5 ng/mL.

3.2.3. Sexual behaviour

The mean ejaculation latency (Fig. 3) during the entire experiment was higher in the M group, compared to the C2 group (95.6 ± 7.5 s vs 43.9 ± 7.7 s for M and C2 groups, respectively, $P<0.01$). The monthly percentages of males that ejaculated and males considered sexually active (Fig. 3), were not statistically affected by the melatonin treatment, although there were marked differences between months ($P<0.001$).

3.2.4. Semen characteristics

Ejaculate volume (Fig. 3) was positively affected by the melatonin treatment (1.04 ± 0.07 mL vs 0.77 ± 0.05 mL, for M and C2 groups, respectively; $P<0.01$).

The mean semen concentration and total sperm per ejaculate, were significantly different between groups (5542.4 ± 226.8 × 10^6 sperm/mL and 5531.9 ± 356.4 × 10^6 sperm/ejaculate vs 4235.6 ± 223.4 × 10^6 sperm/mL and 3452.1 ± 315.2 × 10^6 sperm/ejaculate, for the M and

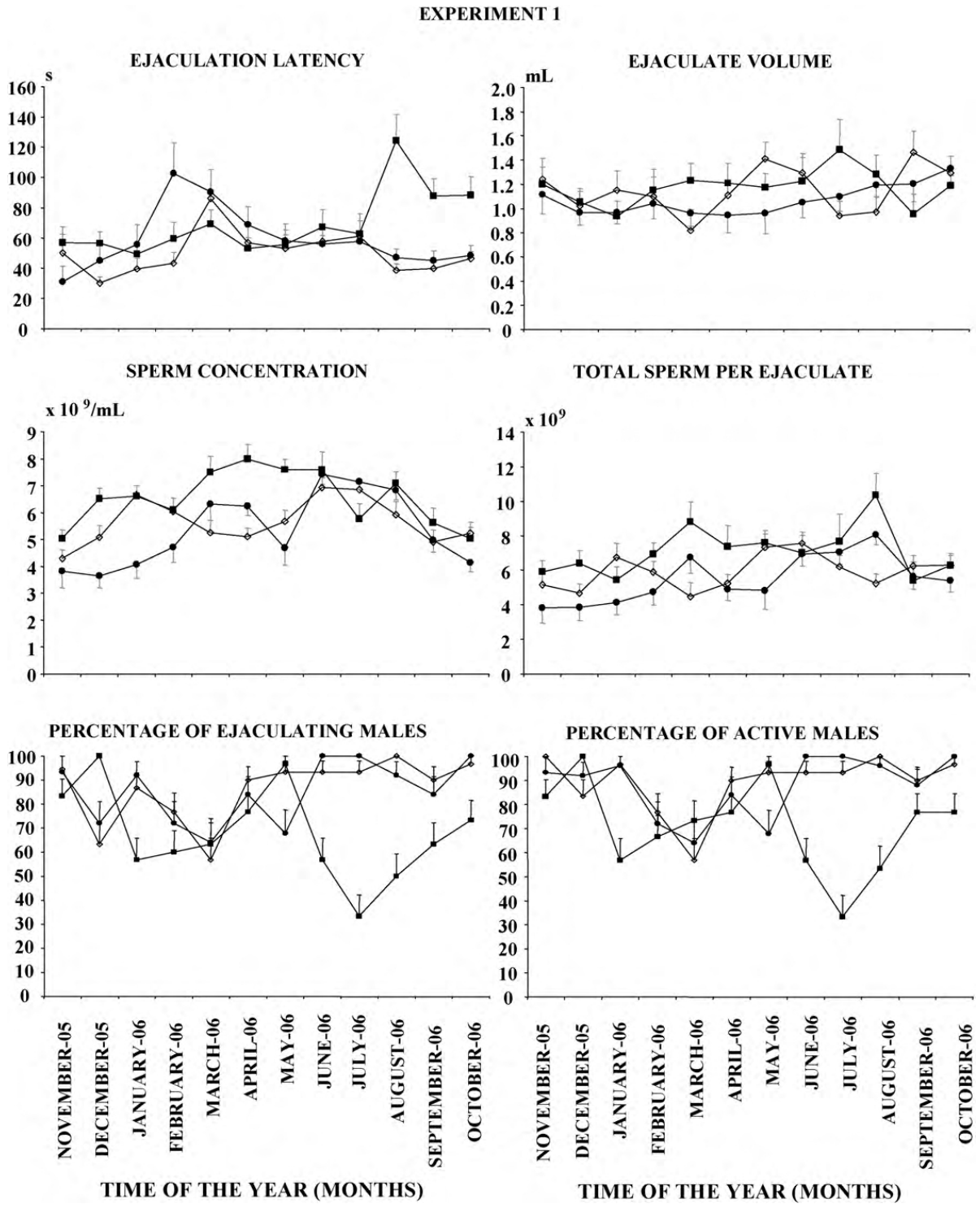


Fig. 2. Monthly means (±S.E.M.) of different variables in Mediterranean bucks subjected to natural changes in day length (●); to artificially long days followed either by natural photoperiod (■), or then treated with melatonin (◊).

C2 groups, respectively, $P < 0.001$). Differences between months were also recorded ($P < 0.05$) (Fig. 3).

4. Discussion

This research team has previously demonstrated that at the same latitude, in the Payoya goat (an endangered Spanish breed), bucks displayed large seasonal differences in their reproductive activity—independent of the level of nutrition. These results suggest that other environmental factors are involved in the seasonal changes of reproductive activity in these animals (Zarazaga et al., 2009b). In other Mediterranean goat breeds, seasonality in the circulating plasma testosterone levels was affected by breed and not so much by environmental factors, other than photoperiod and climate (Todini et al., 2007). The focus here was to find a treatment that effectively reduced this seasonality and could be applied in controlled goat breed-

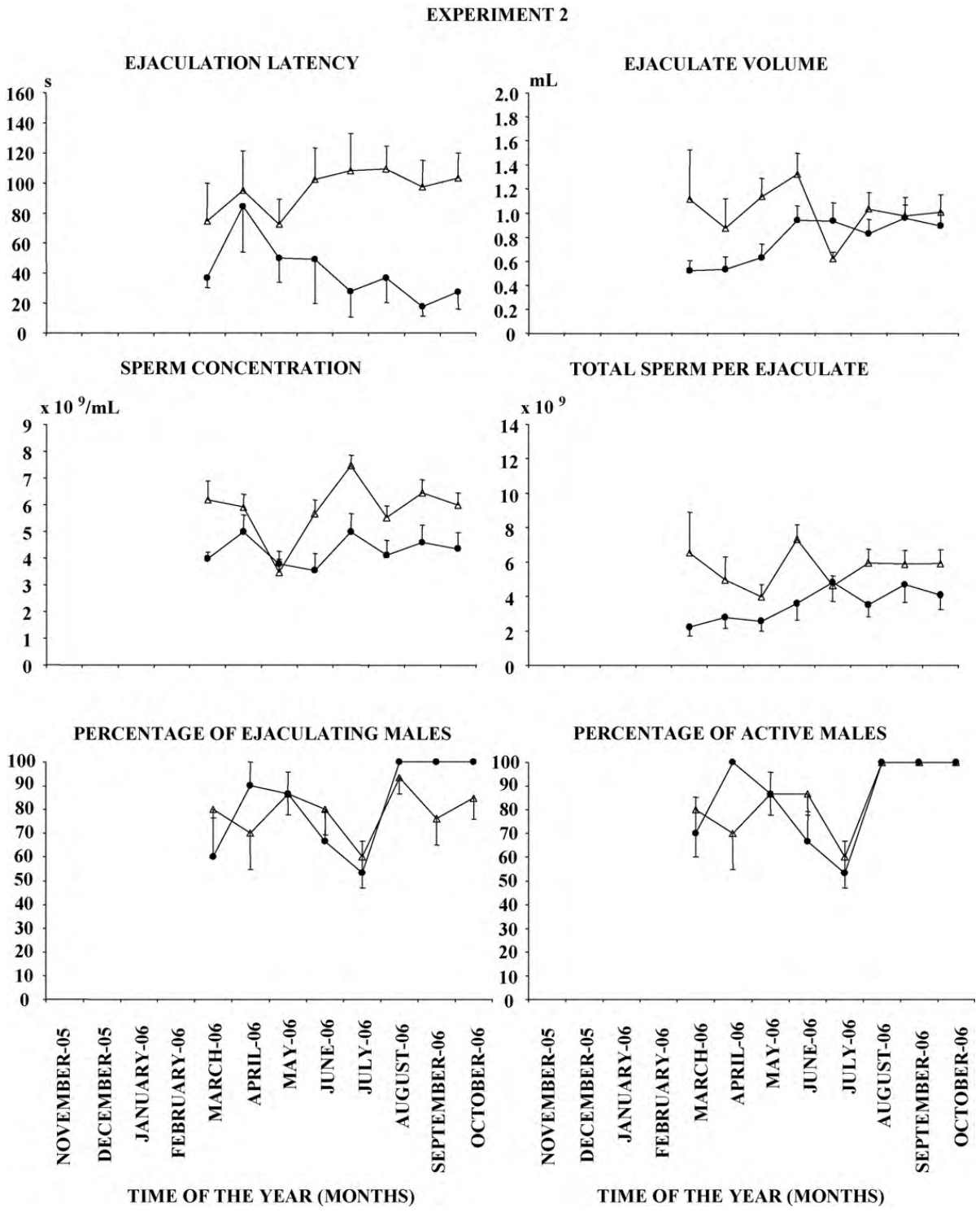


Fig. 3. Monthly means (± S.E.M.) of different variables in Mediterranean bucks subjected to natural changes in daylength, treated (△) or not (●) with melatonin.

ing. Results demonstrated that treatments with artificial long days and/or melatonin, were effective in inducing significant changes in plasma testosterone secretion—with a marked increase in the concentration of this hormone during the natural non-breeding (anestrous) season, at this latitude. At the same time, the presence of males that were active (according to the plasma testosterone concentrations), did not increase the plasma testosterone levels in the control bucks in either experiments. Despite the increase in plasma testosterone levels the long day-only treatment significantly reduced the percentage of ejaculating or sexually active males, during the subsequent natural reproductive season.

In the second experiment, the melatonin implant, (simulating short days), to be effective necessitates that the animal perceives a number of long or lengthening days prior to treatment. Such a period of increasing long days, between the winter solstice and the spring equinox, has

been demonstrated under similar conditions to those of the current experiment, to be effective in inducing reproductive activity, in sheep and goats (Zarazaga et al., 1996). It has been shown that at higher latitudes the melatonin implant must be inserted later in the year, closer to the summer solstice (Chemineau et al., 1996).

All treatment groups showed a seasonal pattern of live weight changes that can be associated with their reproductive activity (Delgadillo et al., 1991; Walkden-Brown et al., 1994a; Zarazaga et al., 2005, 2009b). In general, live weight gains were recorded when the animals were reproductively inactive. Decreases in live weight were observed in all the groups (despite the fact that they were fed to maintain live body weight) and occurred 3–4 weeks after plasma testosterone concentrations started to increase—similar to a previous report (Zarazaga et al., 2009b). This tendency does not seem to be a direct result of the action of photoperiod, as has been suggested (Barenton et al., 1988). It would rather seem to be due to the reduced feed intake and the probably greater activity as a consequence of an intense sexual activity, as reported in cashmere bucks (Walkden-Brown et al., 1997). The live weight of the long day group showed a pattern similar to the untreated group. The reason for this may be the very low percentage of males that ejaculated and were sexually active. These percentages were lower than in any other group in the entire experiment, probably due to the very high individual variation observed in the behaviour of the animals and the determined lower variations in live weight.

The reproductive activity of the control groups was clearly seasonal, which confirms previous results in Spanish goat bucks, under the same conditions and a similar protocol (Zarazaga et al., 2009b). In the two experiments, the period of sexual quiescence was very similar. The period was characterised by a low plasma testosterone concentration and testicular weight between January (winter) and July (summer), likely induced by the high interval to ejaculation for the period February (late winter) to April (spring), and the low percentage of ejaculation or sexually active males between February and May (spring).

In the treated groups, the reproductive variables showed different patterns to those in the control groups. The increase in plasma testosterone concentration during the anestrous season was significant, similar to the results reported by Delgadillo et al. (2001) and Ramadan et al. (2009). These results indicate that the treatment with long days only from November 14 (autumn) until February 20 (winter), with or without the use of melatonin implants or the use of melatonin implants around the spring equinox, was able to increase the plasma testosterone concentration.

The increase in plasma testosterone concentration, during the first experiment, occurred 17.6 ± 3.9 days and 21.5 ± 2.4 days after the end of the long day treatment, or insertion of the melatonin implants, respectively. In the second experiment it occurred 16.3 ± 1.5 days after the implant insertion. In Creole bucks under sub-tropical conditions, Delgadillo et al. (2001) reported a response in circulating testosterone concentration to melatonin implant treatment 5 weeks after implant insertion, using similar methodology. The explanation for this difference could be that in the first experiment the long day treatment was slightly longer and finished later in the year. Another reason could be that the sensitivity to the photoperiod was different between the latitudes and breeds used. Increases in mean blood testosterone values in rams after exogenous melatonin administration, have been attributed to the effect of melatonin on the hypothalamus–hypophysis axis, with a subsequent increase in LH secretion (Arendt, 1995).

After this increase during the anestrous season, plasma testosterone concentration in the treated groups reached a basal level. Probably due to the refractoriness to the stimulatory short days signal, provided by the melatonin implants, in the long day melatonin and melatonin groups (Almeida and Lincoln, 1984; Lincoln and Ebling, 1985), or the inhibitory signal of the increasing days after the long day treatment (Malpaux et al., 1989).

Plasma testosterone profiles showed a significant delay in the onset of the following natural breeding season for the long day melatonin-treated bucks, as previously reported by Delgadillo et al. (2001)—as the melatonin implants, until its exhaustion, delayed the perception of the natural long days. On the other hand, Delgadillo et al. (2002) observed such a delay both in long day melatonin and long day—only treated bucks. This discrepancy in the results obtained could be due to the different photoperiod signals perceived under the sub-tropical conditions—where the change in daylight length between the winter solstice and the spring equinox is about 1 h 40 min and at the current latitudes in this trial, was 2 h 34 min. It is therefore hypothesized that the higher decrease between the artificially long days and the natural short days on February 20 (11 h 03 min of light at current latitudes) could be effective in the long day treated bucks—to reset the reproductive seasonality during the non-breeding season. However, daylight length increased progressively after the long day treatment and therefore provided a potentially inhibitory signal, similar to the controls (Malpaux et al., 1989).

Testicular weight showed a similar, but delayed pattern, to that of the plasma testosterone concentrations, but did not differ between groups. The absence of differences in testicular weight could be the result of the effects of treatments on testosterone secretion and diet intake. In the control bucks, an increase in diet intake during the non-breeding season may increase live weight and testicular weight, independently of the LH secretion (Walkden-Brown et al., 1994a,b). On the other hand, during the reproductive season, diet intake decreased (short daylength and high plasma testosterone concentration), resulting in a reduced live body weight and, as a consequence, testicular weight—as reported for cashmere bucks and Soay rams (Walkden-Brown et al., 1997; Lincoln, 2001). In the treated groups, the increased out-of-season testosterone secretion, probably caused a decrease in diet intake, live weight and testicular weight gain. Moreover, the sharp increase in plasma testosterone concentration in the treated groups probably enhanced the inhibition of the LH release via the testosterone negative feedback mechanism—which may also have added to the reduction in testicular size (Delgadillo and Chemineau, 1992).

Ejaculate volume in all treated groups, semen concentration and the total number of sperm in long day

and melatonin groups increased, when compared to the controls—as previously reported in rams by Chemineau et al. (1988) and bucks (Delgadillo et al., 1991). This phenomenon can be explained in two ways. The first explanation could be the longer period of time during which the testes of the treated bucks produce sperm at the maximal level. The second explanation may be that the altering between long and short days (melatonin implants) stimulated the differentiation of A0 into A1 spermatogonia—thus increasing the FSH secretion and the sensitivity of the Leydig cells to LH (Langford et al., 1987). The fact that the long day group had the highest sperm concentration and total number of sperm per ejaculate may be due to the lower percentage of males in this group ejaculating. It has been shown that the highest sperm concentrations are recorded during spring (non-breeding season), when there is a reduction in the number of animals that ejaculate (Zarazaga et al., 2009b).

With regard to the sexual behaviour of bucks, the long day group showed a lower percentage of bucks that ejaculated or were active, compared with the other groups. Although the animals were allotted randomly, from the onset of the experiment, this group was characterised by a lower percentage of males that ejaculated. Furthermore, the inhibitory effect of increasing daylight length perceived after the artificial long days, could cancel the stimulation obtained by the phase shifting the endogenous rhythm, caused by the shorter photoperiod. A similar phenomenon has been recorded in does (Zarazaga et al., 2008). After a long day treatment, a small percentage of females showed sexual or ovarian activity, during the non-breeding season or anestrus. Therefore, at Mediterranean latitudes, a long day treatment is probably needed beforehand (around the winter solstice), when the days are shorter (December 21—with a minimum of 9 h 34 m light) and there still exists at least one and a half months of very short days.

5. Conclusions

The results of the present study demonstrate that all treatments used were able to increase the plasma testosterone concentration during the natural anestrous season (spring) at the current latitude. The control groups, although in contact with the treated bucks, did not show an increase in the concentrations of testosterone during this period. The treatment of long day and melatonin induced a delay in the onset of the natural reproductive (breeding) season. Finally the treatment with only long day seems to be least effective, measured by the percentages of males that ejaculated or were sexually active.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Assay Laboratory of the Station de Physiologie de la Reproduction et des Comportements (INRA, Nouzilly, France) for the RIA. This work was supported by Grant PETRI 95-0964.OP from C.I.C.Y.T. (Spain). The authors are grateful to CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain, for providing Melovine® implants.

References

Almeida, O.F.X., Lincoln, G.A., 1984. Reproductive photorefractoriness in rams and accompanying changes in the patterns of melatonin and prolactin secretion. Biol. Reprod. 30, 143–158.
Arendt, J., 1995. Physiology of pineal role in photoperiodic seasonal functions. In: Arendt, J. (Ed.), Melatonin and Mammalian Pineal Gland. Chapman and Hall, London, pp. 110–158.
Barenton, B., Ravault, J.P., Chabanet, C., Daveau, A., Pelletier, J., Ortavant, R., 1988. Photoperiodic control of growth hormone secretion on body weight. Dom. Anim. Endocrinol. 5, 255–274.
Chemineau, P., Normant, E., 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.
Chemineau, P., Pelletier, J., Guérin, Y., Colas, G., Ravault, J.-P., Touré, G., Almeida, G., Thimonier, J., Ortavant, R., 1988. Photoperiodic and melatonin treatments for the control of seasonal reproduction in sheep and goats. Reprod. Nutr. Dev. 28, 409–422.
Chemineau, P., Malpaux, B., Pelletier, J., Leboeuf, B., Delgadillo, J.A., Deletang, F., Pobel, T., Brice, G., 1996. Use of melatonin implants and photoperiodic treatments to control seasonal reproduction in sheep and goats. INRA Prod. Anim. 9, 45–60 (In French, with English abstract).
Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P., 1991. Decrease in the seasonality of sexual behaviour and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. Theriogenology 36, 755–770.
Delgadillo, J.A., Chemineau, P., 1992. Abolition of the seasonal release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. J. Reprod. Fertil. 94, 45–55.
Delgadillo, J.A., 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. J. Anim. Sci. 79, 2245–2252.
Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Véliz, F.G., Hernández, H.F., Duarte, G., Vielma, J., Poindron, P., Chemineau, P., Malpaux, B., 2002. Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. J. Anim. Sci. 80, 2780–2786.
Garnier, D.H., Cotta, Y., Terqui, M., 1978. Androgen radioimmunoassay in the ram: results of direct plasma testosterone and dehydroepiandrosterone measurement and physiological evaluation. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 18, 265–281.
Gerlach, T., Aurichr, J.E., 2000. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. Anim. Reprod. Sci. 58, 197–213.
Hanif, M., Williams, H.L.I., 1991. The effects of melatonin and light treatment on the reproductive performance of yearling Suffolk rams. Br. Vet. J. 147, 49–56.
Haresign, W., Peters, A.R., Stables, L.D., 1990. The effect of melatonin implants on breeding activity and litter size in commercial sheep flocks in the UK. Anim. Prod. 50, 111–121.
Langford, G.A., Ainsworth, L., Marcus, G.J., Shrestha, J.N.B., 1987. Photoperiod entrainment of testosterone, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin cycles in rams in relation to testis size and semen quality. Biol. Reprod. 31, 489–499.
Lincoln, G.A., 1980. Photoperiodic control of seasonal breeding in rams. The significance of short-day refractoriness. In: VI Inter. Congr. of Endocrinol., pp. 283–287.
Lincoln, G.A., 2001. The irritable male syndrome. Reprod. Fertil. Dev. 13, 567–576.
Lincoln, G.A., Ebling, F.J.P., 1985. Effect of constant-release implants of melatonin on seasonal cycles in reproduction, prolactin secretion and moulting in rams. J. Reprod. Fertil. 73, 241–253.
Malpaux, B., Robinson, J.E., Wayne, N.L., Karsch, F.J., 1989. Regulation of the onset of the breeding season of the ewe: importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. J. Endocrinol. 122, 269–278.
Minneman, K.P., Wurtmann, R.J., 1975. Effects of pineal compounds on mammals. Life Sci. 17, 1189–1200.
Morand-Fehr, P., Sauvant, D., 1988. Goat nutrition. In: Jarrige, R. (Ed.), Alimentation des Bovins, Ovins et Caprins. INRA, Paris, pp. 281–304.
Oldham, C.M., Adams, N.R., Gherardi, P.B., Lindsay, D.R., McKintosh, J.B., 1978. The influence of level of food intake on sperm-producing capacity of testicular tissue in the ram. Aust. J. Agric. Res. 29, 173–179.
Ramadan, T.A., Taha, T.A., Samak, M.A., Hassan, A., 2009. Effectiveness of exposure to longday followed by melatonin treatment on semen characteristics of Damascus male goats during breeding and non-breeding seasons. Theriogenology 71, 458–468.
Robinson, J.E., Karsch, F.J., 1984. Refractoriness to inductive daylengths terminates the breeding season of the Suffolk ewe. Biol. Reprod. 2, 656–663.

Robinson, J.E., Wayne, N.L., Karsch, F.J., 1985. Refractoriness to inhibitory day lengths initiates the breeding season of the Suffolk ewe. Biol. Reprod. 32, 1024–1030.

SPSS, 2006. Manual del Usuario Version 15.0. SPSS Inc., Chicago, p. 779.

Todini, L., Malfatti, A., Terzano, G.M., Borghese, A., Pizzillo, M., Debenedetti, A., 2007. Seasonality of plasma testosterone in males of four Mediterranean goat breeds and in three different climatic conditions. Theriogenology 67, 627–631.

Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Norton, B.W., Scaramuzzi, R.J., Martin, G.B., 1994a. 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.

Walkden-Brown, S.W., Norton, B.W., Restall, B.J., 1994b. Seasonal variation in voluntary feed intake and growth in cashemere bucks fed ad libitum of low and high quality. Aust. J. Agric. Res. 45, 355–366.

Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Scaramuzzi, R.J., Martin, G.B., Blackberry, M.A., 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 Rumin. Res. 26, 237–250.

Woodfill, C.J.I., Wayne, N.L., Moenter, S.M., Karsch, F.J., 1994. Photoperiodic synchronization of a circannual reproductive rhythm in sheep: identification of season-specific time cues. Biol. Reprod. 50, 965–976.

Zarazaga, L.A., Forcada, F., Abecia, J.A., Lozano, J.M., 1996. Date of reinitiation of the breeding season could be related with relative changes in plasma melatonin amplitude in ewes. In: Webb, S.M., Puig-Domingo, M., Moller, M., Pévet, P. (Eds.), Pineal Update. From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. PJD Publications Ltd, Westbury, USA, pp. 295–300.

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., Gatica, M.C., Guzmán, J.L., Celi, I., 2008. The use of artificial long days is not effective to induce reproductive activity in Mediterranean goat does without isolation from males. 16th International Congress of Animal Reproduction, Budapest (Hungary), 13–17 July 2008. Reprod. Dom. Anim. 43 (s3), 89.

Zarazaga, L.A., Gatica, M.C., Celi, I., Guzmán, J.L., Malpaux, B., 2009a. Effect of melatonin implants on sexual activity in Mediterranean goat females without separation from males. Theriogenology 72, 910–918.

Zarazaga, L.A., Guzmán, J.L., Domínguez, C., Pérez, M.C., Prieto, R., 2009b. Effects of season and feeding level on reproductive activity and semen quality in Payoya buck goats. Theriogenology 71, 1316–1325.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

En todos los experimentos en los que se controló el peso vivo (objetivos 1, 2 y 3, de hembras), y en el primer ensayo del objetivo 5, se observaron variaciones en el peso vivo asociadas a su actividad reproductiva, a pesar de que, en todos los casos, los animales fueron alimentados con la misma dieta que permitía mantener su peso vivo. Este comportamiento ha sido ya descrito en esta especie (Delgadillo *el al.*, 1991; Walkden-Brown *et al.,* 1994a; Delgadillo *et al.,* 1999; Zarazaga *et al.,* 2005). Estos cambios ocurrieron de manera diferente entre los grupos tratados y los controles, debido a la interacción encontrada entre tratamiento y tiempo. En general, las ganancias de peso vivo fueron observadas cuando los animales estaban reproductivamente inactivos y las pérdidas de peso fueron observadas en todos los grupos cuando estaban activos sexualmente. Estos resultados no parecen ser un efecto directo de la acción del fotoperiodo, como sugiere Barenton *et al.* (1988), de tal forma que la ganancia de peso es estimulada por los días largos e inhibida por los días cortos, sino que más bien podrían ser debidos a una reducción de la ingestión de alimento (Argo *et al.,* 1999; Marie *et al.*, 2001). Así, las concentraciones de esteroides más altas registradas durante la época de actividad reproductiva inhiben la ingesta voluntaria de alimento (Newman *et al.,* 1992; Walkden- Brown *et al.,* 1997) y el cambio del estado metabólico durante el año (Walkden-Brown *et al.,* 1997). Otra posibilidad podría ser el aumento de su actividad física como consecuencia de una actividad sexual más intensa, tal como ha sido descrito en machos Cashmere australianos (Walkden-Brown *et al.,* 1997).

Ha quedado claro que el fotoperiodo es un factor medioambiental que controla la actividad reproductiva en caprinos Mediterráneos. Este hecho ha sido observado en los experimentos en los que las hembras y los machos habían sido sometidos a tratamiento de fotoperiodo de días largos durante tres meses (objetivos 2, 3 y 5). De manera que el tratamiento con fotoperiodo artificial produjo, en los lotes de animales sometidos a dicho tratamiento, un inicio más temprano del anestro estacional, observado tanto al analizar la actividad ovárica (concentraciones de progesterona) como por la actividad estral como por las concentraciones de testosterona, con respecto a los lotes control.

Respecto a la colocación de implantes de melatonina entorno al equinoccio de primavera, en las hembras ovariectomizadas e implantadas con estradiol, se ha

observado que modifica el patrón de secreción de la LH, reflejando los cambios en la actividad reproductiva de las hembras enteras tratadas con melatonina en relación a las hembras control. De este modo, se observa un periodo de incremento de las concentraciones de LH durante el anestro estacionario, y un segundo incremento coincidente con el inicio de la época de actividad reproductiva natural. Igualmente, en ese mismo experimento, las concentraciones de progesterona del grupo de cabras enteras tratado con melatonina se incrementaron durante el periodo de anestro estacionario, mientras que durante ese periodo el lote control presentaba unas concentraciones de progesterona basales; este grupo también presentó un segundo incremento coincidente con el inicio de la época de actividad reproductiva natural. Estos hechos demostrarían la efectividad de los implantes colocados durante el equinoccio de primavera en nuestras latitudes. Además, demuestran la necesidad de que exista un periodo de días crecientes previo al tratamiento, entre el solsticio de invierno y el equinoccio de primavera, tal como ha sido descrito en nuestras latitudes en ovejas (Zarazaga *et al.,* 1996a); aunque en latitudes más altas, el implante de melatonina es insertado más próximo al solsticio de verano, tanto en ovino como caprino (Chemineau *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos en hembras ovariectomizadas e implantadas con estradiol contrastan con los obtenidos por Forcada *et al.* (2002), en ovejas, quienes observaron, con el mismo modelo experimental, que el implante de melatonina fue incapaz de inducir actividad hipofisaria durante el periodo de anestro estacionario antes del periodo de actividad reproductiva natural. Esto podría sugerir que ambas especies pueden diferenciarse en cuanto a su sensibilidad frente al fotoperiodo o a los implantes de melatonina.

El aumento en las concentraciones de LH o progesterona fue muy rápido tras la inserción del implante (30,3 ± 10,2 días y 31,5 ± 2,82 días, para el aumento de las concentraciones de LH y progesterona, respectivamente). Esto contrasta con los resultados obtenidos por Chemineau *et al.* (1986b), quienes no observaron actividad ovulatoria hasta 71 días después de la inserción del implante, coincidiendo con el momento en el que se introdujeron los machos. Este aumento de los valores medios de LH puede ser atribuido al efecto del implante de melatonina sobre el eje hipotálamo-hipofisario (Forcada *et al.,* 1999). Tras este primer efecto, las concentraciones de LH y progesterona, en los animales implantados con melatonina, volvieron a niveles basales

probablemente debido a un efecto de fotorrefractariedad a los días cortos causado por la melatonina (Almeida y Lincoln, 1984; Lincoln y Ebling, 1985).

Es importante destacar que la actividad reproductiva que se generó durante el periodo de anestro estacionario, producto del implante de melatonina, se obtuvo sin separación de machos y hembras. Estos resultados son observados por primera vez, de acuerdo a todos los datos consultados en la bibliografía. Hasta ahora, sólo había resultados similares pero obtenidos en ovejas implantadas un mes más tarde que en nuestro experimento (Forcada *et al.,* 1995), en las que no se indujo actividad reproductiva durante el anestro estacionario, pero sí mostraron, sin embargo, un inicio más temprano del periodo de actividad reproductiva natural.

En cuanto al porcentaje de respuesta en cabras tratadas (el 85,7% de las hembras mostraron celos), nuestro resultado es similar al obtenido en cabras Alpinas en una latitud más alta (Pellicer-Rubio *et al.,* 2007) y en cabras Damasco tratadas con melatonina en mayo (primavera) (Paparichristoforou *et al.,* 2007), aunque en ambos casos con efecto macho. Sin embargo, Chemineau *et al.* (1992a), trabajando con cabras Alpinas tratadas sólo con melatonina, obtuvieron una ciclicidad de sólo el 46 % después de la introducción de los machos. Además, nuestros resultados encontrados en el grupo de hembras control contrastan con los obtenidos por Restall *et al.* (1995), quienes mostraron que hembras en celo pueden inducir la ovulación en hembras que previamente estaban anovulatorias, obteniendo un 83% de celos por simpatía. Este efecto hembra no ha sido estudiada previamente en caprinos Mediterráneos.

La reactivación de la actividad ovárica y de los celos, en las hembras enteras implantadas con melatonina, y de la secreción de LH, en las hembras ovariectomizadas, en la siguiente época de actividad reproductiva natural, a pesar del retraso que se observó en relación al grupo control, fue similar a la descrita por Zarazaga *et al.* (2005). Este retraso podría deberse al tratamiento con melatonina exógena. Así, el momento de inicio de la actividad reproductiva en otoño depende del tiempo de exposición a los días largos tras el solsticio de invierno (Malpaux *et al.,* 1989). De este modo, como para percibir los días largos naturales el implante tenía que agotarse, este hecho retrasó la exposición a los días largos y retardó el inicio de la actividad reproductiva en los animales implantados.

La ausencia de efecto del implante de melatonina encontrado sobre la tasa de ovulación es similar a lo descrito por McEvoy *et al.* (1998) y contrasta con otros resultados previos (Robinson *et al.,* 1991; Forcada *et al.,* 1995).

En cuanto al efecto del tratamiento con fotoperiodo artificial de días largos (16 horas de luz) durante tres meses y posterior implante de melatonina (DL-M), sin separación de los machos, la actividad reproductiva inducida durante el periodo de anestro estacionario, en latitudes Mediterráneas, demuestra la efectividad del tratamiento. Véliz *et al.* (2006) sugieren que el aislamiento previo de hembras inactivas sexualmente de machos para estimular su actividad reproductiva por medio del efecto macho puede no ser necesario si los machos que se introducen están activos sexualmente. No obstante, con respecto a los resultados obtenidos en latitudes Mediterráneas, esta afirmación podría no ser aplicable porque, en todos nuestros experimentos (objetivos 1, 2 y 3), la detección de celos se realizó con machos activos sexualmente y ninguna hembra mostró actividad estral. Otro factor que podría estimular la actividad reproductiva de las hembras no tratadas es la presencia de hembras en celo. Walkden-Brown *et al.* (1993c) observaron que el 87% de las cabras respondían al efecto macho cuando otras hembras en celo estaban presentes en el momento de la introducción de los machos frente al 72% en ausencia de estas hembras. De hecho, la presencia de un reducido número de ovejas o cabras en celo puede inducir actividad sexual en el resto de hembras, incluso en ausencia de machos (Bouillon *et al.*, 1982; Restall *et al.*, 1995). Sin embargo, en este estudio, al igual que sucedió en el primer experimento con la aplicación exclusiva de implantes de melatonina, ninguna hembra del lote control mostró actividad estral u ovárica, independientemente de que estuvieran en contacto con machos o hembras activas sexualmente.

Junto con los datos obtenidos en el primer objetivo, estos resultados son los primeros, descritos en cabras implantadas con melatonina, en las que dicho tratamiento no ha sido asociado a efecto macho, práctica habitual en las explotaciones cuando se lleva a cabo este tratamiento. Los únicos resultados en la bibliografía que muestran la efectividad de los implantes de melatonina, sin separación de los machos, son los obtenidos en ovejas por Forcada *et al.* (1995). En ese caso, las hembras tratadas no mostraron actividad reproductiva durante el anestro estacional pero mostraron un inicio más temprano de la nueva época de actividad reproductiva.

La reactivación de la actividad ovárica en la nueva época de actividad reproductiva, en función de las concentraciones plasmáticas de progesterona, fue, al igual que en el objetivo 1, más tardía en las hembras del lote DL-M que en el grupo control. El motivo por el que se ha podido producir este efecto, tal y como ya se ha comentado, ha sido que probablemente la presencia del implante de melatonina retrasó la percepción de los días largos naturales y éstos tienen una gran importancia en la regulación del inicio de la nueva época de actividad reproductiva (Malpaux *et al.*, 1989).

En cuanto al tratamiento exclusivo con tres meses de días largos, desde noviembre a febrero, se observa que una vez finalizado éste, el fotoperiodo natural al que fueron sometidos los animales fue interpretado como días cortos, ya que se estimuló su actividad reproductiva, a pesar de que en ese momento los días naturales eran días crecientes. Existen dos hipótesis para explicar lo ocurrido, la primera, muy bien documentada en ovino, es que las variaciones estacionales son la expresión de un ritmo endógeno y la percepción de los días largos en primavera es el estímulo que desencadena el inicio de la actividad reproductiva (Woodfill *et al.,* 1994; Malpaux *et al.,* 2001), de manera que los días largos del tratamiento junto con el fotoperiodo natural fueron suficientes y capaces de desencadenar la actividad reproductiva. Aunque este mecanismo no ha sido demostrado en cabras, se podría asumir que puede actuar de la misma forma. La segunda teoría es que la luz artificial recibida (16 horas de luz diarias) y el posterior paso a la luz natural (en febrero, aproximadamente 10 h 30 min de luz/día) desencadenó actividad reproductiva, pese a que ese fotoperiodo natural era creciente y en principio proporcionaba una señal potencialmente inhibitoria (Malpaux *et al.,* 1989). Esta observación hecha en condiciones ambientales Mediterráneas, donde la diferencia de la duración del día entre solsticio de invierno y equinoccio de primavera es de aproximadamente 2 horas y 34 minutos, es similar a lo observado en condiciones subtropicales donde esta diferencia es sólo aproximadamente de 1 hora y 40 minutos (Delgadillo *et al.,* 2002). Sería interesante determinar si esta observación es similar en latitudes más altas donde la diferencia de horas es mayor, y por lo tanto el efecto inhibitorio también es mayor.

Además, este tratamiento con tres meses de días largos durante la época de actividad reproductiva indujo actividad luteal en las hembras durante el anestro estacionario pero no actividad estral. Estos resultados difieren de los obtenidos en el

experimento del objetivo anterior, donde se usó la combinación de implantes de melatonina al final del tratamiento con 3 meses de días largos. En dicho experimento, las hembras mostraron actividad ovulatoria y estral en época de anestro estacionario. Los resultados obtenidos en el presente experimento y en relación a los otros estudios presentados en la presente Memoria nos indican que tres meses de exposición a fotoperiodo artificial de días largos durante el final de la época de actividad reproductiva necesitarían estar asociados a otras prácticas, como podría ser el efecto macho (Zarazaga *et al.*, 2012) o inserción de implantes de melatonina al finalizar el fotoperiodo para favorecer la aparición de celos (objetivo 2).

En este experimento, al igual que en los anteriores, ninguna de las hembras control mostró actividad estral u ovulatoria durante el anestro estacionario a pesar de que, de nuevo, estaban en contacto con machos y hembras activas sexualmente. Todo ello viene a corroborar que en nuestras latitudes el efecto macho es necesario en el caso de que las hembras no hayan sido tratadas con melatonina y/o fotoperiodo y que la importancia del efecto hembra es muy reducida. Igualmente, la incidencia de actividad reproductiva irregular (ovulación silente, ciclos cortos) fue muy alta. Este hecho se ha descrito como necesario antes de que se produzca el inicio de la época normal de actividad reproductiva, lo que puede atribuirse a que la progesterona es necesaria para aumentar la sensibilidad ovárica a la LH después de un periodo anovulatorio (Legan *et al.,* 1985).

El momento del inicio de la nueva época de actividad reproductiva fue similar en ambos lotes (cabras tratadas y no tratadas con fotoperiodo artificial) tanto en lo que se refiere al inicio de actividad ovárica (concentraciones de progesterona) como estral. Estos resultados difieren de los obtenidos por nuestro propio grupo de investigación y presentados anteriormente, usando machos y hembras tratados con fotoperiodo y melatonina o sólo con melatonina, ya que en todos los casos el inicio de la nueva época de actividad reproductiva se retrasó. Estas diferencias podrían ser explicadas porque el momento de inicio de la actividad reproductiva durante el otoño depende del momento de exposición a días largos tras el solsticio de invierno (Malpaux *et al.,* 1989). En los experimentos anteriores, el retraso se debió a la interferencia que puedo ocasionar el implante de melatonina, que podría haber retrasado la percepción de los días largos naturales, sin embargo en este experimento al no haber empleado melatonina la percepción del fotoperiodo creciente no fue modificada.

Por otra parte, la exposición de hembras a fotoperiodo artificial de días largos durante el periodo de actividad reproductiva no afectó la tasa de ovulación de la siguiente época normal de actividad sexual. Esta observación podría ser debida a que la dinámica de ondas foliculares no se vio alterada por la actividad luteal inducida durante el anestro estacional de las hembras, siendo la primera vez que se ha descrito esta observación en caprino.

En el experimento de campo realizado, en caprinos Mediterráneos, con el fin de determinar cuál es el protocolo más adecuado a la hora de usar los implantes de melatonina entorno al equinoccio de primavera. La menor fertilidad se observó en las hembras no tratadas de ambas razas que fueron cubiertas por machos no tratados. Esto indica que, en estas razas, los resultados del efecto macho se pueden mejorar llevando a cabo el tratamiento con melatonina exógena. Incluso, el uso sólo de implantes de melatonina en los machos no fue suficiente, sino que como ya se ha dicho, por lo menos las hembras deben ser implantadas. Estos hechos confirman los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, en los que se ha mostrado que la respuesta reproductiva de hembras no tratadas al exclusivo estímulo del macho es escasa durante el anestro estacionario si no se utiliza algún tratamiento adicional como la melatonina y/o fotoperiodo.

La ausencia de efecto del tratamiento con melatonina sobre la prolificidad corrobora resultados previos correspondientes al objetivo 1, en los que la tasa de ovulación no fue mejorada. Sin embargo, diferentes autores han observado un incremento en la tasa de ovulación y prolificidad en ovejas tratadas con melatonina tanto en latitudes altas (Robinson *et al.,* 1991) como Mediterráneas (Forcada *et al.,* 1995; Zúñiga *et al.,* 2002). El motivo de estas diferencias puede ser explicado porque los factores exógenos tienen una baja influencia sobre la tasa de ovulación en pequeños rumiantes, que de manera natural tienen elevadas tasas de ovulación (Gunn, 1983; Smith, 1985), como es el caso del presente trabajo. De todos modos, y extrañamente, la mayor prolificidad se obtuvo en el grupo de hembras de raza Payoya cubiertas con machos que no habían sido tratados con melatonina. El motivo puede ser que, aunque un reducido porcentaje de hembras respondieron al efecto macho, éstas precisamente tuvieron una elevada prolificidad, aunque la razón se desconoce.

Los resultados reproductivos (fertilidad, prolificidad y productividad) de la raza Murciano-Granadina fueron mayores que los de la raza Payoya. Estas diferencias entre

razas son habituales. De todos modos, los resultados reproductivos concuerdan con los obtenidos por otros autores trabajando con las mismas razas (González *et al.,* 2002; Vázquez *et al.,* 2010). El origen de estas diferencias raciales en términos de prolificidad puede estar ligado a diferencias en la atresia folicular (Driancourt *et al.,* 1990; López *et al.,* 1997).

La colocación de implantes de melatonina en los machos de la raza Murciano-Granadina incrementó los resultados reproductivos, sin embargo, no fue así en la raza Payoya, lo que podría indicar que la utilización de implantes de melatonina no sería necesaria en los machos de esta raza. Delgadillo *et al.* (2002) mostraron que sólo un tratamiento de días largos, en los machos cabríos en latitudes subtropicales, y no la utilización de melatonina, era necesario para inducir su actividad reproductiva y que cuando estos machos se utilizaban para cubrir las hembras mediante un efecto macho estimulaban su actividad sexual. Sin embargo, y tal como se ha observado en los resultados obtenidos en el experimento correspondiente al objetivo 5, con la misma raza, la colocación de implantes de melatonina incrementa las concentraciones de testosterona y mejora parámetros como la actividad reproductiva, en comparación con machos no implantados. Por este motivo, la discrepancia entre los resultados obtenidos en el presente experimento de campo y los del experimento 5 puede estar ligada a diferencias entre explotaciones. Así, Martín *et al.* (2009) observaron diferencias en parámetros reproductivos entre 17 ganaderías de la raza Florida.

En cuanto al porcentaje diario de partos, en ambas razas, todos los protocolos estudiados, excepto en el caso de las hembras de raza Payoya implantadas con melatonina y cubiertas con los machos control, provocaron que los partos se produjeran en un periodo de tiempo inferior a 14 días, con picos de partos que demostraban la sincronización de las cubriciones, hecho que es debido al efecto macho realizado (Flores *et al.,* 2000; Delgadillo *et al.,* 2002). De todos modos, el tratamiento con melatonina de ambos sexos fue incapaz de mejorar esta sincronización y, además, no se observaron retornos en celo, ni en las hembras tratadas ni en las no tratadas. Un hecho, que es muy llamativo, es que el porcentaje diario de partos en las hembras de raza Payoya implantadas con melatonina y cubiertas con los machos control se alargó durante 22 días, no observándose picos de partos. Estos resultados sugieren que, quizás, en este grupo, la mayoría de las hembras que parieron estaban cíclicas en el momento de la introducción de los machos o que los machos estaban más inhibidos sexualmente y en

consecuencia la cubrición por parte de los machos se extendió en el tiempo. Aunque, este hecho es difícil de explicar.

Para finalizar, nuestro grupo de investigación ya había demostrado, en la raza Payoya, que los machos cabríos presentan una marcada variación de su actividad reproductiva a lo largo del año, independientemente del nivel de alimentación. Estos resultados indicarían que otros factores ambientales estarían implicados en los cambios de la actividad reproductiva a lo largo del año en estos animales (Zarazaga *et al.*, 2009a). En otras razas Mediterráneas, también se ha observado variaciones estacionales en las concentraciones de testosterona que variaban en función de la raza pero no tanto por otros factores ambientales como la temperatura (Todini *et al.*, 2007). De este modo, se trató de estudiar un tratamiento que redujera la estacionalidad reproductiva de los machos cabríos y que permitiera su utilización a nivel de explotación.

En el segundo ensayo de este quinto objetivo, donde se usaron únicamente implantes de melatonina, éstos se colocaron entorno al equinoccio de primavera, más tarde que en el experimento del primer objetivo, porque para que éstos sean efectivos tienen que usarse después de que los animales hayan percibido previamente días largos. Este periodo de días crecientes se correspondía con el periodo de tiempo entre el solsticio de invierno y el equinoccio de primavera, que ya se había demostrado efectivo para inducir actividad reproductiva en cabras (objetivo 1) y también en ovejas (Zarazaga *et al.*, 1996c). Sin embargo, en latitudes más altas la colocación de los implantes de melatonina se suele realizar entorno al solsticio de verano (Chemineau *et al.*, 1996).

La actividad reproductiva en los grupos control (no tratados) fue marcadamente estacional, lo que viene a confirmar los resultados obtenidos previamente en machos cabríos de raza Payoya y bajo las mismas condiciones de protocolo experimental (Zarazaga *et al.*, 2009). En los dos ensayos correspondientes al quinto objetivo, el periodo de inactividad reproductiva fue caracterizado por bajas concentraciones plasmáticas de testosterona y bajo peso testicular, entre los meses de enero (invierno) y julio (verano), lo que probablemente indujo elevados tiempo de eyaculación en febrero (final de invierno) y abril (comienzo de primavera) y, además, un bajo porcentaje de machos que eyacularan o que se encontraran activos en los meses de febrero y mayo (primavera).

En los grupos tratados las variables reproductivas mostraron patrones de conducta diferentes a los de los grupos control. De este modo, se observó que el tratamiento de

fotoperiodo artificial de días largos a partir del 14 de noviembre (otoño) hasta el 20 de febrero (invierno), con o sin el empleo de implantes melatonina o la colocación de implantes de melatonina entorno al equinoccio de primavera, eran capaces de aumentar las concentraciones plasmáticas de testosterona durante la época de anestro estacionario, al igual que ya había sido descrito por Delgadillo *et al.* (2001) y Ramadan *et al.* (2009). En el primer ensayo de este quinto objetivo, este aumento de concentraciones de testosterona ocurrió 17,6 ± 3,9 días y 21,5 ± 2,4 días después de finalizado el tratamiento de fotoperiodo de días largos o inserción del implante de melatonina, respectivamente. En el segundo ensayo, sucedió 16,3 ± 1,5 días tras la colocación del implante. En machos caprinos Criollos mexicanos y en condiciones sub-tropicales, Delgadillo *et al.* (2001) señalan que el aumento en las concentraciones plasmáticas de testosterona ocurre 5 semanas después de la inserción del implante de melatonina, usando una metodología similar a la empleada en nuestros experimentos. La explicación para estas diferencias podría ser que, en el primer ensayo, el tratamiento de días largos fue ligeramente más prolongado y terminó más tarde en el año. También podría ser que la sensibilidad frente al fotoperiodo sea diferente entre las latitudes y/o las razas de los animales utilizados. Así, las concentraciones de testosterona se incrementan en moruecos tras la administración de melatonina, debido al efecto de esta hormona sobre el eje hipotálamo-hipofisario que provoca un incremento en la secreción de LH (Arendt, 1995).

Tras esta subida de las concentraciones de testosterona en los lotes tratados, durante el periodo de anestro estacionario, éstas descendieron hasta alcanzar niveles basales. Este hecho pudo ser debido al efecto de refractariedad a los días cortos que los implantes de melatonina seguían provocando en los lotes que llevaban estos implantes (Almeida y Lincoln, 1984; Lincoln y Ebling, 1985) o a la señal inhibitoria de los días crecientes que experimentaron los machos del lote que fue sometido a un tratamiento de días largos (Malpaux *et al.*, 1989).

La reactivación de la secreción de testosterona en la siguiente época de actividad reproductiva se retrasó significativamente en los animales tratados con fotoperiodo y melatonina, al igual que lo descrito por Delgadillo *et al.* (2001), lo que puede atribuirse, tal y como ya se ha explicado, a que la percepción del fotoperiodo creciente sólo pudo realizarse una vez que el implante dejó de liberar melatonina. Por otra parte, Delgadillo *et al.* (2002) observaron, a diferencia de nuestros resultados, un retraso en el inicio de la

época de actividad reproductiva no sólo en animales tratados con melatonina si no también en animales tratados exclusivamente con fotoperiodo artificial de días largos. Esta discrepancia podría ser debida a las señales de fotoperiodo percibidas de manera diferente en las condiciones subtropicales, donde el cambio de longitud de luz del día entre el solsticio de invierno y el equinoccio de primavera es menor (aproximadamente de 1 h 40 minutos) que en nuestras latitudes (2 h 34 minutos).

Algo similar sucedió con el peso testicular, pero con un patrón retrasado respecto al de las concentraciones plasmáticas de testosterona y sin diferencias entre los grupos. Esta ausencia de diferencias podría ser el resultado del efecto de los tratamientos sobre la secreción de testosterona y al mismo tiempo la dieta ingerida. En los machos del grupo control un aumento en la ingesta de alimento en la época de anestro pudo aumentar el peso vivo y por lo tanto el peso testicular, de manera independiente a la secreción de LH (Walkden-Brown *et al.*, 1994a, 1994c). Por otra parte, durante la época de actividad reproductiva, la ingesta de alimento disminuyó lo que ocasionó una disminución en el peso vivo y también en el peso testicular, tal como se ha descrito para machos caprinos de raza Cashmere (Walkden-Brown *et al.*, 1997) y machos ovinos Soay (Lincoln, 2001). Sin embargo, en los grupos tratados el aumento en la concentración plasmática de testosterona en periodo de anestro estacionario probablemente causó una disminución de la ingesta de alimento y por lo tanto del peso vivo y del peso testicular. Además, el gran aumento de la concentración plasmática de testosterona en los grupos tratados, probablemente potenció la inhibición de la secreción de LH por efecto de *feedback* negativo de la testosterona, lo que contribuyó a disminuir el tamaño testicular (Delgadillo y Chemineau, 1992).

El volumen de eyaculado, la concentración y la producción total de esperma se incrementaron, tanto en el grupo tratado con días largos como en el lote tratado con melatonina en comparación con sus lotes control, hecho que también ha sido descrito en machos cabríos (Delgadillo *et al.*, 1991) y en moruecos (Chemineau *et al.*, 1988). Estos hechos pueden ser explicados de dos maneras. La primera podría ser el largo periodo de tiempo durante el cual los testículos de los machos tratados se mantuvieron produciendo espermatozoides al máximo nivel. La segunda explicación podría ser que debido a la alternancia entre días largos y cortos (debido al implante de melatonina) se estimuló la diferenciación de las espermatogonias A0 en A1, debido a un aumento en la secreción de FSH y de sensibilidad de las células de Leydig a la LH (Langford *et al.*, 1987). El

hecho de que el grupo tratado sólo con días largos tuviera una concentración espermática más alta y un número total de espermatozoides por eyaculado más alto podría ser debido a que los pocos machos que eyacularon (el porcentaje de machos que eyacularon en este grupo fue inferior) tenían unas mejores características de producción seminal, de manera que se ha demostrado que, precisamente, las mayores concentraciones espermáticas se logran en primavera, cuando se produce una reducción del número de animales que eyaculan (Zarazaga *et al.*, 2009).

Con respeto al comportamiento sexual, los machos tratados con fotoperiodo artificial de días largos mostraron un bajo porcentaje que eyaculaban o que estaban activos en comparación con los otros grupos. Aunque los animales fueron asignados al azar, desde el inicio del experimento, este grupo se caracterizó por un bajo porcentaje de machos activos. Además, el efecto inhibitorio del incremento de la duración del día, percibido después de la finalización del fotoperiodo artificial de días largos, podría haber suprimido el estímulo que suponía ese cambio de fotoperiodo de días largos a cortos pero crecientes. Este fenómeno también fue observado en el experimento correspondiente al objetivo 3 con las hembras.

Para finalizar, los resultados del presente experimento, realizado con machos cabríos, demuestran que todos los tratamientos propuestos fueron capaces de estimular las concentraciones de testosterona durante el anestro estacionario en nuestras latitudes. Sin embargo, las concentraciones de testosterona de los machos de los grupos control, aunque estuvieron en contacto con los machos sometidos a tratamiento, no se vieron estimuladas por éstos. El tratamiento con días largos e implantes de melatonina produjo un retraso en el inicio del periodo de actividad reproductiva natural. El tratamiento sólo con días largos parece ser el menos efectivo, si se mide en términos de porcentaje de machos que eyacularon o que estuvieron sexualmente activos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En las condiciones en las que se han llevado a cabo los experimentos presentados en la presente Memoria utilizando caprinos Mediterráneos, se podría concluir lo siguiente:

1. La colocación de implantes de melatonina en hembras, durante el periodo de anestro estacionario (entorno al equinoccio de primavera), fue capaz de desencadenar actividad reproductiva (celos, ovulaciones y actividad hipofisaria) por sí mismo, puesto que se mostró efectivo tanto en presencia como en ausencia de machos.
2. El tratamiento con fotoperiodo artificial de tres meses de días largos, entre los meses de noviembre y febrero, y la colocación de implante de melatonina al final del tratamiento, en cabras que estaban diariamente en contacto con los machos, fue capaz de inducir actividad reproductiva durante el periodo de anestro estacionario.
3. El tratamiento sólo con tres meses de días largos, entre los meses de noviembre y febrero, en hembras, estimuló la actividad ovárica, pero fue incapaz de inducir una adecuada actividad estral durante el periodo de anestro estacionario.
4. En los ensayos de campo, realizados en la raza Murciano-Granadina y Payoya, se obtuvo una mejora de la fertilidad, en ambas razas, cuando al menos las hembras habían recibido el tratamiento con melatonina exógena.
5. La colocación de implantes de melatonina a los machos cabríos fue efectiva para mejorar los resultados reproductivos, sólo en el caso de la raza Murciano-Granadina, principalmente cuando las hembras no estaban implantadas con melatonina.
6. En machos cabríos Mediterráneos, tanto el tratamiento con implantes de melatonina colocados entorno al equinoccio de primavera como los tratamientos con tres meses de días largos (entre los meses de noviembre y febrero), con o sin la colocación de implantes de melatonina al final del tratamiento fotoperiódico, fueron capaces de estimular la secreción de testosterona durante el periodo de anestro estacionario.

7. El tratamiento, en machos cabríos, con tres meses de días largos, entre los meses de noviembre y febrero, fue el menos efectivo en cuanto al porcentaje de machos que eyaculaban o que se encontraban activos sexualmente.
8. En todos los experimentos realizados, la actividad reproductiva de las hembras que no habían sido sometidas a tratamiento alguno no fue estimulada durante el periodo de anestro estacionario, a pesar de que estaban en contacto con hembras y machos activos sexualmente. Esto indicaría, que en nuestras latitudes y en caprinos Mediterráneos, la importancia del efecto hembra es pequeña y el efecto macho es necesario cuando las hembras no han sido sometidas a ningún tipo de tratamiento.
9. El contacto de los machos control, que no habían sido sometidos a ningún tipo de tratamiento para estimular su actividad reproductiva, con los machos sometidos a los diferentes tratamientos, no fue suficiente para estimular en ellos la secreción de testosterona durante el periodo de anestro estacionario.
10. Tanto en machos como en hembras, en los que se utilizó melatonina, excepto cuando fue utilizada sola en los machos, produjo un retraso en el inicio de la siguiente época de actividad reproductiva (efecto a medio plazo).

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Under the experimental conditions presented in this Thesis could be concluded:

1. The exogenous melatonin inserted around the spring equinox in Mediterranean female goats was able to trigger reproductive activity (oestrous, ovulation and pituitary activity) by itself during seasonal anoestrus since it was effective both in the presence and absence of males.
2. Three months of artificial long days from November to February, and melatonin implant at the end of the photoperiodic treatment in Mediterranean female goats that was daily in contact with males, was able to induce reproductive activity during the seasonal anoestrus.
3. Artificial long days during three months from November to February in Mediterranean female goats that were in permanent contact with males, was able to stimulate ovarian activity since progesterone concentrations increased, but it was unable to induce adequate oestrous activity during the seasonal anoestrus.
4. In the field experiments carried out with the Murciano-Granadina breed and Payoya breed, exogenous melatonin improved fertility in both breeds when at least the females were implanted with melatonin.
5. In the Murciano-Granadina breed, the use of exogenous melatonin in bucks, improved reproductive performances, especially when the females had no melatonin implant.
6. In Mediterranean bucks the treatment with melatonin implants inserted around the spring equinox and three months of long days from November to February with or without exogenous melatonin at the end of the photoperiodic treatment, were able to enhance testosterone concentrations during the seasonal anoestrus.
7. Three months of artificial long days from November to February in Mediterranean bucks was the less effective treatment regarding the percentage of males which ejaculated or which were sexually active.
8. For all experiments carried out, the reproductive activity of the control females was not stimulated during the seasonal anoestrus; despite they were in contact with both females and sexually active males. This result, suggest that under our

latitudes and in Mediterranean goats, the female effect has a slight significance. Moreover, indicates that the isolation between males and females, to carry out a male effect, is necessary when the females have not been subject to any of the used treatments.

9. The contact of the control males with the treated males was not able to stimulate the testosterone secretion during the seasonal anoestrus.

10. The exogenous melatonin alone or after the photoperiodic treatment, both in males and females, except when used alone in males, induced a delay in the onset of the normal reproductive season (medium term effect).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott DM, McNelly AS, Lunn SF, Hulme MJ, Burden FJ, 1981. Inhibition of ovarian function in subordinate female Marmoset monkeys. Journal of Reproduction and Fertility, 63:335-345.

Abecia JA, Valares JA, Forcada F, Palacín I, Martín S, Martino A, 2007. The effect of melatonin on the reproductive performance of three sheep breeds in Spain. Small Ruminant Research, 69:10-16.

Abecia JA, Valares JA, Forcada F, Palacín I, Martín S, Martino A, 2011. The effect of melatonin replacement and month of treatment after the winter solstice on the reproductive activity of two Mediterranean breeds of sheep. Biological Rhythm Research, 42:5-14.

Aguilar J, De La Torre S, Duarte G, Malpaux B, Delgadillo JA, 2001. Las hembras caprinas del sub trópico mexicano manifiestan un ritmo endógeno de reproducción. XLIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Agosto 26-30, Monterrey, Nuevo León, México, O27:40.

Ahmad N, Noakes DH, 1995. Seasonal variations in testis size, libido and plasma testosterone concentrations in British goats. Animal Science, 61:553-559.

Almeida OFX, Lincoln GA, 1982. Photoperiodic regulation of reproductive activity in the ram: evidence for the involvement of circadian rhythms in melatonin and prolactin secretion. Biology of Reproduction, 27:1062-1075.

Almeida OFX, Lincoln GA, 1984. Reproductive photorefratoriness in rams and accompanying changes in patterns of melatonin and prolactin secretion. Biology of Reproduction, 30:143-158.

Álvarez RL, 2000. Efecto de la anosmia y la conducta social sobre la secreción de LH y ovulación de cabras anéstricas inducidas a ciclar mediante el efecto hembra (tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 13-17.

Álvarez RL, Zarco QL, 2001. Los fenómenos de bioestimulación sexual en ovejas y cabras. Veterinaria México, 32:117-129.

Álvarez RL, Ducoing WAE, Zarco QL, Trujillo GAM, 1999. Conducta estral, concentraciones de LH y función lútea en cabras en anestro estacional inducidas a ciclar mediante el contacto con cabras en estro. Veterinaria México, 30:25-31.

Arbiza A, 1986. Producción de caprinos. AGT. Editor SA, 695.

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 fotorrefractario a los días largos. XLIV Congreso Nacional de la Sociedad mexicana de Ciencias Fisiológicas, Monterrey, Nuevo León, México, O28: 40.

Arendt J, 1995. Physiology of the pineal: Role in photoperiodic seasonal functions. En: Arendt, ed. Journal of Melatonin and the Mammalian Pineal Gland, Chapman & Hall: London, 110-158.

Arendt J, Symons AM, Laud C, 1981. Pineal function in the sheep: evidence for a possible mechanism mediating seasonal reproductive activity. Experientia, 37:584-586.

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

Argo CM, Smith JS, Kay RNB, 1999. Seasonal changes of metabolism and appetite in Soay rams. Animal Science, 69:191-202.

Argote R, García JM, Palacín I, Valares JA, Abecia JA, Forcada F, Martín S, Martino A, 2005. Efecto de diferentes intervalos colocación de implantes de melatonina-introducción de machos sobre los resultados reproductivos de ovejas rasa aragonesa. En: Actas de las XXX Jornadas Científicas y IX Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. septiembre 28-30, Granada, España, 411-413.

Armstrong DT, 1981. Prostaglandins and follicular functions. Journal of Reproduction and Fertility, 62:283-291.

Arrebola FA, García A, Muñoz MC, Martin RA, Delgado D, González BJ, 2005. Manejo reproductivo de rebaños ovinos merinos en régimen semi extensivo, usando implantes de melatonina. En: Actas de las XXX Jornadas Científicas de

la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Septiembre 28-30, Granada, España, 414-416.

Arrebola FA, Abecia JA, Forcada F, García A, Martín RA, Mesa O, 2008. Effects of annual rainfall and farm on lamb production after treatment with melatonin implants in Merino sheep: a 4-year study. New Zeland Veterinary Journal, 57:141-145.

Arrebola F, López MD, Mesa O, Chentouf M, Sanchez M, Martín RA, Redondo F, Pérez C, 2010. Influencia del estado productivo de las cabras de raza Florida, en los resultados de fertilidad a inseminación artificial En: Actas de las XXXII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Almería, España, 163-168.

Arroyo J, 2011. Estacionalidad Reproductiva de la Oveja en México. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 14:829-845.

Asdell SA, 1964. Patterns of Mammalian Reproduction. 2nd. Ed. Constable. London, 418-459.

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.

Azevedo JM, Correia TM, Almeida JC, Valemtim RC, Fontes PJ, Galvao L, Mendoca AL, Coelho A, 2003. Inducción y sincronización de La actividad ovárica en corderas de La raza portuguesa "Churra da Terra Quente". En: Actas de las XXVIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Badajoz, España, 149-151.

Bae K, Jin XW, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, Weaver DR, 2001. Differential functions of *mPer*1, *mPer*2, and *mPer3* in the SCN circadian clock. Neuron, 30:525-36.

Baird DT, Swanston I, Scaramuzzi ft J, 1976. Pulsatile release of LU and secretion of ovarian steroids in sheep during the luteal phase of the estrous cycle. Endocrinology, 98:1490-1496.

Barb CR, Derochers GM, Johnson B, Utley RV, Chang WJ, Rampacek GB, Kraeling RR, 1992. N-Methyl-d,1-aspartate stimulate growth hormone and

prolactin but inhibits luteinizing hormone secretion in the pig. Domestic Animal Endocrinology, 9:225-232.

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, GuérinY, Leboeuf B, Orgeur P, Vallet JC, 1993. Manuel de formation pour l´insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Etude FAO, Production et santé animales, 83:219-231.

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.

Bayarri MJ, Iigo M, Muñoz-Cueto JA, Isorna E, Delgado MJ, Madrid JA, Sánchez-Vázquez FJ, Alonso-Gómez AL, 2004. Binding characteristics and daily rhythms of melatonin receptors are distinct in the retina and the brain areas of the European sea bass retina (*Dicentrarchus labrax*). Brain Research, 1029:241-250.

Bechgaard E, Lindhardt K, Martinsen L, 1999. Intranasal absorption of melatonin in vivo bioavailability study. International Journal of Pharmaceutics, 182:1-5.

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

Bissonnette TH, 1941. Experimental modification of breeding cycles on goats. Physiological Zoology, 14:379-383.

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

Bittman EL, Karsch FJ, Hopkins JW, 1983b. Role of pineal gland in ovine photoperiodism: regulation in seasonal breeding and negative feedback effects of estradiol upon luteinizing hormone secretion. Endocrinology, 113:329-336.

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 anestrous ewes. Endocrinology, 149:2762-2772.

Bon Durant RH, 1981. Reproductive physiology in the goat. Modern Veterinary Practice, 62:525-529.

Bouillon J, Lajous A, Fourcaud P, 1982. Mise en évidence d'un effet chèvres induites, comparable à l'effet bouc chez les caprins. 7émes Journees de la Recherche Ovine et Caprine. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris, 325-333.

Brydon L, Petit L, de Coppet P, Barrett P, Morgan PJ, Strosberg AD, Jockers R, 1999. Polymorphism and signalling of melatonin receptors. Reproduction Nutrition Development, 39:315-324.

Cahill LP, 1979. Studies of folliculogenesis in the sheep. Thèse de Doctorat en Sciences Naturelles, University Paris VI, France, 141-144.

Ceriani MF, Hogenesch JB, Yanovsky M, Panda S, Straume M, Kay SA, 2002. Genome-Wide Expression Analysis in Drosophila Reveals Genes Controlling Circadian Behavior. Journal and Neuroscience, 22:9305-9319.

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.

Chemineau P, 1983. Effect on oestrus and ovulation of exposing Creole goats to the male at three times of the year. Journal of Reproduction and Fertility, 67:65-72.

Chemineau P, 1985. Effects of a progestagen on buck-induced short ovarian cycles in the Creole meat goat. Animal Reproduction Science, 9:87-94.

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

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

Chemineau P, Poulin N, Cognié Y, 1984. Sécrétion de progestérone au cours du cycle induit par l'introduction du mâle chez la chèvre Créole en anoestrus: effets de la saison. Reproduction Nutrition and Development, 24:557-561.

Chemineau P, Levy F, Thimonier J, 1986a. Effects of anosmia on LH secretion, ovulation and oestrous behaviour induced by males in the anovular Creole goat. Animal Reproduction Science, 10:125-132.

Chemineau P, Normant E, Ravault JP, Thimonier J, 1986b. 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. Jounal of Reproduction and Fertility, 78:497-504.

Chemineau P, Pelletier J, Guérin Y, Colas G, Ravault JP, Touré G, 1988. Photoperiodic and Melatonin treatments for the control of seasonal reproduction in sheep and goats. Reproduction Nutrition Dévelopment, 28:409-422.

Chemineau P, Cognie Y, Guérin Y, Orgeur P, Vallet JC, 1991. Detection and control of oestrus and ovulation. Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats. Animal Production and Health Paper 83-FAO. Rome, Italy, 163-180.

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, Malpaux 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., Malpaux, B., Guérin, Y., Maurice, F., Daveau, A., Pelletier, J., 1992c. Lumière et mélatonine pour la maîtrise de la reproduction des ovins et des caprins. Annales de Zootechnie, 41:247-261.

Chemineau P, Maurice F, Daveau A, 1993. Re-initiation of ovulatory activity by melatonin given as a constant-release implant in long-day treated Ile-de-France ewes depends on endogenous secretion of melatonin. Touitou Y, Arendt J, Pévet P (Ed), Melatonin and the Pineal Gland from Basic Science to Clinical Application. Amsterdam: Elsevier, 247-250

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, Baril G, Leboeuf B, Maurel MC, Roy F, Pellicer- Rubio M, Malpaux B, Cognié Y, 1999. Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive managements of goats. Journal Reproduction and Fertility, 54:129-142.

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.

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.

Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Santos-Moreno A, Colledge WH, Herbison AE, 2008. Kisspeptin-GPR54 singaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. The Journal of Neuroscience, 28:8691-8697.

Claus R, Over R, Dehenhard M, 1990. Effect of male odour on LH secretion and the induction of ovulation in seasonally anoestrous goats. Animal Reproduction Science, 22:27-38.

Claustrat B, Brun J, Chazot G, 2005. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. Sleep Medicine Reviews, 9:11-24.

Clutton-Brock TH, Albon SD, Guinness FE, 1986. Great expectations: dominance, breeding success and offspring sex ratios in red deer. Animal Behavior, 34:460-471.

Cognie Y, Gayerie F, Oldham CM, Poindron P, 1980. Increased ovulation rate at the ram-induced ovulation and commercial application. En: Proceedings of the Australian Society of the Animal Production, 13:80-82.

Cohen-Tannoudji J, Locatelli A, Signoret JP, 1986. Nonpheromonal stimulation by the male of LH release in the anoestrous ewe. Physiology and Behavior, 36:921-924.

Colas G, Guérin Y, 1981. A new method for thawing ram semen. Theriogenology, 6:623-631.

Collin C, Wade DT, Davies S, Horne V, 1988. The Barthel ADL Index: a reliability study. International Disability Studies, 10:61-63.

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.

Corteel, JM, 1977. Production, storage and insemination of goat semen. Symp. Managment Reprod. Sheep and Goat. Madison (Wisconsin), 41-57.

Cushwa WT, Bradford GE, Stabenfeldt GH, Berger YM, Dally MR, 1992. Ram influence on ovarian and sexual activity in anestrous ewes: effects of isolation of ewes from rams before joining and date of ram introduction. Journal of Animal Science, 70:1195-1200.

D'Occhio MJ, Schanbacher BD, Kinder JE, 1984. Profiles of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone and prolactin in rams of diverse breeds: effects of contrasting short (8L:16D) and long (16L:8D) photoperiods. Biology of Reproduction, 30:1039-1054.

Das SM, 1993. Reproductive parameters and productivity indices of Blended goats At Malya Tanzania. International Foundation for Science Workshop Animal Production Scientific. Workshop for East African IFS Grantees, 9.

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

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

Delgadillo JA, Hochereau-de Reviers MT, Daveau A, Chemineau P, 1995. Effect of short photoperiodic cycles on male genital tract and testicular parameters in male goats (*Capra hircus*). Reproduction Nutrition Développement, 35:549-558.

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, Flores JA, Véliz FG, Hernández HF, Duarte G, Vielma J, Poindron P, Chemineau P, Malpaux B, 2002. Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. Journal of Animal Science, 80:2780-2786.

Delgadillo JA, Flores JA, Véliz FG, Duarte G, Vielma J, Poindron P, Malpaux B, 2003. Control de la reproducción de los caprinos del subtrópico mexicano utilizando tratamientos fotoperiódicos y efecto macho. Veterinaria México, 34:69-79.

Delgadillo JA, Fitz-González G, Duarte G, Véliz FG, Carrillo E, Flores JA, Vielma J, Hernández H, Malpaux B, 2004. Management of photoperiod to control caprine reproduction in the subtropics. Reproduction, Fertility and Development, 16:471-478.

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

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

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, 76:1146-1151.

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 Reproduction in Mammals and Man. Editorial Thibault Levasseur Hunter. Paris, 121-133.

Driancourt MA, Castonguay F, Bindon BM, Piper LR, Quirke JF, Hanrahan JP, 1990. Ovarian follicular dynamics in lines of sheep (Finn, Merinos) selected on ovulation rate. Journal Animal Science, 68:2034-2041.

Downs SM, Longo FJ, 1983. Effects of indomethacin on oocyte maduration in mice. Greenwald GS, Terranova PF (Ed). Factors Regulating Ovarian Function. New York. Raven Press, 65-69.

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.

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 BD, 1984. Hormonal regulation of the annual pelage color cycle in the Djungarian hamster, Phodopus sungorus.I. Role of the gonads and pituitary. Journal of Experimental Zoology, 230:89-95.

Dunstan E, McPhee S, Williams A, Staples L, 1987. Time of melatonin treatment in relation to ram introduction for optimum performance of ewes joined in spring and summer. En: Proceedings Australian Society Animal Production, 17:391.

Durotoye LA, Rajkumar R, Argo CM, Nowak R, Webley GE, Mcneil ME, Graham NB, Rodway RG, 1991. Effect of constant-release melatonin implants on the onset of oestrous activity and on reproductive performance in the ewe. Animal Production, 52:489-497.

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.

Eisermann JH, Bauman DE, Hogue DE, Tavis HF, 1984. Evaluation of a rol for prolactin in growth and the photoperiod-induced growth response in sheep. Journal of Animal Science, 59:86-94.

Ekmekcioglu C, 2006. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. Biomed Pharmacother, 60:97-108.

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, Poulton AL, Arendt J, Symons AM, 1986. A comparison of the efficiency of melatonin treatments in advancing oestrus in ewe. Journal of Reproduction and Fertility, 77:321-327.

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 E_2, stimulates cumulus expansion and hyaluronic acid synthesis by cumuli oophori isolated from mice. Biology of Reproduction, 25:191-195.

Estrada KM, Clay CM, Pompolo S, Smith JT, Clarke IJ, 2006. Elevated Kiss-1 expression in the arcuate nucleus prior to the cyclic preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge in the ewe suggests a stimulatory role for kisspeptin in oestrogen-positive feedback. Journal Neuroendocrinology, 18:806-809.

Evans AC, 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. Reproduction of Domestic Animals, 38:240-246.

Eurostat, 2010. Agriculture and fishery statistics 2010. Luxemburgo: Oficina de publicaciones oficiales de las Comunidades Europeas.

Fabre-Nys C, 2000. The sexual behavior of goats: hormonal control and social factors. INRA Productions Animals, 13:11-23.

Falagan A, González C, Poveda F, 1989. Anlysis of systems in process of intensification of goat production in the region of Murcia. Technical-economic results. Actas del Simposium on the contraint and possibilities of ruminant production in the dry subtropics. Cairo Publications. Egypt, 38:68-70.

Fatet A, Pellicer-Rubio M-T, Leboeuf B, 2010. Reproductive cycle of goats. Animal Reproduction Science, 124:211-219.

Fernández J, Aguado MJ, Blanco JA, Pérez-Guzmán MD, Montoro V, 1992. Tratamiento con melatonina en ovejas adultas de raza manchega para la mejora de los índices reproductivos en primavera. Actas VI Jornadas de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, 279-284.

Flores JA, Véliz FG, Pérez-Villanueva JA, Martínez de la Escalera G, Chemineau P, Poindron P, Malpaux B, Delgadillo JA, 2000. Male reproductive condition is the limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anestrus in female goats. Biology and Reproduction, 62:1409-1414.

Forcada F, Abecia JA, 2000. Control de la actividad reproductiva del ovino. Mundo Ganadero, 122:62-64.

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 anoestrus. Theriogenology, 43:1179-1193.

Forcada F, Abecia JA, Lozano JM, Ferrer LM, Lacasta D, 1999. The effects on reproductive performance in the short and medium term of the combined use of exogenous melatonin and progestagen pessaries in ewes with a short seasonal anoestrus period. Veterinary Research Communications, 23:257-263.

Forcada F, Abecia JA, Zúñiga O, Martino A, 2000. Posibilidades de aplicación práctica de la melatonina en el control de la actividad reproductora del ganado ovino. Ovis, 71:65-86.

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 Agricultural Research, 53:167-173.

Forcada F, Abecia A, Casao A, Vásquez I, 2009. Interacciones ambientales sobre la reproducción en el ganado ovino. 2° Congreso Internacional en Ciencias Veterinarias y Zootecnia. Universidad de Puebla, México, 40.

Foster DL, Mickelson IH, Ryan KD, Coon GA, Drongowski RA, Holt JA, 1978. Ontogeny of pulsatile luteinizing hormone and testosterone secretion in male lambs. Endocrinology, 102:1137-1146.

Fowler DG, 1984. Reproductive behavior of rams. En Reproduction in Sheep. Edit. D.R. Lindsay and D.T. Pierce. Australia, 35-39.

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.

Gascón X, Martín S, Abecia JA, Forcada F, Valares JA, Martino A. 2003. Mejora de La eficacia reproductiva en anoestro estacional en corderas en sistema extensivo en Lérida. En: Actas de las XXVIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Badajoz, España, 169-171.

Gastel MT, Bielli A, Pérez R, López A, Castrillejo A, Tagle R, 1995. Seasonal variations in testicular morphology in Uruguayan Corriedale rams. Animal Reproduction Science, 40:59-75.

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.

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.

Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ, 1998. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. Science, 280:1564-1569.

Gelez H, Lindsay DR, Blache D, Martin GB, Fabre-Nys C, 2003. Temperament and sexual experience affect female sexual behavior in sheep. Applications Animal Behavior Science, 84:81-87.

Gelez H, Archer E, Chesneau D, Linday D, Fabre-Nyz C, 2004. Role of experience in the neuroendocrine control of ewes' sexual behavior. Hormones and Behavior, 45:190-200.

Gibbs FP, Vriend J, 1981. The half-life of melatonin elimination from rat plasma. Endocrinology, 109:1796-1798.

Gómez-Brunet A, López Sebastián A, Picazo RA, Cabellos B, Goddard S. 1995. Reproductive response and LH secretion in ewes treated with melatonina implants and induced to ovulate with the ram effect. Animal Reproduction Science, 39:23-24.

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*). 8ª Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, París, France, 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. En: Actas de las XXVIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Badajoz, España,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.

González O, Pastor JM, Castel JM, Delgado M, 2002. Características reproductivas de la cabra Payoya. El Arca, 5:151-152.

González-Haba MG, Garcia-Maurino S, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM, 1995. High-affinity binding of melatonin by human circulating T lymphocytes (CD4+) Journal of Federation of American Society for Experimental Biology, 9:1331-1335.

González-Stagnaro C, 1993. Comportamiento reproductivo de ovejas y cabras tropicales. Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela, 3:173-196.

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 RL, Jansen HT, Billings HJ, Coolens LM, Lehman MN, 2010. Neural systems mediating seasonal breeding in the ewe. Journal of Neuroendocrinology, 22:674-681.

Goubillon ML, Delaleu B, Tillet Y, Caraty A, Herbison AE, 1999. Localization of estrogen-receptive neurons projecting to the GnRH neuron-containing rostral preotic area of the ewe. Neuroendocrinology, 70:228-236

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.

Grasa-Bañón M, 2009. Estudio de campo de tratamientos reproductivos en una explotación intensiva de caprinos Murciano Granadino. En Actas de las XXXIV Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Barbastro, España, 372-375.

Greyling JP, 1988. Reproductive physiology in the Boer goat doe. Ph.D. Thesis, University of Stellenbosch, South Africa.

Greyling JP, 2000. Reproduction traits in the Boer goat doe. Small Ruminant Research, 36:171-177.

Gunn RG, 1983. The influence of nutrition on the reproductive performance of ewes. En Haresign W (Ed), Sheep Production. Butterworth, London, 99-110.

Guerrero MJ, Carrillo-Vico A, Lardone JP, 2007. La melatonina. Investigación y Ciencia, octubre, 30-38.

Gutiérrez ME, 2009. Mecanismos celulares y moleculares de acción del sistema kiss1/kiss1r en la hipófisis. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, España, 193.

Gutiérrez J, López T, De La Hiera S, Abecia JA, Deletang F, Martín S, Martino A, 2004. Eficacia de la utilización de implantes de melatonina (Melovine ®) para la producción de lechazos de venta cercana a las navidades. En Actas de las XXIX Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Lleida, España, 163-165.

Hafez ESE, 1952. Studies on the breeding season and reproduction of the ewe. Journal of Agricultural Science, 42:189-265.

Hameed S, Jayasena CN, Dhillo WS, 2011. Kisspeptin and fertility. Journal of Endocrinology, 208:97-105.

Haresign W, 1992. Responses of ewes to melatonin implants: importance of the interval beteween treatment and ram introduction on the synchrony of mating, and effects on ovulation rate. Animal Production, 54:41-45.

Haresign W, Foxcroft GR, Lamming GE, 1983. Control of ovulation in farm animals. Journal of Reproduction and Fertility, 69:383-395.

Haresign W, Peters AR, Staples LD, 1990. The effect of melatonin implants on breeding activity and litter size in commercial sheep flocks in the UK. Animal Production, 50:111-121.

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, 1994. Dopaminergic structures in the ovine hypothalamus mediating estradiol negative feedback in anestrous ewes. Endocrinology, 134:1905-1914.

Haynes NB, Schanbacher BD, 1983. The control of reproductive activity in the ram. En Haresign W (Ed.) Sheep Production, 441.

Heckert LL, Griswold MD, 2002. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. Recent Progress in Hormone Research, 57:129-148.

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.

Herbison AE, 1995. Sexually dimorphic expression of androgen receptor immunoreactivity by somatostatin neurones in rat hypothalamic periventricular nucleus and bed nucleus of the stria terminalis. Journal of Neuroendocrinology, 7:543-553.

Hernández, X. 2007. Polymorphisme du gene du récepteur à la mélatonine MT1 et fonctions saisonnières chez les ovins. Doctoral Thèse. Université François Rabelais, Tours. France.

Hillbrick GC, Tucker DJ, 1996. Effect of nutrition on lipid production and composition of cashmere buck fleece. Small Ruminant Research, 22:225-230.

Hochereau-de Reviers, M.T., Ortavant, R. & Courot, M. 1976. Type A spermatogonia in the ram. Journal of Reproduction and Fertility, 46:205-209.

Hochereau-de Reviers MT, Perreau C, Lincoln GA, 1985. Photoperiodic variations of somatic and germ cell populations in the Soay ram testis. Journal of Reproduction and Fertility, 74:329-334.

Howland BE, Sanford LM, Palmer WM, 1985. Changes in serum levels of LH, FSM, PRL, Testosterone and Cortisol associated wilh season and mating in male Pygmy goats. Journal of Andrology, 6:89-96.

Hulet CV, 1966. Behavioral, social and psychological factors affecting mating time and breeding efficiency in sheep. Journal of Animal Science, 25:5-20.

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

Ishida M, Chang K, Hirabayashi K, Nishihara M, Takahashi M, 1999. Cloning of mouse 20α-hydroxysteroid dehydrogenase cDNA and its mRNA localization during pregnancy. Journal of Reproduction and Development, 45:321-329.

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

Jackson GL, Kuehl D, Rhim TJ, 1991. Testosterone inhibits gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in the male sheep. Biology of Reproduction, 45:188-194.

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.

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.

Jordan BT, Hanrahan JP, Roche FJ, 1990. The effect of melatonin implantation in the middle of the breeding season on the subsequent reproductive activity of Scottish Blackface. Animal Reproduction Science, 23:41-48.

Karagiannidis A, Varsakeli S, Karatzas G. 2000. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat buck born and raised in Greece. Theriogenology, 53:1285-1293.

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, 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: Proceedings of the VII International Congress of Endocrinology, Quebec, 139-142.

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.

Katz LS, McDonald JC, 1992. Sexual behavior of farm animals. En: Reproduction in Farm Animals: Science, Application and Models. Theriogenology, 38:240-254.

Katz LS, Price EO, Wallach SJ, Zenchak JJ, 1988. Sexual performance of rams reared with or without females after weaning. Journal Animal Science, 66:1166-1173.

Kennaway DJ, Gilmore TA, Seamark RF, 1982. Effect of melatonin feeding on serum prolactin and gonadotropin levels and the onset of seasonal estrous cyclicity in sheep. Endocrinology, 110:1766-1772.

Keesler GA, Camacho F, GuoY, Virshup D, Mondadori C, Yao ZB, 2000. Phosphorylation and destabilization of human period 1 clock protein by human casein kinase. Neuro Report, 11:951-955.

Klein DC, Weller JL, 1970. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. Science, 169:1093-1095.

Klein DC, 1979. Circadian rhythms in the pineal gland. Endocrine rhythms. D Kreiger, New York, Raven Press, 203-223.

Knight TW, Lynch PR, 1980. The pheromones from the rams that stimulate ovulation in the ewe. En: Proceedings of the Australian Society Animal Production, 13:74-76.

Knight TW, Muir PD, Smith JF, Scales GH, Reid TC, Mcphee SR, Staples LD, 1992. Effects of long-acting melatonin implants on the reproductive performance of Corriedale, Boderdale, Romney, Coopworth and Perendale ewes in New Zealand. New Zeland Journal of Agricultural Research, 35:185-193.

Ko CH, Takahashi JS, 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. Human Molecular Genetics 15 Supplement, 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.

Koumitzis SA, Belibasaki S, Doney JM, 1989. Melatonin advances and condenses the onset of seasonal breeding season in Greek dairy ewes. Animal Production, 48:399-405.

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.

Ladewigh J, 1987. Endocrine aspects of stress: evaluation of stress reactions in farm animals. Wiepkama PR, Adrichen PWM (Ed.) Biology of stress in farm animals: an integrative approach. The Hague, The Netherlands: Martinus Nijhoff, 13-25.

Laming GE, Moseley S, McNeilly AS, 1975. Prolactin release in the sheep. Journal of Reproduction and Fertility, 40:151-168.

Land RB, Pelletier J, Thimonier J, Mauléon 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.

Langford GA, Ainsworth L, Marcus GJ, Shiestha JNB, 1987. Photoperiod entrainment of testosterone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and prolactin cycles in rams in relation to testis size and semen quality. Biology of Reproduction, 37:489-499

Langford GA, Sanford LM, Marcus GJ, Shrestha JNB, 1999. Seasonal cyclic pituitary and testicular activities in rams. Small Ruminant Research, 33:43-53.

Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM, 2001. Post-translational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. Cell, 107:855-867.

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.

Legan SJ, Goodman RL, Ryan KD, Foster DL, Karsch FJ, 1985. Can the transition into anoestrus in the ewe be accounted for solely by insufficient tonic LH secretion? Journal of Endocrinology, 106:55-60.

Legaz E, Palacín I, Abecia JA, Forcada F, Martín S, Martino A, 2006. Eficácia del uso de melatonina en corderas Assaf con diferentes edades al tratamiento. En Actas de las XXXI Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Septiembre 20-22, Zamora, España, 345-347.

Legros C, Chalivoix S, Gabriel C, Mocaer E, Delagrange P, Fuchs E, Malpaux B, 2007. First evidence of melatonin receptors distribution in the suprachiasmatic nucleus of tree shrew brain. Neuroendocrinology Letters, 28:267-273.

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, 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.

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.

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.

L'Hermite M, Niswender GD, Reichert Jr LE, Midgley AR, 1972. Serum folliclestimulating hormone in sheep as measured by radioimmunoassay. Biology of Reproduction, 6:325-332.

Lincoln GA, 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, 1998. Reproductive seasonality and maturation throughout the complete life-cycle in the mouflon ram (*Ovis musimon*). Animal Reproduction Science, 53:87-105.

Lincoln GA, 2001. The irritable male syndrome. Reproduction and Fertility Development, 13:567-576.

Lincoln GA, 2002. Neuroendocrine regulation of seasonal gonadotrophin and prolactin rhythms: lessons from the Soay ram model. Reproduction Supplement, 59:131-147.

Lincoln GA, Davidson W, 1977. The relationship between sexual and aggressive behaviour, and pituitary and testicular activity during the seasonal sexual cycle of rams, and the influence of photoperiod. Reproduction and Fertility, 49:267-276.

Lincoln GA, Peet MJ, 1977. Photoperiodic control of gonadotrophin secretion in the ram: a detailed study of the temporal changes in plasma levels of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone following an abrupt switch from long to short days. Endocrinology, 74:355-367.

Lincoln GA, Short RV, 1980. Seasonal breeding: Nature's contraceptive Recent Progress in Hormone Research, 36:1-51

Lincoln GA, Ebling FJP, 1985. Effect of constant release implants of melatonin on seasonal cycles in reproduction, prolactin secretion and moulting in rams. Journal of Reproduction and Fertility, 73:241-253.

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, Peet MJ, Cunningham RA, 1977. Seasonal and circadian changes in the episodic release offollicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and

testosterone in rams exposed to artificial photoperiods. Endocrinology, 72:337-349.

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, Lincoln CE, McNeilly AS, 1990. Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep Journal of Reproduction and Fertility, 88:623-633

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.

Lindsay DR, Signoret JP, 1980. Influence of behavior on reproduction. En: Proceedings of the 9th International Congress of the Animal Reproduction and Artificial Insemination; June 16-20, Madrid, España, 1:83-92.

Liptrap RM, Cummings E, 1991. Steroid concentrations in follicular fluid of sows treated with dexamethasone. Animal Reproduction Science, 26:303-310.

Lopez, A., Inskeep, E.K., 1991. Response of ewes of Mediterranean sheep breeds to subcutaneous implants of melatonin. Livestock Production Science, 27:177-184.

López A, González A, Santiago J, Gómez A, Townsend EC, Inskeep EK, 1997. Patterns of follicular development during the estrous cycle in monovular Merino del Pais ewes. Animal Reproduction Science, 48:279-291.

Lowrey PL, Shinomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR, 2000. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. Science, 288:483-492.

Maeda KI, Mori Y, Kano Y, 1986. Superior cervical ganglionectomy prevents gonadal regression and increased 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.

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

Malpaux B, 2001. Environnement et rythmes de reproduction. La Reproduction chez les mammifères et L'Homme. Thibault C, Levaseur MC (Ed), Ellipse Editions, INRA Editions, 31:699-724.

Malpaux B, 2006. Seasonal regulation of reproduction in mammals. Neill JD (Ed), Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition, Elsevier, Amsterdam, 2231-2281.

Malpaux B, Karsch FJ, 1990. A role for short days in sustaining seasonal reproductive activity in the ewe. Journal Reproduction and Fertility, 90:555-562.

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, 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, Thiéry JC, Chemineau B, 1999. From the eye to the pituitary: pathways controlling seasonal reproduction. Annual ESDAR Conference, Reproduction in Domestic Animals Supplement, 6:8-14.

Malpaux B, Migaud M, Tricoire H, Chemineau P, 2001. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. Journal Biological Rhythms, 16: 336–347.

Malpaux B, Tricoire H, Mailliet F, Daveau A, Migaud M, Skinner D C, Pelletier J and Chemineau P, 2002. Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrine mechanisms using the sheep as a model. Reproduction Supplement, 59:167-179.

Malven PV, 1993. Neuroendocrine morphology. Malven PV (Ed). Mammalian Neuroendocrinology. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 7-18.

Mani AU, McKelvey WAC, Watson ED, 1996. Effect of undernutrition on gonadotropin profiles in nonpregnant, cycling goats. Animal Reproduction Science, 43:25-33.

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.

Martin GB, Cognié Y, Pearce DT, 1986. The physiological response of anovulatory ewes to the introduction of rams - a review. Livestock Production Science, 15:219-247.

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, L., P. Rodriguez, A. Rota, A. Rojas, M. R. Pascual, D. Patón, and J. Tovar. 1999. Effect of protected fat supplementation to lactating goats on growth and fatty acid composition of perirenal fat in goat kids. Animal Science, 68:195-200.

Martín D, López MD, Carbajo A, Rodríguez V, Sánchez M, 2009. Resultados reproductivos del servicio de asesoramiento de Acriflor con el uso de implantes de melatonina y efecto macho. En: Actas de las XXXIV Jornadas Científicas de

la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Valladolid, España, 376-382.

Martínez RRD, Cruz LC, Rubio GI, Zarco QLA, 1998. Influencia del carnero sobre la ocurrencia de estros en la oveja Pelibuey. Veterinaria México, 29:111-115.

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.

Mauleón P, Rougeot J, 1962. Regulation des saisons sexuelles chez des brebis de races différentes au moyen de divers rythmes lumineaux. Annual biology of biochemistry and biophysics, 2:209-222.

McClintock MK, 1983. Pheromonal regulation of the ovarian cycle: enhancement, suppression and synchrony. Vandenbergh JG (Ed.). Pheromones and Reproduction in Mammals. Academic Press, New York, 113-149.

McComb, K., 1987. Roaring by red deer stags advances the date of oestrus in hinds. Nature, 330:648-649.

McDonald LE, 1989. Veterinary Endocrinology and Reproduction. Pineda MH, Doodly MP (Ed.), Lee & Febiper, Philadelphia, 569.

McEvoy TG, Robinson JJ, Aitken RP, Robertson IS, 1998. Melatonin treatment of embryo donor and recipient ewes during anestrus affects their endocrine status, but not ovulation rate, embryo survival or pregnancy. Theriogenology, 49:943-955.

McMillan, W.H., Sealey, R.C., 1989. Do melatonin implants influence the breeding season in Coopworth ewes? En: Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, 49:43-46.

Medhamurthy R, Carruthers TD, Manns JG, 1987. Effects of bovine follicular fluid inhibin on serum gonadotrophin concentrations in ewes during oestrus. Journal Reproduction and Fertility, 81:91-98.

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

Meyer SL, Goodman RL, 1986. Separate neural systems mediate the steroid-dependent and steroid-independent suppression of tonic luteinizing hormone secretion in the anestrous ewe. Biology of Reproduction, 35:562-571.

Meza-Herrera, C.A., Veliz-Deras, F.G., Wurzinger, M., López-Ariza, B., Arellano-Rodríguez G., Rodríguez-Martínez, R. 2010. The kiss-1-kisspeptin-gpr54 complex: a critical modulator of GnRH neurons during pubertal activation. Journal Applied Biomedicine, 8:1-9.

Migaud M, Daveau A, Malpaux B, 2005. MTNR1A melatonin receptors in the ovine premammillary hypothalamus: day-night variation in the expression of the transcripts. Biology of Reproduction, 72:393-398.

Moaeen-ud-Din M, Yang LG, Chen SL, Zhang ZR, Xiao JZ, Wen QY, Dai M, 2008. Reproductive performance of Matou goat under subtropical monsoonal climate of Central China. Trop. Animal Health Production, 40:17-23.

Moenter SM, Caraty A, Karsch FJ, 1990. The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. Endocrinology, 127:1375-1384.

Moore RW, Miller CM, Dow BW, Staples LD, 1988. Effects of melatonin on early breeding of high and low prolificacy ewes. En: Proceedings de la New Zealand Society of Animal Production, 48:109-111.

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.

Mori Y, Tanaka K, Maeda K, Hoshino R, Kano Y, 1987. Photoperiodic modification of negative and positive feedback effects of estradiol on LH secretion in ovariectomized goats. Journal of Reproduction and Fertility, 80:523-529.

Mortimer D, Lincoln GA, 1982. Ultrastructural study of regressed and activated testes from Soay rams. Journal of Reproduction and Fertility, 64:437-442.

Muduuli DS, Sanford LM, Palmer WM, Howland BE, 1979. Secretory patterns and circadian and seasonal changes in LH, FSH, Prolactine and Testosterone in the male Pygmy goat. Journal of Animal Science, 49:543-553.

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, 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, Inskeep EK, 1986. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. Biology of Reproduction, 35:1187-1194.

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.

Murtagh JJ, Gray SJ, Lindsay DR, Oldham CM, Pearce DT, 1984. The effect of the presence of 'rams' on the continuity of ovarian activity of maiden Merino ewes in spring. Lindsay DR, Pearce DT (Ed.). Reproduction in sheep. Camberra, Australia: Australian Academy of Science, 37-38.

Newman JA, Parsons AJ, Harvey A, 1992. Not all sheep prefer clover: diet selection revisited. Journal of Agricultural Science (Camb), 119:275-283.

Notter DR, Lucas JR, McClaugherty FS, 1981. Accuracy of estimation of testis weight from in situ testis measures in ram lambs. Theriogenology, 15:227-231.

Nowak, R., Rodway, R.G., 1985. Effects of intravaginal implants of melatonin on the onset of ovarian activity in adult and prepubertal ewes. Journal of Reproduction and Fertility, 74:287-293.

Nowak, R., Rodway, R.G., 1987. Length of melatonin exposure and onset of ovarian activity in anoestrous ewes. Journal of Reproduction and Fertility, 80:343-347.

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

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

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'Callaghan D, Donovan A, Sunderland SJ, Boland MP, Roche, JF, 1994. Effect of the presence of male and female flockmates on reproductive activity in ewes. Journal of Reproduction and Fertility, 100:497-503.

Okamura H, Mori Y, 2005. Characterization of the primer pheromone molecules responsible for the 'male effect' in ruminant species. Chemical Senses, 30:140-141.

Oldham CM, 1980. A study of seasonal and ovarian activity in Merino sheep. En PhD Thesis. School of Agricultural, University of Western Australia. Nedlands, WA, 55.

Oldham CM, Pearce DT, Gray SJ, 1985. Progesterone priming and age of ewe affect the life-span of corpora lutea induced in the seasonally anovulatory Merino ewe by the "ram effect". Journal of Reproduction and Fertility, 75:29-33.

Ortavant R, Daveau A, Garnier DH, Pelletier J, de Reviers MM, Terqui M, 1982. Diurnal variation in release of LH and testosterone in the ram. Journal of Reproduction and Fertility, 64:347-53.

Ortavant R, Pelletier J, Ravault JP, Thimonier J, Volland-Nail P, 1985. Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm mammals. Oxford Review of Reproduction of Biology, 7:305-345.

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.

Ortega E, Acosta C, González A, De Alba J, 1981. Age at first parturition and reproductive efficiency in hair sheep. Memorias de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal, 16:135.

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

Over R, Cohen-Tannoudji J, Dehnhard M, Claus R, Signoret JP, 1990. Effect of pheromones from male goats on LH-secretion in anoestrous ewes. Physiology and Behavior, 48:665-8.

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.

Palacín I, Abecia JA, Forcada F, Martín SY, Martino A, 2006. Resultados reproductivos del tratamiento con melatonina en ovejas rasa aragonesa bajo tres sistemas de explotación. En Actas de las XXXI Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Zamora, España, 348-351.

Palacios C, Martín S, Deletang F, Martino A, 2002. Utilización en diciembre de los implantes de melatonina en diferentes razas ovinas en zamora. En: Actas de las XXVII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Septiembre 19-21, Valencia, España, 1088-1093.

Palacios C, Palacín I, Abecia JA, Forcada F, Martín SY, Martino A, 2006. Utilización práctica de los implantes de melatonina para la cubrición de corderas en cuatro razas ovinas. En Actas de las XXXI Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Zamora, España, 352-355.

Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, 2002. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. Cell, 109:307-320.

Pang SF, Lee PPN, Chan YS, Ayre EA, 1993. Melatonin secretion and its rhytms in biological fluids. En Melatonin: Biosynthesis, physiological effects and clinical applications. Yu HS, Reiter RJ (Ed.), CRC Press, 129-153.

Papachristoforou C, Koumas A, Photiou C, 2007. Initiation of the breeding season in ewe lambs and goat kids with melatonin implants**.** http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924873Small Ruminant Research, 73:122-126.

Pautler EL, Hall FL, 1987. Movement of melatonin across the retinal pigmentapithelium. Experimental Eye Research, 45:351-356.

Pearce DT, Gray SJ, Oldham CM, Wilson HR, 1984. Alternative methods of synchronization of ewes in spring using the "ram effect". The use of intravaginal sponges and PMSG. En: Proceedings of the Australian Society of Animal Production, 15:164-168.

Pearce GP, Oldham CM, 1988. Importance of non-olfactory ram stimuli in mediating ram-induced ovulation in the ewe. Journal of Reproduction and Fertility, 84:333-339.

Pelletier J, 1973. Evidence of photoperiodic control of prolactin release in rams. Journal of Reproduction and Fertility, 35: 143-147.

Pelletier J, Almeida 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, Chemineau P, Delgadillo J, 1988. Seasonality of sexual activity and its photoperiodic control in the adult ram and he-goat. En: Proceedings of the XI International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination. Dublín, Ireland, 212-219.

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

Pennycuik PR, 1972. Oestrus frequency and incidence of pregnancy in mice housed singly and in groups at 4, 21 and 33ºC. Australian Journal of Biology Science, 25:801-806.

Pérez B, Mateos E, 1995. Seasonal variations in plasma testosterone levels in Verata and Malagueña bucks. Small Ruminant Research, 15:155-162.

Perez, C, Rodríguez, V, Caballero, I, Mata, C, (2004). Posibilidades de manejo reproductivo en caprino de leche, bajo condiciones de producción ecológicas.

En: I Conferencia Internacional de ganadería ecológica en el sur de Europa. Ed. SEAE y Diputación de Zamora, 345-352.

Perkins A, Fitzgerald JA, 1994. The behavioral component of the ram effect: the influence of ram sexual behavior on the induction of estrous in anovulatory ewes. Journal of Animal Science, 72:51-55.

Picazo RA, González De Bulnes A, Gómez Brunet A, del Campo A, Granados B, Tresguerres 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 Reproduction and Fertility, 120:177-186.

Plotka ED, Seal US, Verme IJ, 1982. Morphologic and metabolic consequences of pinealectomy in deer. En: The pineal gland. Extra-reproductive effects. Reiter RJ (Ed.), Boca Raton, FL, 2:153-168.

Poindron P, Cognié Y, Gayerie F, Orgeur P, Oldham CM, Ravault JP, 1980. Changes in gonadotrophins and prolactin levels in isolated (seasonally or lactationally) anovular ewes associated with ovulation caused by the introduction of rams. Physiology and Behavior, 25:227-236.

Pompolo S, Pereira A, Estrada KM, Clarke IJ, 2006. Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain. Endocrinology, 147:804-810.

Pontes-González JM, Pontes García JM, Pachón MA, Martín S, Martino A. 2003. Seguimiento reproductivo en dehesa La Mata. Mejora de los índices reproductivos con la incorporación de implantes de melatonina en oveja Manchega con sistema star. En: Actas de las XXVIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Septiembre 25-27, Badajoz, España, 198-200.

Pontes-González JM, Pontés García JM, Valares JA, Palacín I, Abecia JA, Forcada F, Martín S, Martino A, 2004. Mejora de los índices reproductivos con la incorporación de implantes de melatonina en oveja Manchega con sistema Star para la cubrición de junio. En: Actas de las XXIX Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Septiembre 22-25, Lleida, España, 160-162.

Poulton AL, Symons AM, Kelly MI, Arendt J, 1987. Intraruminal soluble glass boluses can induce early onset of ovarian activity in ewes. Journal of Reproduction and Fertility, 80:235-239.

Poon A, Chow P, Mak A, Pang S, 1997. Autoradiographic localization of 2-[125l] iodomelatonin binding sites in the gastrointestinal tract of mammals including humans and birds. Journal Pineal Research, 23:5-14

Prandi A, Romagnoli G, Chiesa F, Tamanini C, 1987. Plasma prolactin variations and onset of ovarian activity in lactating anoestrous goats given melatonin. Animal Reproduction Science, 13:291-297.

Prandi A, Motta M, Chiesa F, Tamanini C, 1988. Circannual rhythm of plasma prolactin in the goat. Animal Reproduction Science, 17:95-94.

Price EO, Estep DQ, Wallach SJ, 1991. Sexual performance of rams as determined by maturation and sexual experience. Journal of Animal Science, 69:52.

Ralph MR, Menaker M, 1988. A mutation of the circadian system in golden hamster. Science, 241:1225-1227.

Ramadan TA, Taha TA, Samak MA, Hassan A, 2009. Effectiveness of exposure to longday followed by melatonin treatment on semen characteristics of Damascus male goats during breeding and non-breeding seasons. Theriogenology, 71:458-468.

Ramírez BA, Álvarez RL, Ducoing WA, Trujillo GA, Zarco QL, 1999. Inducción de actividad ovárica en cabras mediante diferentes grados de contacto con hembras inducidas hormonalmente. Memorias de la XIV Reunión Nacional de Caprinocultura; México, 119-124.

Ramírez JC, Abecia JA, Deletang F, Martín S, Martino A, 2004. Eficacia de implantes de melatonina en raza Manchega de aptitud leche en La cubrición de abril. En: Actas de las XXIX Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Septiembre 22-25, Lleida, España, 166-168.

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.

Regisford EGC, Katz LS, 1994. Testicular LH receptor numbers are dependent on serum prolactin (PRL) concentrations in the ram (Ovisaries). Biology of Reproduction, 50(Suppl. 1):112

Reppert SM, Weaver DR, 2002. Coordination of circadian timing in mammals. Nature, 418:935-941.

Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella TF, 1995. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel_{1b} melatonin receptor. En: Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America, 92:8734-8738.

Reppert SM, Weaver DR, Godson C, 1996a. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. Trends Pharmacological Science, 17:100-102.

Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, Mahle CD, Kolakowski LF Jr., 1996b. Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. FEBS Letters, 386:219-224.

Requejo JA, Mulas LF, Palacín I, Valares JA, Abecia JA, Forcafa F, Martín S, Martino A, 2005. Resultados reproductivos con La utilización de implantes de melatonina (Melovine ®) en raza Assaf en la cubrición de agosto-septiembre. En Actas de las XXX Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Septiembre 28-30, Granada, España, 450-452.

Restall BJ, 1992. Seasonal variation in reproductive activity in Australian goats. Animal Reproduction Science, 27:305-318.

Restall BJ, Starr BG, 1977. The influence of season of lambing and lactation on reproductive activity and plasma LH concentrations in Merino ewes. Journal of Reproduction and Fertility, 49:297-303.

Restall BJ, Restall H, Walkden-Brown SW, 1995. The induction of ovulation in anovulatory goats by oestrus females. Animal Reproduction Science, 40:299-303.

Rhim TJ, Kuehl D, Jackson GL, 1993. Seasonal changes in the relationships between secretion of Gondadotropin-Releasing Hormone, Luteinizing Hormone and Testosterone in the ram. Biology of Reproduction, 48:197-204.

Riera S, 1982. Reproductive efficiency and management in goats. En: Proceeding de la III International Conference on goats Production and Disease. Tucson, Arizona, USA, 162-174.

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.

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, 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 and Robertson IS, 1991. The modifying effects of melatonin, ram 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.

Roche JF, Hanrahan JP, Quirke JF, Ronayne E, 1985. Effects of melatonin on the time of onset of the breeding season in different breeds of sheep. En Endocrine Causes of Seasonal and Lacatational Anestrus in Farm Animals. Eds. Ellendorff F., Elasaesser F., Martinus Nijhoff Publishers, 55-66.

Roca J, Martínez E, Sánchez-Valverde MA, Ruiz S, Vázquez JM, 1992. Seasonal variations of semen quality in male goats: study of sperm abnormalities.Theriogenology, 38:115-125.

Rodriguez-Iglesias RM, Ciccioli NH, Irazoqui H, Rodriguez BT, 1991. Importance of behavioral stimuli in ram-induced ovulation in seasonally anovular Corriedale ewes. Applications in Animal Behavior Science, 30:323-332.

Romano JE y Fernandez-Abella D, 1997. Effect of service on duration of Oestrus and ovulation in Dairy goats. Animal Reproduction Science, 47:107-112.

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.

Ronayne E, Jordan B, Quirke JF, Roche JF, 1989. The effect of frequency of administration of melatonin on the time of onset of the breeding season in anoestrus ewes. Animal Reproduction Science, 18:13-24.

Rosa HJD, Bryant MJ, 2003. Seasonality of reproduction in sheep. Small Ruminant Research, 48:155-171.

Rouger Y, 1974. Etude des interactions de l'environnment et des hormones sexuelles dans la regulation du comportement sexual des Bovidae. *Ph.D. Thesis*, Universite de Rennes, 197.

Salamonsen L, Jonas H, Burger HG, Buckmaster J M, Chamley W, Cumming, Findlay JK, Goding JR, 1973. A heterologous radioimmunoassay for follicle stimulating hormone: application to measurement of FSH in the ovine estrous cycle and in several other species including man. Endocrinology, 93:610-618.

Sánchez F, 1981. Pubertad y actividad sexual de los caprinos. Memorias Caprinas. 1er Encuentro Nacional para la Producción Ovina y Caprina. Metepec, Ed. de México. FES-Cuautitlán, UNAM. México, 50-52.

Sánchez A, Serrano MA, Deletang F, Martín S, Martino A. 2003. Resultados reproductivos con implantes de melatonina en ovejas cruce Merino/Fleischaff en La Cooperativa Alanser. Interpretación de curvas de partos. En Actas de las XXVIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Badajoz, España, 212-214.

Sanford LM, Winter JS, Palmer WM, Howland BE, 1974. The profile of LH and testosterone secretion in the ram. Endocrinology, 95:627-631.

Sanford LM, Howland BE, Palmer WM, 1984. Seasonal changes in the endocrine responsiveness of the pituitary and tests of male sheep in relation to their patterns of gonadotropic hormone and testosterone secretion. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 62:827-833.

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. Liverstock Reproduction in Latin America. Vienna, 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, Malpaux 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, Malpaux 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.

Santos R, Martín S, Deletang F, Martino A. 2002. Utilización de los implantes de melatonina en cabra florida en régimen intensivo. En Actas de las XXVII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Valencia, España, 1103-1107.

Scaramuzzi RJ, Baird DT, 1977. Pulsatile release of luteinizing hormone and the secretion of ovarian steroids in sheep during anestrus. Endocrinology, 101:1801-1806.

Scaramuzzi RJ, 1975. Inhibition of oestrous behaviour in ewes by passive immunization against oestradiol-17ß./. Reproduction and Fertility, 42:145-148.

Schanbacher BD, Lunstra DD, 1976. Seasonal changes in sexual activity and serum levels of LH and testosterone in Finnish Landrace and Suffolk rams. Journal of Animal Science, 43:644-650.

Schinkel PG, 1954. The effect of the ram on the incidence and occurrence of oestrus in ewes. Australian veterinary Journal, 30:189.

Scialabba N, 2000. Factors influencing organic agriculture policies with a focus on developing countries. En: IFOAM 2000 Scientific Conference, 28-31 August, Basel, Switzerland, 13.

Shelton M, 1960. The influence of the presence of the male on initiation of oestrus cycling and ovulation in Angora does. Journal of Animal Science, 19:368-375.

Shelton M, 1978. Reproduction and breeding of goats. Journal Dairy Science, 61:994-1010.

Signoret M, 1974. Abundancia, tamaño y distribución de camarones (Crustácea Peneidae) de la laguna de Términos, Campeche, México y su relación con algunos factores hidrológicos. En Instituto Biológico UNAM. Ser. Zool, 45:119-140.

Signoret JP, 1980. Effet de la prèsence du mâle sur les mècanismes de reproduction chez la femelle des mammifères. Reproduction and Nutrition Development, 20:457-468.

Signoret JP, Fulkerson WJ, Lindsay DR, 1982. Effectiveness of testosterone-treated wethers and ewes as teasers. Applications Animal Ethology, 9:37-45.

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.

Smith JF, 1985. Protein, energy and ovulation rate. En The Genetics of Reproduction in Sheep. Land RB, Robinson DW (Ed.), Butterworths, London, 349-359.

Smith JT, Clay CM, Caraty A, Clarke IJ, 2007. Kiss-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. Endocrinology, 148:1150-1157.

Staples L, McPhee S, Ayton B, Reeve J, Williams A, 1986. Optimum melatonin treatment to improve reproductive performance of Merino, Border Leicester x Merino and Rommey ewes joined in spring and early summer. En: Proceedings of the Australian Society of Reproductive Biology, 18:26.

Staples L, McPhee S, Reeve J, Williams AH, 1991. Practical applications for controlled release melatonin implants in sheep. En: Advances in pineal research. Foldes A., Reiter R.J.(eds), J. Libbey & Co Ltd publ., 199-208.

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.

Sugden D, Narnboodiri MAA, Klein DC, Pierce JE, Grady R, Mefford JR, Mefford JR, 1985. Ovine pineal adrenoceptors: Characterization and evidence for a functional role in the regulation serum melatonin. Endocrinology, 116:1960-1967.

Sugden D, 1989. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. Experentia, 45:922-931.

Sunderland SJ, O'Callaghan D, Boland MP, Roche JF, 1990. Social cues can alter the time of reproductive transition in ewes. Journal of Reproduction and Fertility, 5:28.

Szmuszkovicz AM, Heinzelman RV, 1960. Synthesis of N-Acetyl-5-methoxytryptamine. Journal of Organic Chemistry, 25:857-859.

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

Tamayo J, Palacín I, Casas JP, Martino A. 2007. Utilización práctica de los implantes de melatonina para La cubrición de corderas en estación reproductiva. En: Actas de las XXXII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Mallorca, España, 365-367.

Tamboura H, Kabore H, Yameogo SM, 1998. Ethnomedecine veterinaire et pharmacopee traditionnelle dans le plateau central du Burkina Faso: Cas de la province du Passore. Biotechnol. Agronomic Society Environment, 2:181-191.

Tchamitchian L, Ricordeau G, Lefevre C, Desvignes A, 1973. Performances des brebis Romanov soumises a un rythme accelere de reproduction. Annales of Zootechnie, 22:303-310.

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, Viguié 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.

Thimonier J, 1989. Contrôle photopériodique de l'activité ovulatoire chez la brebis. Existence de rythmes endogènes. Doctoral Thesis. University of Tours, France, 116.

Thimonier J, Briey V, Ortavant R, Pelletier J, 1985. Daylength measurement in sheep. Biology of Reproduction, 32:36.

Thwaites CJ, 1965. Photoperiodic control of breeding activity in the Southdown with particular reference to the effects of an equatorial light regime. Journal of Agricultural of Science, 65:57-64.

Tilbrook AJ, Galloway DB, Williams AH, Clarke IJ, 1993. Treatment of young rams with an agonist of GnRH delays reproductive development. Hormones and Behavior, 27:5-28.

Tilbrook AJ, Canny BJ, Serapiglia MD, Ambrose TJ and Clarke IJ, 1999. Suppression of the secretion of luteinizing hormone due to isolation/restraint stress in gonadectomized rams and ewes is influenced by sexsteroids. Journal of Endocrinology, 160:469-481.

Tillet Y, 1995. Distribution of neurotransmitters in the sheep brain. Journal of Reproduction and Fertility, 49:199-220.

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, 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. En Proceeding de la LXXVIII Annual Meeting of the Endocrine Society, San Francisco, CA, 1-673.

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

Underwood EJ, Shier FL, Davenport N, 1944. Studies in sheep husbandry in Western Australia. V. The breeding season of Merino crossbred and British breed ewes in the agricultural districts. Journal of Department of Agricultural West Australia, 11:135-143.

Ungerfeld R, 2008. Response of anoestrous ewes pre-treated with a single dose of oestradiol-17 beta, or progesterone and oestradiol-17 beta, to the introduction of rams and ewes in oestrus. New Zeland Veterinary Journal, 56:36-39.

Ungerfeld R, Forsberg M, Rubianes E, 2004. Overview of the response of anoestrous ewes to the male effect. Reproduction and Fertility Development, 16:479-490.

Valares JA, Abecia JA, Forcada F, Zúñiga O, Gonzalez JM. 2002. Efecto Del tratamiento con melatonina en mayo sobre los resultados reproductivos en ovejas rasa Aragonesa. En: Actas de las XXVII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Valencia, España, 1113-1116.

Valencia J, Bustamante G, 1986. Reproducción de los animales domésticos. Ovinos y Caprinos. Ed. Limusa. México, 347-361.

Valencia M, Sánchez F, 1984. Características de la reproducción de los caprinos. Memorias I Congreso de AZTECA. Querétaro, México, 260-265.

Valencia J, Zarco L, Ducoing A, Murcia C, Navarro R, 1990. Breeding season of Criollo and Granadina goats under constant nutritional level in the Mexican highlands. En: Livestock reproduction in Latin America. International. Atomic Energy Agency Vienna, 321-333.

Van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A, 1999. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. Nature, 398:627-630.

Vandenbergh JG, 1971. The influence of the social environment on sexual maturation in male mice. Journal of Reproduction and Fertility, 24:383-390.

Vandenbergh JG, Drickamer LC, Colby DR, 1972. Social and dietary factors in the

sexual maturation of female mice. Journal of Reproduction and Fertility, 28:397-405.

Vanecek J, 1998. Cellular mechanisms of melatonin action. Physiology Review, 78:687-721.

Varley MA, Foxcroft GR, 1990. Endocrinology of lactating and weaned sows. Journal of Reproduction and Fertility, 40:47-61.

Vázquez MI, MS Blanch, GA Alanis, MA Chaves and A Gonzalez-Bulnes, 2010. Effects of treatment with a prostaglandin analogue on developmental dynamics and functionality of induced corpora lutea in goats. Animal Reproduction Science, 118:42-47.

Véliz FG, Poindron P, Malpaux B, Delgadillo JA, 2006. Positive correlation between the body weight of anestrous goats and their response to the male effect with sexually active bucks. Reproduction, Nutrition and Development, 46:657-661.

Venus SW, Rosback M, 1997. Post-transcriptional regulation contributes to Drosophila clock gene mRNA cycling. EMBO Journal, 16:46-55.

Vielhaber S, Kunz D, Winkler K, Wiedemann FR, Kirches E, Feistner H, 2000. Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Brain, 123:1339-1348.

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

Viguié C, Caraty A, Locatelli A, Malpaux 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, Malpaux 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.

Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD,

Dove WF, Pinto LH, Turek FW, Takahashi JS, 1994. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. Science, 264:719-725.

Viveiros MM, Liptrap RM, 1995. Altered ovarian follicle function in ACTH-treated gilts. Animal Reproduction Science, 40:107-119.

Vivien-Roels B, Malan A, Rettori MC, Delagrange P, Jeanniot JP, Pevet P, 1999. Daily variations in pineal melatonin concentrations in inbred and outbred mice. Journal Biological Rhythms, 13:403- 409.

Wagon KA, Rollins WC, Cupps PT, Carroll FD, 1972. Effects of stress factors on the oestrus cycles of beef heifers. Journal of Animal Science, 34:1003-1010

Walkden-Brown SW, Restall BJ, 1992. Seasonal variation in and prediction of testicular and epididimal sperm content in Australian Cashmere bucks. En: Vth. International Conference on Goats, 314.

Walkden-Brown SW, Restall BJ, Henniawati, 1993a. The male effect in the Australian Cashmere goat. 1. Ovarian and behavioral response of seasonally anovulatory does following the introduction of bucks. Animal Reproduction Science, 32:41-53.

Walkden-Brown SW, Restall BJ, Henniawati, 1993b. The male effect in the Australian Cashmere goat. 2. Role of olfactory cues from the male. Animal Reproduction Science, 32:55-67.

Walkden-Brown SW, Restall BJ, Henniawati, 1993c. The male effect in the Australian Cashmere goat. 3. Enhancement with buck nutrition and use of oestrus females. Animal Reproduction Science, 32:69-84.

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, Norton BW, Restall BJ, 1994c. Seasonal variation in voluntary feed intake and growth in cashemere bucks fed ad libitum of low and high quality. Australian Journal Agricultural Research, 45:355-366.

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.

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, 1989. Social cues can play a role in timing onset of the breeding season of the ewe. Journal of Reproduction and Fertility, 87:707-713.

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.

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.

Wetteman RP, Tucker HA, 1974. Relationship of ambient temperature to serum prolactin in heifers. En: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 146:908-911.

Williams AH, McPhee S, Ayton BM, Staples LD, 1986. Dose dependent effects of continuous melatonin administration on the seasonal pattern of estrous cyclicity and ovulation rate in corriedale ewes. En: Proceedings of the Australian Society of Reproductive Biology, 8:27.

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.

Woodfill CJ, Wayne N, Moenter SM, Karsch F, 1994. Photoperiodic synchronisation of a circannual reproductive rhythm in sheep: identification of season-specific time cues. Biology of Reproduction, 50:965-976;

Worthy K, Haresign W, 1983. Evidence that the onset of seasonal anoestrus in the ewe may be independent of increasing prolactin concentrations and daylength. Journal of Reproduction and Fertility, 69:41-48.

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.

Yeates NTM, 1949. The breeding season of the ewe with particular reference to its modification by artificial means using light. Journal of Agricultural Science, 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.

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, Reiter RJ, 1993. Melatonin. Biosynthesis, physiological effects and clinical applications. En Ed. Boca Ratón Florida, 1-17.

Zarazaga LA, Malpaux B, Chemineau P, 1996a. Characteristics of the plasma melatonin rhythm are not modified by steroids during the estrous cycle in IIe-de-France ewes. Journal of Pineal Research, 21:114-120.

Zarazaga LA, Malpaux 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, Forcada F, Abecia JA, Lozano JM, 1996c. Date of reinitiation of the breeding season could be related with relative changes in plasma melatonin amplitude in ewes. Webb SM, Puig-Domingo M, Molle, M, Pévet P (Ed.), Pineal Update. From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. PJD Publications Ltd, Westbury, USA, 295-300.

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

Zarazaga LA, Celi I, Guzmán JL, Malpaux B, 2010a. Melatonin concentrations in the two jugular veins, and relationship with the seasonal reproductive activity in goats. Theriogenology, 74:221-228.

Zarazaga LA, Todini L, Chemineau P, Marnet P-G, Locatelli A, Malpaux B, 2010b. 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, 2011a. 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.

Zarazaga LA, Celi I, Guzmán JL, Malpaux B, 2011b. 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

Zarazaga LA, Celi I, Guzmán JL, Malpaux B, 2011c. The role of nutrition in the regulation of luteinizing hormone secretion by the opioidergic, dopaminergic and serotoninergic system in female Mediterranean goat. Biology of Reproduction, 84:447-454.

Zarazaga, L.A., Celi, I., Guzmán J.L., Malpaux, B. 2012. Enhancement of the male effect on reproductive performance in female Mediterranean goats with long day and/or melatonin treatment. The Veterinary Journal 10.1016/j.tvjl.2011.09.012 .

Zarco QL, Rodríguez EF, Angulo MRB, Valencia MJ, 1995. Female to female stimulation of ovarian activity in the ewe. Animal Reproduction Science, 39:251-258.

Zheng B, Albrecht U, Kaasik K, Sage M, Lu W, Vaishnav S, Li Q, Sun ZS, Eichele G, Bradley A, Lee CC. 2001. Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. Cell, 105:683–694.

Zubieta M, 1990. Evolución y valoración de la actividad funcional en machos reproductores caprinos durante su desarrollo. Tesis Master. Zaragoza, España, 303.

Zúñiga O, Forcada F, Abecia JA, 2002. The effect of melatonin implants on the response to the male effect and on the subsequent cyclicity of Rasa Aragonesa ewes implanted in April. Animal Reproduction Science, 72:165-174.

OTRAS PUBLICACIONES

OTRAS PUBLICACIONES

Comunicación 1: Se corresponde con el objetivo 5:

Tipo: Póster (P1)

Efecto a corto plazo de los implantes de melatonina sobre los parámetros espermáticos en machos caprinos Mediterráneos.

Short term effect of melatonin implants on sperm parameters in Mediterranean goat males.

María Carolina Gatica, José Luis Guzmán, Raquel Farauste, Lucía Ijano, Sebastián Martín, Alex Martino, Luis Ángel Zarazaga.

En VIII Congreso Internacional de la Asociación Española de Reproducción Animal (AERA), Murcia, España. *Reproduction in Domestic Animals* (2006) 41:107.

Poster Abstracts

P1

Short Term Effect of Melatonin Implants on Sexual Activity in Mediterranean Goat Does Without Male Effect

MC Gatica[1], JL Guzmán[1], R Farauste[1], L Ijano[1], S Martín[2], A Martino[2] and LA Zarazaga[1]

[1]*Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Huelva, Spain,* [2]*Ceva Salud Animal Barcelon, Spain*

The aim of this study was to determine if treatment with exogenous melatonin during seasonal anestrous can induce reproductive activity in does without the use of male effect. Thirty-one adult and empty does were used. The 18th March 2005 group M (n = 15) received 1 s.c. implant of melatonin while control group (group C; n = 16) was not treated. These groups were balanced according to their live weight and body condition score. From March to June 2005 body weight and body condition score were measured weekly. Oestrous activity was tested daily using entire aproned males. Ovulation rate was evaluated by laparoscopy 7 days after positive identification of oestrus. Effect of melatonin treatment on different variables was tested. No effect of exogenous melatonin on body weight or body condition score was observed. Date of first detected oestrous was highly variable between groups (18th April ± 5.17 vs 15th May ± 1.15 days for M and C groups, respectively, $p < 0.05$). Moreover a higher percentage of does showed oestrous on M group (73% vs 12.5% for M and C groups, respectively, $p < 0.05$). No effect of melatonin on ovulation rate was observed. We can conclude that melatonin implants can induce reproductive activity and that male effect cannot be essential in Mediterranean goats.

P2

Short Term Effect of Melatonin Implants on Sperm Parameters in Mediterranean Goat Males

MC Gatica[1], JL Guzmán[1], S Martín[2], A Martino[2], P Vilar[1] and LA Zarazaga[1]

[1]*Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Huelva, Spain,* [2]*Ceva Salud Animal, Barcelona Spain*

One experiment was conducted to determine whether melatonin treatment can enhance sperm parameters in bucks during seasonal anestrous. Two groups of balanced bucks were used. In March 2005, one group (M) received 3 s.c. implants of melatonin (n = 7) and other group (n = 4) were used as control (C). Body weight was measured weekly and testicular weight every 15 days throughout the experiment. Testicular weight was determined by comparative palpation with an orchidometer, always by the same operator. From March to June, during the first 8 days of each month volume of ejaculate and sperm concentration were assessed in all males. Each of these 8-d periods was divided into 3-d periods of daily sperm collection separated by 2 d of rest. The semen was collected using an artificial vagina. Bucks had 5 minutes to ejaculate following exposure to estrogenized female. The effect of melatonin treatment was studied on each variable. No differences between groups were observed on body weight or testicular weight. A clear effect of treatment with melatonin was observed on ejaculation volume (1.17 ± 0.69 vs 0.704 ± 0.38 ml, for M and C, respectively, $p < 0.01$) and on sperm concentration ($5.43 \times 10^9 \pm 3.0 \times 10^8$ vs $4.09 \times 10^9 \pm 2.8 \times 10^8$ sperm/ml, for M and C, respectively, $p < 0.05$). Results demonstrate that melatonin treatment could enhance sperm parameters during the seasonal anestrous in Mediterranean bucks.

P3

Increase in Fertility and Prolificacy in Swine by Hormone Supplementation (Lechon-Plus®) to Extended Semen on Artificial Insemination

MT Román[1], JC Domínguez[2], M Abad[2], J Peláez[2], B Alegre[2] and R González[2]

[1]*Área de Producción Animal, Escuela Técnica Sup Ing Agraria, University de Valladolid, Palencia,* [2]*Departmento Reproduccion Obstetricia, University de León, Spain*

The objective of the research reported here was to check on the effects that the seminal additive LECHON-PLUS (10 μg 17-betaestradiol, 5 IU oxytocin and 2 mM caffeine/ml) had on fertility and prolificacy when it was added just before insemination to doses of semen that had been stored under refrigeration. The work was carried out in seven commercial pig farms in North-West Spain over a 365-day period, starting in June 2000. A total of 2715 sows were inseminated and two randomly-formed experimental groups were established. Group 1 was made up of control sows inseminated without the additive being mixed into the semen. Group 2 consisted of sows inseminated with semen supplemented with 1 ml of seminal additive mixed with semen just prior to insemination. The results were as follows: fertility, 83.64% vs 88.30% ($p < 0.05$) and live-born piglets, 10.49 vs 10.79 ($p < 0.05$) for groups 1 and 2 respectively. The conclusion is that the use of LECHON-PLUS® (1 ml), mixed with doses of semen kept under refrigeration just before insemination, does increase fertility and improve prolificacy, yielding a larger number of live-born piglets.

P4

Effect of Selenium and Vitamin E Addition in the Diet on Young Boar Seminal Characteristics

S Echeverría, F Centurión, R Ake, M Alfaro, R Santos, A Alzina and J Rodríguez

Faculty of Veterinary Medicine, University of Yucatán, México

Utilization of Selenium (Se) and Vitamin E (VE) in boar diets improve motility and spermatozoa morphological integrity (Marin-Guzman et al. 2000a. 78: 1537–1543) because of their antioxidant functions. The use of both could prevent damage on spermatozoa during hot season. The aim of this work was to evaluate the effect of addition Se and VE in the diet on seminal characteristics of young boars. This work was done in two seasons (S) (January–April and September–December). Sixteen 12 month-old commercial boars were allocated (n = 4) to one of four dietary treatments: (i) control, Se 0 ppm–VE 0 IU/kg; (ii) Se 0–VE 250; (iii) Se 0.5–VE 250 and (iv) Se 0.5–VE 0. Data were analyzed as a factorial design [2 (Se) × 2 (VE) × 2 (S)]. A mixed model analysis for repeated measurements was performed. Seminal volume was affected by S (fresh 203.9 ± 5.13 vs hot 231.6 ± 5.64 m; $p < 0.001$). Sperm motility (SM) was significantly higher in Se and VE treatment ($p < 0.001$) than in control (87.5 ± 1.06, 88.8 ± 1.11 vs 76.5 ± 1.08%). There was significant interaction Se × VE in SM ($p < 0.001$). SM was significantly higher ($p < 0.001$) in fresh season (85.2 ± 0.96%) vs hot (75.2 ± 1.06%). Sperm concentration was only affected by VE (420.4 ± 14.3 vs control, 337. 6 ± 19.9 mill spermatozoa/ml; $p < 0.001$) and by S (fresh 454.4 ± 15.5 vs hot 303.7 ± 19.0 mill spermatozoa/ml; $p < 0.001$). These results indicate that high temperatures decrease seminal quality and VE or Se improves seminal quality regardless of the year season.

© 2006 The Authors. Journal compilation © 2006 Blackwell Verlag

SHORT TERM EFFECT OF MELATONIN IMPLANTS ON SPERM PARAMETERS IN MEDITERRANEAN GOAT MALES

Gatica, M.C., Guzmán, J.L., Martín, S.*, Martino, A.*, Vilar, P., Zarazaga L.A.
Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva,Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819 Palos de la Frontera, Huelva, Spain
*Ceva Salud Animal. C/ Caraballa La niña, 12, 5ª Planta, 08017 Barcelona Spain

INTRODUCTION

Mediterranean goats males shows a clear seasonality of reproductive activity and sperm parameters.

AIMS

One experiment was conducted to determine whether melatonin treatment can enhance sperm parameters in bucks during seasonal anoestrous.

MATERIAL AND METHODS

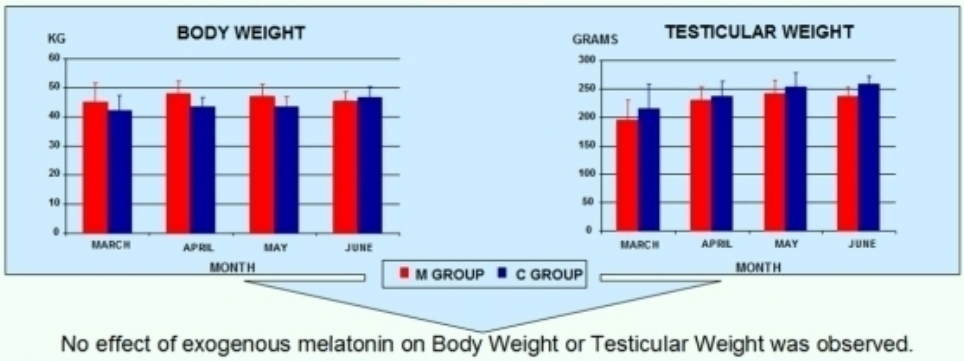
Experiment started the 18th March when animals were divided into two groups balanced according to their live and testicular weight.

- Group M: received 3 s.c. implants of Melatonin (Melovine ®): N=7.
- Group C: group without melatonin: N=4.

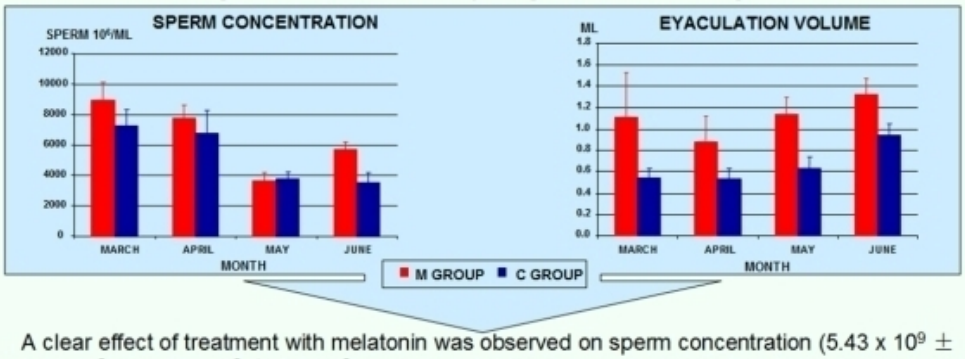
Measurements from onset of experiment to June:

- Body weight was measured weekly.
- Testicular weight was assessed by comparative palpation with an orchidometer, every 15 days always by the same operator.
- Volume of ejaculation and sperm concentration:
  - Semen was analyzed during the first 8 days of each month.
  - Each of these 8-d periods was divided into 3-d periods of daily sperm collection separated by 2 d of rest.
  - Semen was collected using an artificial vagina. Bucks had 5 minutes to ejaculate following exposure to estrogenized female.

RESULTS



No effect of exogenous melatonin on Body Weight or Testicular Weight was observed.



A clear effect of treatment with melatonin was observed on sperm concentration ($5.43 \times 10^9 \pm 3.0 \times 10^8$ vs $4.09 \times 10^9 \pm 2.8 \times 10^8$ sperm/ml, for M and C, respectively, $P<0.05$) and ejaculation volume (1.17 ± 0.69 vs 0.70 ± 0.38 ml, for M and C, respectively, $P<0.01$).

CONCLUSIONS

Results demonstrate that melatonin treatment could enhance sperm parameters during the seasonal anoestrous in Mediterranean bucks.

PERSPECTIVES

- The long term effect of melatonin treatment on reproductive and semen parameters.
- The combination with other treatments like artificial long days previously to treatment with melatonin implants.

Comunicación 2: Se corresponde con el objetivo 1:

Tipo: Póster (P2)

Efecto a corto plazo de los implantes de melatonina sobre la actividad sexual en hembras caprinas Mediterráneas sin efecto macho.

Short term effect of melatonin implants on sexual activity in Mediterranean goat does without male effect.

María Carolina Gatica, José Luis Guzmán, Sebastián Martín, Alex Martino, Pilar Vilar, Luis Ángel Zarazaga.

En VIII Congreso Internacional de la Asociación Española de Reproducción Animal (AERA), Murcia, España. *Reproduction in Domestic Animals* (2006) 41:107.

Poster Abstracts

P1

Short Term Effect of Melatonin Implants on Sexual Activity in Mediterranean Goat Does Without Male Effect

MC Gatica[1], JL Guzmán[1], R Farauste[1], L Ijano[1], S Martín[2], A Martino[2] and LA Zarazaga[1]

[1]*Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Huelva, Spain,* [2]*Ceva Salud Animal Barcelon, Spain*

The aim of this study was to determine if treatment with exogenous melatonin during seasonal anestrous can induce reproductive activity in does without the use of male effect. Thirty-one adult and empty does were used. The 18th March 2005 group M (n = 15) received 1 s.c. implant of melatonin while control group (group C; n = 16) was not treated. These groups were balanced according to their live weight and body condition score. From March to June 2005 body weight and body condition score were measured weekly. Oestrous activity was tested daily using entire aproned males. Ovulation rate was evaluated by laparoscopy 7 days after positive identification of oestrus. Effect of melatonin treatment on different variables was tested. No effect of exogenous melatonin on body weight or body condition score was observed. Date of first detected oestrous was highly variable between groups (18th April ± 5.17 vs 15th May ± 1.15 days for M and C groups, respectively, $p < 0.05$). Moreover a higher percentage of does showed oestrous on M group (73% vs 12.5% for M and C groups, respectively, $p < 0.05$). No effect of melatonin on ovulation rate was observed. We can conclude that melatonin implants can induce reproductive activity and that male effect cannot be essential in Mediterranean goats.

P2

Short Term Effect of Melatonin Implants on Sperm Parameters in Mediterranean Goat Males

MC Gatica[1], JL Guzmán[1], S Martín[2], A Martino[2], P Vilar[1] and LA Zarazaga[1]

[1]*Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Huelva, Spain,* [2]*Ceva Salud Animal, Barcelona Spain*

One experiment was conducted to determine whether melatonin treatment can enhance sperm parameters in bucks during seasonal anestrous. Two groups of balanced bucks were used. In March 2005, one group (M) received 3 s.c. implants of melatonin (n = 7) and other group (n = 4) were used as control (C). Body weight was measured weekly and testicular weight every 15 days throughout the experiment. Testicular weight was determined by comparative palpation with an orchidometer, always by the same operator. From March to June, during the first 8 days of each month volume of ejaculate and sperm concentration were assessed in all males. Each of these 8-d periods was divided into 3-d periods of daily sperm collection separated by 2 d of rest. The semen was collected using an artificial vagina. Bucks had 5 minutes to ejaculate following exposure to estrogenized female. The effect of melatonin treatment was studied on each variable. No differences between groups were observed on body weight or testicular weight. A clear effect of treatment with melatonin was observed on ejaculation volume (1.17 ± 0.69 vs 0.704 ± 0.38 ml, for M and C, respectively, $p < 0.01$) and on sperm concentration ($5.43 \times 10^9 \pm 3.0 \times 10^8$ vs $4.09 \times 10^9 \pm 2.8 \times 10^8$ sperm/ml, for M and C, respectively, $p < 0.05$). Results demonstrate that melatonin treatment could enhance sperm parameters during the seasonal anestrous in Mediterranean bucks.

P3

Increase in Fertility and Prolificacy in Swine by Hormone Supplementation (Lechon-Plus®) to Extended Semen on Artificial Insemination

MT Román[1], JC Domínguez[2], M Abad[2], J Peláez[2], B Alegre[2] and R González[2]

[1]*Área de Producción Animal, Escuela Técnica Sup Ing Agraria, University de Valladolid, Palencia,* [2]*Departmento Reproduccion Obstetricia, University de León, Spain*

The objective of the research reported here was to check on the effects that the seminal additive LECHON-PLUS (10 μg 17-betaestradiol, 5 IU oxytocin and 2 mM caffeine/ml) had on fertility and prolificacy when it was added just before insemination to doses of semen that had been stored under refrigeration. The work was carried out in seven commercial pig farms in North-West Spain over a 365-day period, starting in June 2000. A total of 2715 sows were inseminated and two randomly-formed experimental groups were established. Group 1 was made up of control sows inseminated without the additive being mixed into the semen. Group 2 consisted of sows inseminated with semen supplemented with 1 ml of seminal additive mixed with semen just prior to insemination. The results were as follows: fertility, 83.64% vs 88.30% ($p < 0.05$) and live-born piglets, 10.49 vs 10.79 ($p < 0.05$) for groups 1 and 2 respectively. The conclusion is that the use of LECHON-PLUS® (1 ml), mixed with doses of semen kept under refrigeration just before insemination, does increase fertility and improve prolificacy, yielding a larger number of live-born piglets.

P4

Effect of Selenium and Vitamin E Addition in the Diet on Young Boar Seminal Characteristics

S Echeverría, F Centurión, R Ake, M Alfaro, R Santos, A Alzina and J Rodríguez

Faculty of Veterinary Medicine, University of Yucatán, México

Utilization of Selenium (Se) and Vitamin E (VE) in boar diets improve motility and spermatozoa morphological integrity (Marin-Guzman et al. 2000a. 78: 1537–1543) because of their antioxidant functions. The use of both could prevent damage on spermatozoa during hot season. The aim of this work was to evaluate the effect of addition Se and VE in the diet on seminal characteristics of young boars. This work was done in two seasons (S) (January–April and September–December). Sixteen 12 month-old commercial boars were allocated (n = 4) to one of four dietary treatments: (i) control, Se 0 ppm–VE 0 IU/kg; (ii) Se 0–VE 250; (iii) Se 0.5–VE 250 and (iv) Se 0.5–VE 0. Data were analyzed as a factorial design [2 (Se) × 2 (VE) × 2 (S)]. A mixed model analysis for repeated measurements was performed. Seminal volume was affected by S (fresh 203.9 ± 5.13 vs hot 231.6 ± 5.64 m; $p < 0.001$). Sperm motility (SM) was significantly higher in Se and VE treatment ($p < 0.001$) than in control (87.5 ± 1.06, 88.8 ± 1.11 vs 76.5 ± 1.08%). There was significant interaction Se × VE in SM ($p < 0.001$). SM was significantly higher ($p < 0.001$) in fresh season (85.2 ± 0.96%) vs hot (75.2 ± 1.06%). Sperm concentration was only affected by VE (420.4 ± 14.3 vs control, 337. 6 ± 19.9 mill spermatozoa/ml; $p < 0.001$) and by S (fresh 454.4 ± 15.5 vs hot 303.7 ± 19.0 mill spermatozoa/ml; $p < 0.001$). These results indicate that high temperatures decrease seminal quality and VE or Se improves seminal quality regardless of the year season.

© 2006 The Authors. Journal compilation © 2006 Blackwell Verlag

SHORT TERM EFFECT OF MELATONIN IMPLANTS ON SEXUAL ACTIVITY IN MEDITERRANEAN GOAT DOES WITHOUT MALE EFFECT

Gatica, M.C., Guzmán, J.L., Farauste, R., Ijano, L., Martín, S.*, Martino, A.*, Zarazaga L.A.
Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva,Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819 Palos de la Frontera, Huelva, Spain
*Ceva Salud Animal. C/ Caraibela La niña, 12, 5ª Planta, 08017 Barcelona Spain

INTRODUCTION

In some intensive systems of goat production it turns out very difficult to perform the male effect because no effective isolation of males and females can be carried out, and in these conditions, the use of melatonin implants it is make difficult.

AIMS

The aim of this study was to determine if treatment with exogenous melatonin during seasonal anoestrous can induce reproductive activity in does without the use of male effect.

MATERIAL AND METHODS

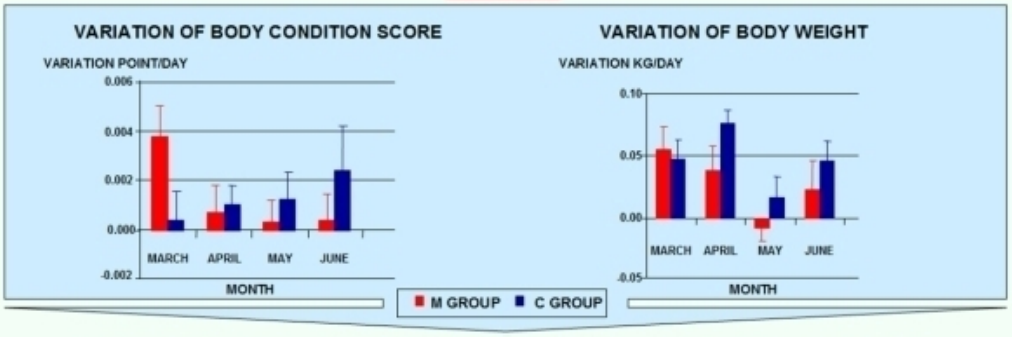
Experiment started the 18th March when animals were divided into two groups balanced according to their live weight and body condition score.

- Group M: received 1 s.c. implants of Melatonin (Melovine ®): N=15.
- *Group C: group without melatonin*: N=16.

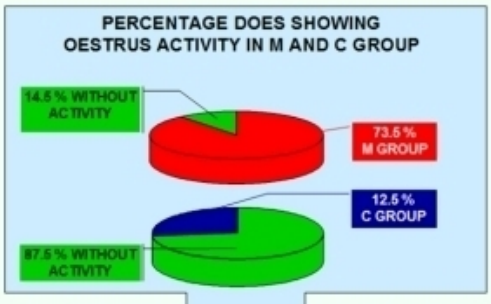
Measurements from onset of experiment to June:

- Body weight and body condition score weekly.
- Oestrus activity was tested daily using entire aproned males.
- Ovulation rate was evaluated by laparoscopy 7 days after identification of oestrus.

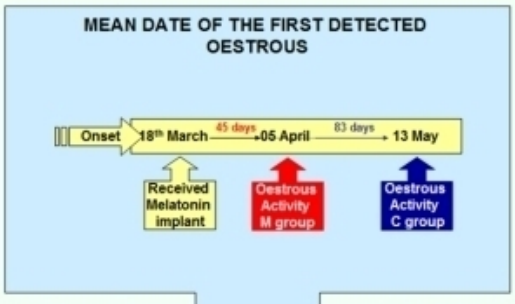
RESULTS



No effect of exogenous melatonin on variation of body weight or body condition score was observed.



Higher percentage of animals showed oestrous in treated group, P<0.05.



Highly variable between groups, P<0.05.

No effect of exogenous melatonin on ovulation rate of the first detected oestrous was observed.

CONCLUSIONS

The Melatonin implants can induce reproductive activity and male effect cannot be essential in Mediterranean goats.

PERSPECTIVES

To evaluate treatments that combine implants of Melatonin with artificial photoperiod.

Comunicación 3: Se corresponde con el objetivo 5:

Tipo: Oral

Efecto de la Utilización de Fotoperiodo y/o melatonina durante el anestro estacionario sobre parámetros de calidad seminal en caprinos Mediterráneos.

María Carolina Gatica, José Luis Guzmán, Alex Matino, Luis Ángel Zarazaga.

En: Actas XII Jornadas sobre producción animal. *Información Técnica Económica Agraria*, (2007) Volumen extra, tomo I, 28:3-5.

ITEA (2007), Vol. **Extra N.º 28.** Tomo I, 3-5

EFECTO DE LA UTILIZACIÓN DE FOTOPERIODO Y/O MELATONINA DURANTE EL ANESTRO ESTACIONARIO SOBRE PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL EN CAPRINOS MEDITERRÁNEOS

Gatica, M.C., Guzmán, J.L., Martino, A.*, Zarazaga, L.A.
Universidad de Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819, Huelva, España
*Ceva Salud Animal. C/ Carabela La niña, 12, 5ª Planta, 08017 Barcelona, España

INTRODUCCIÓN

La estacionalidad reproductiva es un factor limitante en la producción caprina. Este mecanismo fisiológico conlleva una disminución de la actividad reproductiva durante la primavera y el verano, periodo que se denomina anestro estacionario. En las hembras se manifiesta con una disminución de la actividad ovulatoria y en los machos con una reducción de su libido y calidad seminal. Este periodo de inactividad reproductiva puede modificarse si los animales son sometidos a tratamientos con melatonina exógena o alterando determinadas condiciones ambientales como el fotoperiodo.

El objetivo del presente trabajo consistió en determinar el efecto de la administración de melatonina exógena y el efecto de la combinación de fotoperiodo artificial de días largos y posterior tratamiento con melatonina exógena, sobre parámetros de producción y calidad seminal de machos caprinos mediterráneos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Dos experimentos fueron llevados a cabo en años consecutivos para evaluar el efecto a corto plazo de la utilización de implantes de melatonina y la combinación de tratamiento fotoperiódico de días largos y administración de implantes de melatonina al final del mismo.

Ambos experimentos se realizaron en las dependencias de la planta experimental de la Universidad de Huelva, latitud 37º 15' N.

Experimento 1:

Se utilizaron 11 machos caprinos adultos que fueron distribuidos en dos lotes. El 18 de marzo del 2005, 7 machos recibieron 3 implantes subcutáneos de melatonina Melovine® (grupo M) y los 4 restantes fueron utilizados como lote control (grupo C). Estos animales se encontraban en condiciones de fotoperiodo natural.

Experimento 2:

Se utilizaron 11 machos caprinos adultos que fueron distribuidos en dos lotes. El 14 de noviembre de 2005 un grupo de 6 machos fue sometido a un tratamiento de fotoperiodo artificial de días largos (16 horas de luz-8 horas de oscuridad) durante 98 días. El 20 de Febrero de 2006 se les administró 3 implantes subcutáneos de melatonina Melovine® a cada uno de ellos (grupo FM). En dicho experimento otros 5 machos actuaron como testigo (grupo T) que no recibió ningún tratamiento de luz suplementario ni tratamiento hormonal.

Metodología general:

En ambos experimentos los grupos fueron equilibrados de acuerdo al peso vivo y tamaño testicular.

Mensualmente se evaluaron los parámetros de producción y calidad seminal. Para ello, los 8 primeros días de cada mes se dividieron en dos periodos de 3 días consecutivos de colectas, separados por dos días de descanso.

El semen fue recolectado utilizando vagina artificial. Los machos disponían de 5 minutos para eyacular, desde el momento de presentación a una hembra estrogenizada.

Los parámetros evaluados fueron:

a) Producción espermática: fue calculada midiendo el volumen y la concentración espermática.

b) Velocidad curvilínea (VCL, µm/s): velocidad media de la cabeza espermática a lo largo de su trayectoria.

c) Velocidad rectilínea (VSL, µm/s): velocidad media de la cabeza espermática a lo largo de la línea recta que une la primera posición en el análisis y la última.

d) Linealidad (LIN, %): linealidad de la trayectoria curvilínea (LIN=VSL/VCL x100).

Todos estos parámetros fueron analizados mediante un sistema computerizado de análisis seminal (CASA, Sperm Class Analyzer, Microptic, Barcelona, Spain).

La evaluación de los resultados se realizó a partir del mes y medio y a los dos meses y medio post aplicación del implante de melatonina, que correspondería a los meses de mayo y junio en el experimento 1 y a los meses de abril y mayo del experimento 2. Se eligieron estos momentos ya que desde un punto de vista de explotación comercial sería cuando estos machos deberían ser utilizados para llevar a cabo las cubriciones.

Se calculó la media ± s.e. de cada uno de los parámetros en estudio. Se analizó el efecto del tratamiento con melatonina (experimento 1) o fotoperiodo-melatonina (experimento 2) sobre los parámetros anteriormente mencionados así como las posibles diferencias entre los lotes dentro de cada uno de los meses estudiados. Estos análisis se llevaron a cabo utilizando un análisis de varianza excepto para la variable LIN en la que se realizó un análisis de χ^2. Para ello se utilizó el paquete estadístico SPSS (SPSS, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A) EXPERIMENTO 1 EFECTO DE LA APLICACIÓN DE MELATONINA EXÓGENA SOBRE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL

La tabla 1 muestra las medias ± s.e. de cada una de las variables analizadas, así como los resultados de los factores estudiados. Se observó un efecto significativo de la utilización de implantes de melatonina sobre la producción espermática (P<0,05), de forma que el lote implantado tuvo una mayor producción de semen con respecto al lote control. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Kaya *et al.* (2000) en moruecos y, sin embargo, son similares a los obtenidos por Delgadillo *et al.* (1991) en machos cabríos sometidos a ciclos cortos de tratamiento fotoperiódico.

No se observó efecto del tratamiento con melatonina exógena sobre los parámetros de motilidad espermática. En relación con este hecho, existen pocos resultados en la bibliografía internacional que demuestren la efectividad de este tratamiento tanto sobre la producción espermática como sobre los parámetros de motilidad seminal.

Tabla 1: media ± s.e. de producción espermática (espermatozoides/eyaculado), Velocidad curvilínea (VCL, µm/s), Velocidad rectilínea (VSL, µm/s) y Linealidad (LIN, %) para el lote tratado con melatonina (M) y control (C).

LOTE	Producción (esp./eyac.)	VCL, µm/s	VSL, µm/s	LIN, %
M (n=7)	5430,78 ± 608,68a	91,89 ± 7,73	68,81 ± 5,54	68,68 ± 5,36
C (n=4)	2988,79 ± 516,77b	99,36 ± 9,72	71,51 ± 7,36	66,71 ± 5,36

Letras diferentes (a,b) en la misma columna indican diferencias significativas P<0,05.

B) EXPERIMENTO 2 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A DÍAS LARGOS Y POSTERIOR APLICACIÓN DE MELATONINA EXÓGENA SOBRE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL

La tabla 2 muestra las medias ± s.e. de cada una de las variables analizadas, así como los efectos de los factores estudiados. En este caso no se observó efecto del tratamiento fotoperiódico junto con la melatonina exógena sobre la producción espermática, si bien la producción de semen en los animales tratados supuso una mejora de un 22,9% con respecto al lote testigo. Estos resultados son similares a los obtenidos por Delgadillo *et al.* (2001) en un estudio en el que sometieron a machos criollos a un tratamiento fotoperiódico de días largos y posterior utilización de implante de melatonina.

Sin embargo, en este caso el tratamiento utilizado provocó diferencias entre los lotes, siendo más elevados para el lote tratado en el caso de VCL y VSL y no existiendo diferencias en el caso del % de LIN. Estos resultados son similares a los obtenidos durante el periodo de actividad reproductiva trabajando con machos de raza Payoya en unas condiciones y manejo similares a las del presente experimento (Zarazaga *et al.*, resultados no publicados).

Tabla 2: media ± s.e. de producción espermática (espermatozoides/eyaculado), Velocidad curvilínea (VCL, µm/s), Velocidad rectilínea (VSL, µm/s) y Linealidad (LIN, %) para el lote tratado con fotoperiodo y melatonina (FM) y testigo (T).

LOTE	Producción (esp./eyac.)	VCL, µm/s	VSL, µm/s	LIN, %
FM (n=6)	6642,26 ± 525,47	112,57 ± 2,64a	82,02 ± 2,57a	72,55 ± 1,24
T (n=5)	5406,57 ± 714,52	101,34 ± 3,84b	72,97 ± 3,05b	72,28 ± 1,64

Letras diferentes (a,b) en la misma columna indican diferencias significativas $P<0,05$.

Estos resultados demuestran que durante el anestro estacionario la utilización de implantes de melatonina permite una mejora de la producción espermática y que la combinación de tratamiento fotoperiódico de días cortos previo a la colocación de los implantes, además de incrementar la producción espermática permite lograr unos parámetros de calidad seminal que serían similares a los observados durante el periodo de actividad reproductiva en razas caprinas mediterráneas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado gracias al proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia INIA RZ2004-00006-C02-01 y PETRI 95-0964.OP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Delgadillo, J. A., Carrillo, E., Moran, 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, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P. 1991. Decrease in the seasonality of sexual behavior and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. Theriogenology, 36:755-770.

Kaya, A., Baspinar, N., Yildiz, C., Kurtoglu, F., Ataman, M.B., Haliloglu, S. 2000. Influence of melatonin implantation on sperm quality, biochemical composition of the seminal plasma and plasma testosterone levels in rams. Revue de Médicine Vétérinaire, 151:1143-1146.

SPSS, 1999. Manual del Usuario Versión 14. 0. SPSS Inc., Chicago, pp. 548.

Comunicación 4: Se corresponde con el objetivo 5:

Tipo: Póster (P71)

Efecto de melatonica exógena asociada a fotoperiodo artificial de días largos sobre parámetros reproductivos en machos caprinos Mediterráneoas.

Effect of exogenous melatonin associated with artificial long days on Reproductive parameters in Mediterranean goat males

María Carolina Gatica, José Luis Guzmán, Alex Martino, Luis Ángel Zarazaga.

En la XI Conferencia Anual de la Sociedad Europea de Reproducción de Animales Domésticos (ESDAR), Celle, Alemania. *Reproduction in Domestic Animals* (2007) 42:138.

1% DMSO (BHT-DMSO), frozen in 0.25-ml pellets or straws and evaluated for post-thawing sperm quality traits. In the second experiment, 50 ejaculates were collected from five bucks, split, diluted in the above mentioned extender supplemented with or without BHT-DMSO, frozen in the form of pellets and used for a single cervical insemination of goat does (n = 145, 0.5 ml containing 150×10^6 motile sperm/doe) after 12 h of their detection in natural standing estrus. The results showed that BHT-DMSO improved ($p < 0.01$) SPM, sperm penetrability in estrus cervical mucus, acrosomal integrity, sperm response to hypo-osmotic swelling test and intracellular superoxide dismutase activity. Sperm head morphometry and nuclear chromatin stability were not significantly influenced by extender supplements. BHT-DMSO treated semen obtained a higher ($p < 0.01$) 60-day pregnancy rate (62.5%) than that (38.6%) of untreated semen. In conclusion, addition of BHT and DMSO to the egg-yolk deficient extenders can improve preservability of goat sperm.

Abstract P70

Testicular Growth and Testosterone Secretion in Alpine Bucks Stimulated by Artificial Long Days Followed by Melatonin or Constant Light

LI Vélez[1], E Carrillo[2], B Malpaux[3] and JA Delgadillo[1]

[1]*Cent Invest Reprod Capr, Univ A Narro, Torreón, Coahuila;* [2]*Inst Tecnol, Torreón;* [3]*Physiol Reprod Comport, Nouzilly, France*

The aim of this study was to determine if testicular growth and testosterone secretion of Alpine bucks can be stimulated during the non-breeding season by long days followed by melatonin or constant light. The control group (n = 4) was under natural photoperiod variations. Two treated groups (n = 4 each) were subjected to long days (16 h of light/day) from December 1 until February 15. One group received thereafter 2 s.c. melatonin implants; the other perceived constant light until June 30. Testicular weight was determined every 2 weeks; testosterone concentrations were measured once a week. A treatment x time interaction ($p < 0.001$) was detected for testicular weight and testosterone secretion. Testicular weight and plasma testosterone levels varied in a similar way between the two treated groups, but differently from the control group ($p < 0.001$). In the control group, the highest testicular weight occurred in June, whereas treated groups reached maximum testicular weight in May. In control bucks, plasma testosterone levels remained low throughout the study, while in the treated groups, it was elevated in April and May. We conclude that testicular growth and testosterone secretion in Alpine bucks can be stimulated by artificial long days followed by melatonin or constant light. LI Vélez was supported by a CONACyT scholarship during his doctoral formation.

Abstract P71

Effect of Exogenous Melatonin Associated with Artificial Long Days on Reproductive Parameters in Mediterranean Goat Males

MC Gatica[1], JL Guzmán[1], A Martino[2] and LA Zarazaga[1]

[1]*Universidad de Huelva, Huelva;* [2]*Ceva Salud Animal,Barcelona Spain*

One experiment was conducted to determine whether the succession of artificial long days and exogenous melatonin is effective to enhance reproductive activity in bucks during seasonal anoestrous. Two groups of balanced bucks were used. One group was subjected to artificial long days-melatonin treatment (LD-M, n = 6) and the control group was maintained under natural photoperiod (C, n = 5). The artificial long days (16L:8O) started the 14th November 2005 and finished the 20th February 2006 when they received 3 s.c. implants of melatonin. From November to June, body (BW) and testicular weight (TW) was measured weekly. TW was determined by comparative palpation with an orchidometer. The first 8 days of each month was divided into 3-day periods of daily sperm collection separated by 2 days of rest and volume of ejaculate and sperm concentration were assessed in all males. The effect of treatment and month was studied on each variable. A clear effect of treatment was observed on ejaculation volume (1.11 ± 0.05 vs 0.96 ± 0.05 ml, for LD-M and C, respectively, $p < 0.05$) and on sperm concentration ($6.04 \times 10^9 \pm 1.8 \times 10^8$ vs $5.54 \times 10^9 \pm 2.3 \times 10^8$ sperm/ml, for LD-M and C, respectively, $p < 0.05$). A clear effect of month was observed on BW, TW and sperm concentration (at least, $p < 0.01$). An interaction time-treatment was observed on sperm concentration. Results demonstrate that LD-M treatment could enhance some reproductive parameters in Mediterranean bucks.

Abstract P72

Sperm Production Characteristics of Tropically Adapted Ogaden Bucks in Ethiopia

Y Mekasha[1,2], A Tegegne[3] , S Melaku[2] and H Rodriguez-Martinez[1]

[1]*Div of Reproduction, SLU, Uppsala, Sweden;* [2]*Dep of Animal Sciences, Haramaya University, Addis Ababa, Ethiopia;* [3]*ILRI, Addis Ababa, Ethiopia*

Differences in climate and breed are among the major cues that influence sperm production capacity of bucks. However, information is scarce for tropical goats and almost non-existent for Ogaden buck breed; thus making global breeds documentation effort handicap. This study was, therefore, aimed to explore sperm production attributes of tropically adapted Ogaden bucks managed at Haramaya University research centre in Ethiopia. Twenty-three Ogaden bucks aged between 14–30 months. were involved in this study. The animals were managed indoor in individual pen, fed a basal diet of maize stover and supplemented with agro-industrial by-products and leaves of multi-purpose trees. Semen was collected with an aid of artificial vagina (AV) following standard procedures. Data was analysed with the Univariate procedure in SAS. The mean (±SD) body weight was 24.2 ± 3.98 kg (range 18.5–36.75 kg). Ejaculate volume was 0.68 ± 0.19 ml and ranged from 0.50 to 1.00 ml. The mean sperm progressive motility (%) and sperm mass activity (scored as 1–5) were 71.9 ± 19.9 and 3.86 ± 1.09, respectively; and ranged from 20–95% for the former and 2.0–5.0 for the latter, respectively. While the mean sperm pH was 7.52 ± 0.35, sperm osmolarity was 274.8 ± 34.8mOsm. The mean sperm concentration for Ogaden bucks was 3.68 ± 1.61 ($\times 10^9$) per mL and mean sperm number per ejaculate was 2.58 ± 1.13 ($\times 10^9$). In conclusion, sperm production attributes of indigenous Ogaden buck breeds was comparable to other tropical bucks (*Funded by Sida-SAREC, Stockholm*).

© 2007 The Authors. Journal compilation © 2007 Blackwell Verlag

Effect of exogenous melatonin associated with artificial long days on reproductive parameters in Mediterranean goat males

Gatica, M.C., Guzmán, J.L., Martino, A.*, Zarazaga L.A.

Universidad de Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819, Huelva, Spain

**Ceva Salud Animal. C/ Carabela La niña, 12, 5º Planta, 08017 Barcelona Spain*

INTRODUCTION

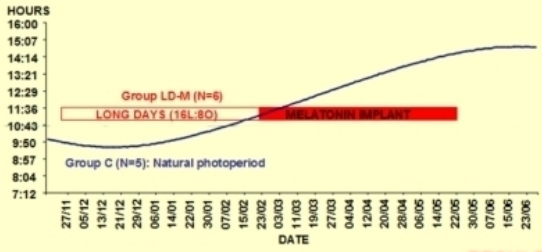
- Mediterranean goats males shows a clear seasonality of reproductive activity.
- Exogenous melatonin and photoperiodic treatments has been used during seasonal anoestrous to enhance reproductive activity in different breeds of goat but the date are scarce in Mediterranean goat males.

AIMS

- Determine whether the succession of artificial long days and exogenous melatonin is effective to enhance reproductive activity during seasonal anoestrous in Mediterranean goat males.

MATERIAL AND METHODS

The 14th November animals were divided into two groups (Long days-melatonin treated group: LD-M and Control group: C) balanced according to Live weight (LW) and Testicular weight (TW).



Testicular weight (TW) comparative palpation with an orchidometer. — **Live weight (LW)**

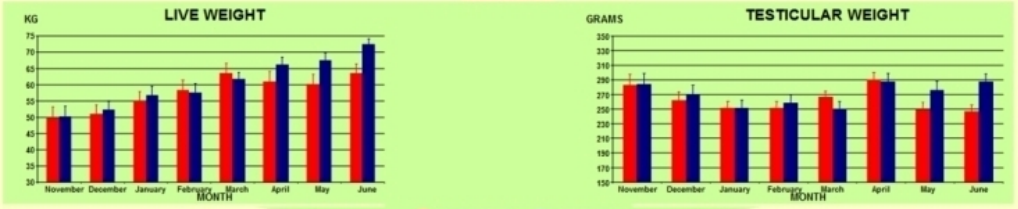
↓ **Weekly**

Sperm concentration — **Volume ejaculate**

↓ **First 8 days of each month**

3-d periods of daily sperm collection separated by 2 d of rest. Using artificial vagina. Bucks had 5 minutes to ejaculate following exposure to estrogenized female.

RESULTS



No effect of treatment was detected, however a clear time effect was observed on LW and TW.

A clear effect of treatment on ejaculation volume (1.11 ± 0.05 vs 0.96 ± 0.05 ml, for LD-M and C, respectively, $P<0.05$) and on sperm concentration ($6.04 \times 10^9 \pm 1.8 \times 10^8$ vs $5.54 \times 10^9 \pm 2.3 \times 10^8$ sperm/ml, for LD-M and C, respectively, $P<0.05$) was observed.

An interaction time-treatment in sperm concentration was detected: *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

CONCLUSIONS

Results demonstrate that LD-M treatment could enhance the sperm production in a 21% on Mediterranean bucks.

This treatment could be useful to enhance sperm production during seasonal anoestrous, when males are used to induce an male effect and to obtain better results at mating.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Grant PETRI 95-0964.OP from C.I.C.Y.T. and RZ2004-00006-C02-01 from C.I.C.Y.T.-INIA (Spain).

Comunicación 5: Se corresponde con el objetivo 2:

Tipo: Póster (P226)

Efecto de melatonina exógena asociada con fotoperiodo artificial de días largos sobre la actividad sexual en hembras caprinas Mediterráneas en ausencia de macho.

Effect of exogenous melatonin associated with artificial long days on sexual activity in Mediterranean goat does in absence of the male.

María Carolina Gatica, José Luis Guzmán, Sebastián Matin, Luis Ángel Zarazaga.

En la XI Conferencia Anual de la Sociedad Europea de Reproducción de Animales Domésticos (ESDAR), Celle, Alemania. *Reproduction in Domestic Animals* (2007) 42:138

Abstract P224

Nutritional Supplementation Improves Embryo Survival in Goats Submitted to the Male Effect Under Foraging Conditions

G Fitz-Rodríguez, JD Hernández-Bustamante and JA Delgadillo

Centro de Investigación en Reproducción Caprina, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila, México

We investigated if a nutritional supplementation could improve embryo survival in goats exposed to the male effect under foraging conditions. Four groups (n = 23 each) of female goats were exposed for 14 days to eight bucks (2 by group) rendered sexually active by exposure to 2.5 months of long days (16 h of light/day) from November 1. Control group did not receive any feed supplementation. The other 3 groups were supplemented 7 (G7), 14 (G14) and 28 (G28) days with 150 g of rolled corn, 100 g of soya and 1100 g of alfalfa hay per animal, starting just after the second detected oestrus (around 9 days of male exposure). Oestrus was recorded twice daily during the study. Pregnancy was determined by transrectal ultrasound 45 days after introduction of the males. The proportion of pregnant does in the G28 group (82.6%) was greater ($p < 0.05$) than in the control group (52.1%), but did not differ from those of the G14 (86.9%) or G7 (65.2%) groups. This proportion was also greater ($p < 0.05$) in the G14 group than in the G7 or control groups, while these two latter groups did not differ from each other ($p > 0.05$). These results indicate that a nutritional supplementation during 14 or 28 days after the second detected oestrus improves embryo survival in goats exposed to the male effect under extensive conditions. G. Fitz-Rodríguez was supported by a CONACyT scholarship during his doctoral formation.

Abstract P225

Efficacy of CIDR, Fluogestone Acetate Sponges and Cloprostenol for Oestrous Synchronization of Nadooshani Goats During the Breeding Season

MJ Zamiri[1], A Bitaraf[2] and M Kafi[1]

[1]*Dept. of Animal Science, College of Agriculture;* [2]*Dept. of Clinical Studies, Veterinary School, Shiraz University, Shiraz, Iran*

This study evaluated three methods of oestrous synchronization, viz., controlled internal drug releasing device (CIDR), intravaginal sponges impregnated with fluogestone acetate (FGA), and cloprostenol (Estrumate; an analogue of prostaglandin $F_2\alpha$)?in Nadooshani goats in the Yazd province, Iran. Oestrous synchronized does (n = 30 to 33 per treatment), after heat detection, were artificially inseminated (AI; once) with diluted semen of fertile bucks. Pregnancy was diagnosed by measuring serum progesterone on day 21 after AI, followed by ultrasonography at mid-gestation. The proportion of goats showing estrus and becoming pregnant were compared by the χ^2-squared test, and parametric data were analyzed by ANOVA. No significant difference was observed for the interval between the end of synchronization protocol and standing heat amongst treatments (range: 23 to 35 h). There was no significant difference in the interval between the time of standing heat and AI (range: 15–27 h). Serum progesterone level (overall mean: 4.80 ± 0.41 ng/ml; SEM), litter size (overall mean: 1.32 ± 0.05; SEM), non-return rate to oestrus and the kidding rate were not affected by the treatments. Serum progesterone levels were lower ($p < 0.01$) in does that returned to estrus after artificial insemination (AI). Prolificacy and fecundity were not affected by the synchronization methods. Cloprostenol method was found to be more convenient and economical under the conditions of this experiment.

Abstract P226

Effect of Exogenous Melatonin Associated with Artificial Long Days on Sexual Activity in Mediterranean Goat does in the Absence of the Male Effect

MC Gatica[1], JL Guzmán[1], S Martín[2] and LA Zarazaga[1]

[1]*Univ de Huelva, Huelva;* [2]*Ceva Salud Animal. Barcelona Spain*

An experiment was designed to determine whether the succession of artificial long days and exogenous melatonin could be effective to induce reproductive activity during seasonal anoestrus without the use of the male effect in goats. Two groups of does balanced according to their body weight (BW) and body condition score (BCS) were used. One group was subjected to artificial long days-melatonin treatment (LD-M, n = 17) and the control group was maintained under natural photoperiod (C, n = 17). The artificial long days (16L : 8D) started the 14th November 2005 and finished the 20th February 2006 when they received 1 s.c. implant of melatonin. From November to June BW and BCS were measured weekly. Oestrous activity was tested daily using entire aproned males. Ovulation rate was evaluated by laparoscopy 7 days after positive identification of oestrus. Effect of treatment on different variables was tested. No effect of treatment on BW or BCS was observed. Date of the first detected oestrus was highly variable between groups (28th March vs 3th May, for LD-M and C group, respectively, $p < 0.001$). Moreover, a higher percentage of does showed oestrus on LD-M group (94%) vs 11.7% on C group ($p < 0.001$). No effect of treatment on ovulation rate was observed. We conclude that LD-M treatment can induce reproductive activity in a high percentage of treated does and that the male effect is not essential in Mediterranean goats.

Abstract P227

Low Body Condition is Associated with a Shorter Breeding Season and Reduced Ovulation Rate in Subtropical Mexican Goats

MA De Santiago-Miramontes[1], B Malpaux[2] and JA Delgadillo[1]

[1]*CentroInv Reprod Caprina, Univ Aut Agr A Narro, Torreón, Coahuila, Mexico;* [2]*Physiol Reprod Comps, INRA-CNRS-Univ de Tours-Haras Nationaux, Nouzilly, France*

This experiment was performed to determine if the length of ovulatory activity and ovulation rate were related to body condition in local goats from subtropical Mexico. Two groups (n = 20 each) with either a high (2.6 ± 0.1) or low (1.6 ± 0.1) body condition score were selected. Oestrous behaviour was recorded twice a day from July to April. Ovulation occurrence and rate were recorded by ultrasonography 10 ± 2 days after detection of oestrus. The beginning of oestrus and ovulatory activity in the high body condition group occurred earlier (oestrus: August 5 ± 5 days; ovulation: August 7 ± 9 days) than in the low body condition group (oestrus: August 30 ± 6 days; ovulation: September 11 ± 5; $p < 0.05$). The end of oestrus and ovulatory activity occurred later ($p < 0.05$)

© 2007 The Authors. Journal compilation © 2007 Blackwell Verlag

Effect of exogenous melatonin associated with artificial long days on sexual activity in Mediterranean goat does without male effect.

Gatica, M.C., Guzmán, J.L., Martín, S., Zarazaga L.A.*
Universidad de Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819, Huelva, Spain
**Ceva Salud Animal. C/ Carabela La niña, 12, 5ª Planta, 08017 Barcelona Spain*

INTRODUCTION

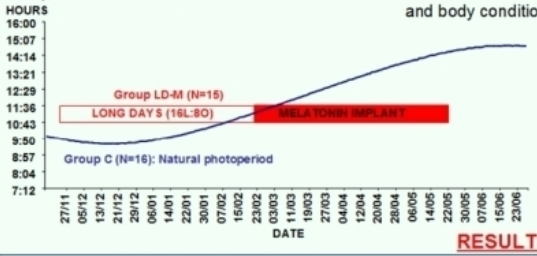
- In some intensive goat livestock production system it turns out very difficult to perform the male effect because no effective isolation of males and females can be carried out.
- The use of melatonin implants seems to require isolation of males and females and in these conditions, the use of melatonin implants it is make difficult.
- Recently, it has been demonstrated that to obtain an effective male effect it is not necessary the isolation of males and females.

AIMS

- The aim of this study was to determine if the succession of artificial long days and exogenous melatonin could be effective to induce reproductive activity during seasonal anoestrous without the use of male effect in Mediterranean goats.

MATERIAL AND METHODS

Experiment started the 14th November 2005 when animals were divided into two groups balanced according to their live weight and body condition score.



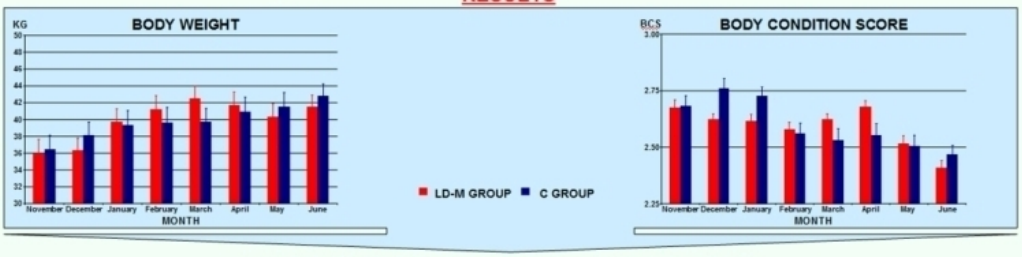
Body condition score (BCS) — Body Weight (BW)

Weekly

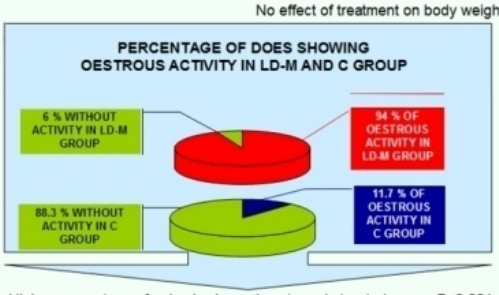
Oestrous activity was tested daily using entire aproned males.

Ovulation rate was evaluated by laparoscopy 7 days after identification of oestrous.

RESULTS



No effect of treatment on body weight or body condition score was observed.



Higher percentage of animals showed oestrous in treated group, P<0.001.

Highly variable between groups, P<0.001.

No effect of treatment on ovulation rate of the first detected oestrous was observed.

CONCLUSIONS

The association artificial long days and melatonin implants can induce reproductive activity during seasonal anoestrous.

The association of melatonin implants and male effect could be not essential in Mediterranean goats to induce reproductive activity during seasonal anoestrous.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Grant PETRI 95-0964.OP from C.I.C.Y.T. (Spain).

Comunicación 6: Se corresponde con el objetivo 3:

Tipo: Póster (P184)

El uso de fotoperiodo artificial de días largos sin separación de machos no es efectivo para inducir actividad reproductiva en hembras caprinas Mediterráneas.

The use of artificial long days is not effective to induce reproduction activity in Mediterranean goat does without isolation from males.

Luis Ángel Zarazaga, María Carolina Gatica, José Luis Guzmán, Irma Celi.

En el XVI Congreso Internacional de Reproducción Animal, Budapest, Hungría. *Reproduction in Domestic Animals* (2008) 43:89.

LP ewes (1.2 ± 0.3; P < 0.05), but this was not associated with differences in numbers of atretic or healthy follicles, follicular dynamics or metabolic hormone concentrations. Supplemented ewes had 2.3 ± 0.6 and 2.2 ± 0.6 healthy follicles on Days 3 and 7, less than control ewes on Day 3 (4.6 ± 0.6; P < 0.01) but the same as controls on Day 7 (2.0 ± 0.6). The largest healthy follicle from supplemented ewes was larger (6.1 ± 0.2 mm) with more granulosa cells (3.7 ± 0.2 million) than in non-supplemented ewes (5.4 ± 0.2 mm and 3.0 ± 0.2 million; P < 0.05). Insulin, leptin and IGF-I concentrations were higher in supplemented than in control ewes (P < 0.01). These results suggest that, while metabolic hormones explain the positive effect of short-term supplementation on follicular growth, they are not involved in the increase in ovulation rate promoted by nutrition during pregnancy. Meat & Livestock Australia and the University of Western Australia supported this work.

P184

The use of artificial long days is not effective to induce reproductive activity in Mediterranean goat does without isolation from males

Zarazaga, LA[1]*, Gatica, MC[2], Guzmán, JL[1], Celi, I[1]
[1]Universidad de Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819, Huelva, Spain; [2]Universidad Arturo Prat, Avda. Arturo Prat, 2120, Iquique, Chile

One experiment was designed to investigate whether the treatment with artificial long days is effective to induce and synchronize reproductive activity during the normal seasonal anoestrous in Mediterranean goat does that were not isolated from males. Two balanced groups of does according to their body weight (BW) and body condition score (BCS) were used. One group was subjected to artificial long days treatment (16L:8O) (LD, N=24) from 17th November to 5th February, and the control group was maintained under natural photoperiod (C, N=23). From November to May BW and BCS were measured weekly. Oestrous activity was tested daily using entire aproned males from the end of the photoperiodic treatment to the end of the experimental period. Ovulation rate was evaluated by laparoscopy 7 days after positive identification of oestrous. Effect of LD treatment and month on BW, BCS, was tested. The effect of treatment was studied on the date of the first detected oestrous after the end of LD treatment during the normal seasonal anoestrous, on the ovulation rate of the first detected oestrous and on the percentage of females that showed oestrous. No effect of LD treatment, month or interaction between both variables on BW was observed. However, BCS was influenced by all analyzed factors (at least P<0.05). The mean BCS was 2.46 ± 0.01 vs 2.44 ± 0.01 for LD and C group, respectively and it was higher during March, April and May for the LD group than the C group (P<0.01). The date of the first detected oestrous for the LD group was the 6th April and not reproductive activity was detected on C group. Only the 16.6% of the LD group showed oestrus after the photoperiodic treatment. The mean ovulation rate of the first detected oestrous for the LD group was 1.5 ± 0.29. Due to the reduce percentage of animals that showed reproductive activity during the normal seasonal anoestrous, we can conclude that LD treatment is not effective to induce and synchronize reproductive activity in Mediterranean goat does without previous isolation from males. Most research is necessary to determine if the photoperiodic treatment in females requires isolation from males to induce reproductive activity during seasonal anoestrous.

P185

Seasonal effects of intracerebroventricular leptin on prolactin and growth hormone secretions in non-lactating ewes

Zięba, DA[1]*, Szczęsna, M[1], Klocek-Górka, B[1], Molik, E[1], Misztal, T[2], Romanowicz, K[2], Keisler, D[3], Murawski, M[1]
[1]Agricultural University, Krakow, Poland; [2]Polish Academy of Science in Jablonna, Poland, [3]University of Missouri, USA

In temperate latitudes, sheep are seasonal breeders with its reproductive activity controlled mainly by photoperiod through pineal hormone – melatonin. Recent experiments showed photoperiodic changes in leptin sensitivity in seasonal mammals. Leptin, a hormone produced primarily by adipocytes, regulates energy expenditure and food intake. However, contradictory results have been obtained regarding the secretion of growth hormone (GH) and prolactin (PRL) in sheep under non-lactating conditions, in response to leptin. Prolactin, an essential hormone for mammary gland development and milk production, modulates adipose tissue lipid metabolism. Growth hormone, a metabolic regulator, exhibits many effects on growth and development. Herein we examined how interactions of long-(LD) and short-day (SD) seasons and different doses of recombinant ovine leptin (roleptin) affected PRL and GH concentrations in mature ewes. Twenty four Polish longwool sheep, a breed that exhibits strong seasonal reproduction, were housed in natural photoperiod (longitude: 19°57' E, latitude: 50° 04' N). Ewes were surgically fitted with third ventricle cannulas. All experiments started at the sunset on 12 ewes selected randomly during LD and on additional 12 ewes during SD. Ewes were infused centrally three times at 0, 1 and 2 h with the first sample collected immediately before the first infusion at time 0 with: Ringer-Locke buffer (Control), or 2) roleptin (0.5 µg/kg BW; L1 trt) and 3) roleptin (1.0 µg/kg BW; L2 trt). Leptin caused an increase ($P < 0.001$) in circulating leptin concentrations compared to controls during both seasons in a dose-dependent manner. PRL concentrations during LD was much higher ($P < 0.001$) compared to value in SD. Leptin in both doses decreased concentration of PRL during SD ($P < 0.001$) and increased during the LD. Central leptin infusions in both doses increased ($P < 0.001$) GH concentrations compared to control group during SD. Leptin decreased ($P < 0.001$) GH concentrations depending on dose during LD. Data provide evidence that secretions of pituitary hormones such as PRL and GH are effectively and directly regulated by leptin and are depended on photoperiodic conditions.
This work was supported by a grant from the Polish National Research Council (KBN 2PO6D 003 29).

Poster 03 - Reproduction of Buffalo and Exotic Bovidae

P-186

Effect of the polymorphism of MT1 melatonin gene receptor on reproductive activity of Mediterranean Italian buffalo (Bubalus bubalis)

Carcangiu, V*; Pazzola, M; Marchi, B; Vacca, GM; Dettori, ML; Mura, MC; Bini, PP
Department of Animal Biology, University of Sassari, Italy

The Mediterranean Italian buffalo (Bubalus bubalis) has a seasonal reproductive activity, which obviously influences productions. Photoperiod, through the melatonin secretion, is the main environmental factor affecting the regulation of sexual activity. Melatonin exerts its action through binding to receptors located in the hypothalamus, MT1 is the receptor implicated in the control of the reproductive seasonality and its polymorphism affects the sensibility to photoperiod in sheep and goats. The aim of this research was to study the polymorphism in MT1 gene and its effect on reproduction in Mediterranean Italian buffaloes reared in Sardinia. The study was carried out in a herd made up of about 300 buffaloes, located in the South of Sardinia (39° N). 55 pluriparous female, 5.8 ± 4.5 year-old, were selected and their reproductive activity monitored by transrectal ultrasonography and calving date, in the previous years, was achieved from the farm software. A blood sample was collected from each animal. 100-150 µl of the extracted DNA was utilized for the amplification of exon II of MT1 gene, by means of the primers corresponding to position 285-304 (sense primer) and 1108-1089 (antisense primer). PCR product obtained by 20 samples was sequenced. Alignment of the sequences led to the identification of a mutation in position 82 of MT1 gene (a substitution cytosine-thymine, C→T) using the endonuclease HpaI. Later, all the samples were amplified and digested with endonuclease HpaI with the aim to identify the polymorphism. Data was analysed using χ^2-test to assess the effect of MT1 genotype on the reproductive activity. Furthermore,

The use of artificial long days is not effective to induce reproductive activity in Mediterranean goat does without isolation from males.

Zarazaga LA1, Gatica, MC2, Guzmán, JL1, Celi, I1,
1Universidad de Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819, Huelva, Spain
2Universidad Arturo Prat, Avda. Arturo Prat, 2120, Iquique, Chile

INTRODUCTION

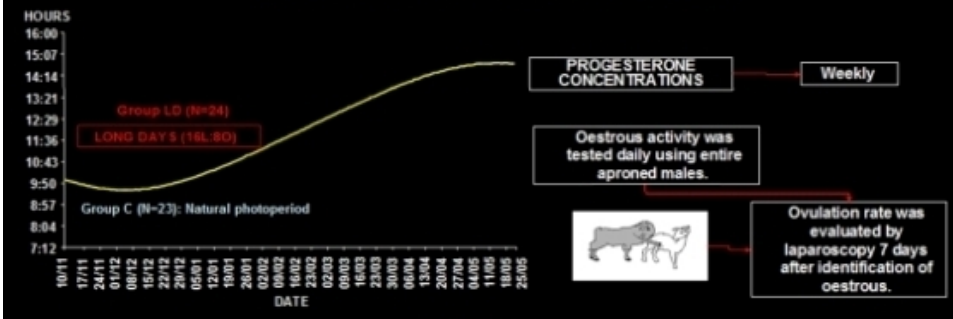
- The tendency at livestock systems is to supress the use of the hormonal treatments to control the reproductive activity.
- The reproductive seasonality in small ruminants is controlled by photoperiod.
- In some intensive goat livestock production system it turns out very difficult to perform the male effect.
- Recently, in subtropical conditions it has been demonstrated that to obtain an effective male effect it is not necessary the isolation of males and females.

AIMS

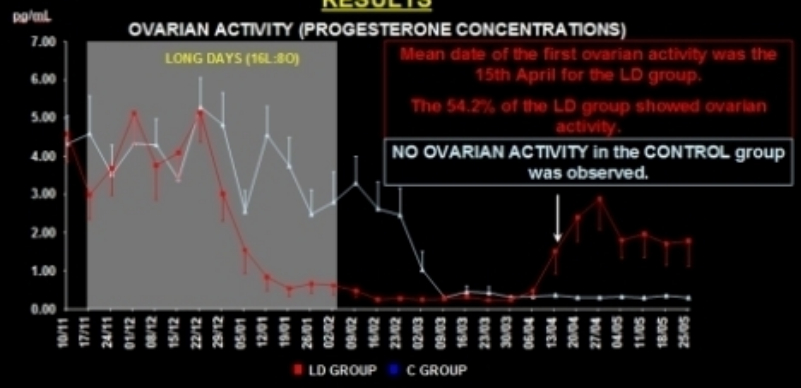
- The aim of this study was to determine if treatment with artificial long days is effective to induce and synchronize reproductive activity during the normal seasonal anoestrous in Mediterranean goat does that were not isolated from males.

MATERIAL AND METHODS

Experiment started the 17th November 2006 when animals were divided into two groups balanced according to their live weight and body condition score.



RESULTS



CONCLUSIONS

LD treatment was effective to induce a moderate ovarian activity but was not efficient to induce an oestrous activity in Mediterranean goats.

The contact after the photoperiodic treatment between treated and the control groups was not effective to induce reproductive activity in the control group.

PERSPECTIVES

Research are necessary to determine if the photoperiodic treatment in females requires isolation from males to induce reproductive activity during seasonal anoestrous.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Grant PETRI 95-0964.OP from C.I.C.Y.T. (Spain).

Comunicación 7: Se corresponde con el objetivo 1:

Tipo: Póster (339)

El inicio de la actividad reproductiva en época normal no es modificado por el tratamiento previo con melatonina exógena en hembras caprinas Mediterráneas.

The onset of the reproductive activity at the normal breeding season is not modified by a previous treatment with exogenous melatonin in Mediterranean goat females.

Luis Ángel Zarazaga, María Carolina Gatica, José Luis Guzmán, Alex Martino.

En Actas de la IX conferencia Internacional sobre Caprinos de la International Goat Association. 2008, Querétaro, México, 425.

9th International Conference on Goats
Sustainable Goat Production: Challenges and Opportunities of Small and Large Enterprises

339. The onset of the reproductive activity at the normal breeding season is not modified by a previous treatment with exogenous melatonin in Mediterranean goat females.

Luis A. Zarazaga, María Carolina Gatica[1], José Luis Guzmán, Alex Martino[2]

Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819 Palos de la Frontera, Huelva, Spain. zarazaga@uhu.es, [1]Departamento de Agricultura del Desierto, Universidad Arturo Prat, Av. Arturo Prat 2120, Iquique, Chile, [2]Ceva Salud Animal. C/ Carabela La niña, 12, 5ª Planta, 08017 Barcelona Spain

The objective of this work was to determine if the treatment with exogenous melatonin used at the spring equinox to induce reproductive activity during the seasonal anoestrous, have an effect on the onset of the reactivation of the reproductive activity at the normal breeding season in Mediterranean goat females. Twenty-nine adult and empty does were used and distributed into two groups (Group M: N=14 treated with melatonin, and Group C: N=15, control group). These groups were balanced according to their live weight (LW) and body condition score (BCS) at the onset of the experiment. The 18th March, group M received 1 s.c. implant of melatonin that induced a period of reproductive activity during the seasonal anoestrous (Gatica et al., 2006, Rep. Dom. Anim. 41:103-125). From June to September LW and BCS were measured weekly. Oestrous activity was tested daily using entire aproned males. Ovulation rate was evaluated by laparoscopy 7 days after positive identification of oestrous. Plasma samples were obtained weekly for progesterone assay. No differences between groups in the onset of the normal breeding season according to the reactivation of the ovulatory activity (5 September ± 4.81 days vs 22 August ± 5.62 days for M and C group respectively) or on the onset of the oestrous activity (28 August ± 5.76 days vs 25 August ± 5.96 days for M and C group respectively) were observed. Similarly, treatment with exogenous melatonin during the seasonal anoestrous did not influence the ovulation rate at the onset of the normal breeding season (1.56 ± 0.176 and 1.55 ± 0.20 corpora lutea for M and C group, respectively). We can conclude that treatment with exogenous melatonin, that was effective to induce an intensive reproductive activity during the seasonal anoestrous, does not influence the date of normal reactivation of the reproductive activity in Mediterranean goat females.

THE ONSET OF THE REPRODUCTIVE ACTIVITY AT THE NORMAL BREEDING SEASON IS NOT MODIFIED BY A PREVIOUS TREATMENT WITH EXOGENOUS MELATONIN IN MEDITERRANEAN GOAT FEMALES

Luis A. Zarazaga, María Carolina Gatica[1], José Luis Guzmán, Alex Martino[2]
Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819 Palos de la Frontera, Huelva, Spain. zarazaga@uhu.es
[1]Departamento de Agricultura del Desierto, Universidad Arturo Prat, Av. Arturo Prat 2120, Iquique, Chile
[2]Ceva Salud Animal. C/ Carabela La niña, 12, 5ª Planta, 08017 Barcelona Spain

INTRODUCTION

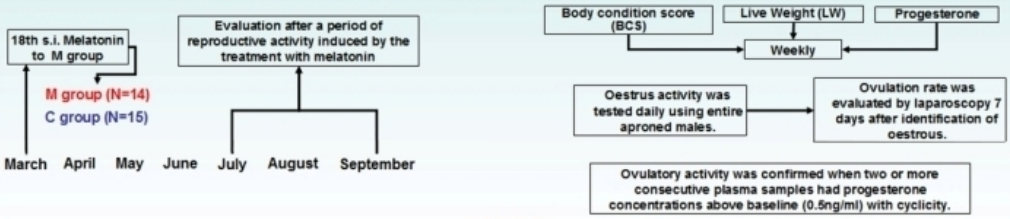
- In many seasonally breeding animals reproductive cycles are controlled by photoperiodic changes.
- Exogenously administered melatonin from continuous slow-release implants has been shown to advance the onset of the breeding season in sheep and goats by mimicking the stimulatory effect of short days
- The constant exhibition to short photoperiod generates photorefractoriness.

AIMS

- The aim of this study was to determine if the treatment with exogenous melatonin used during the seasonal anoestrous and that was effective to induce reproductive activity during this period, modifies the date of the reactivation of the reproductive activity at the normal breeding season.

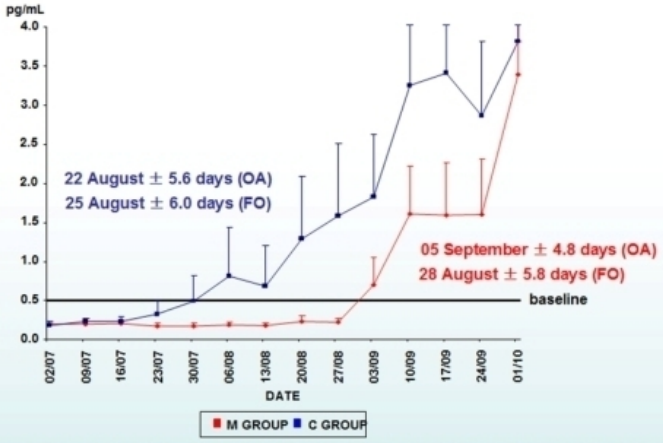
MATERIAL AND METHODS

Two balanced groups according to their live weight (LW) and body condition score (BCS) of goats were used. The effect of treatment and time was studied on each studied variable.



RESULTS

Evolution of the progesterone concentration to determine the onset of the Ovarian Activity (OA) and date of the First detected Oestrous (FO)



Range of variation of the onset of the ovarian activity from 8 August to 27 September

Range of variation of the first detected oestrous from 11 July to 15 September

- The LW and BCS was variable along the experiment ($P<0.01$) but it was not modified by the treatment.

- No differences between groups were observed on ovulation rate at the first detected oestrous (1.56 ± 0.18 and 1.55 ± 0.20 corpora lutea for M and C group, respectively).

CONCLUSIONS

We can conclude that melatonin treatment during the seasonal anoestrous does not influence the onset of the normal breeding activity in Mediterranean goat females.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Grant PETRI 95-0964.OP from C.I.C.Y.T. (Spain).

Comunicación 8: Se corresponde con el objetivo 5:

Tipo: Comunicación oral (327)

Efecto de la melatonina durante el anestro estacionario sobre la reactivación sexual y parámetros espermáticos durante la época normal de actividad reproductiva en machos caprinos Mediterráneos.

Effect of melatonin during the seasonal anoestrous on the reactivation of the sexual activity and semen production at the normal season on Mediterranean bucks.

Luis Ángel Zarazaga, María Carolina Gatica, José Luis Guzmán, Juan Pedro Casas.

En Actas de la IX conferencia Internacional sobre Caprinos dela International Goat Association. 2008, Querétaro, México, 413.

En *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 11(2009) 131:134.

9th International Conference on Goats
Sustainable Goat Production: Challenges and Opportunities of Small and Large Enterprises

327. Effect of melatonin during the seasonal anoestrous on the reactivation of the sexual activity and semen production at the normal breeding season on Mediterranean bucks

Luis A. Zarazaga, María Carolina Gatica[1], José Luis Guzmán, Juan Pedro Casas[2]

Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819 Palos de la Frontera, Huelva, Spain. zarazaga@uhu.es. [1]Departamento de Agricultura del Desierto, Universidad Arturo Prat, Av. Arturo Prat 2120, Iquique, Chile. [2]Ceva Salud Animal. C/ Carabela La niña, 12, 5ª Planta, 08017 Barcelona Spain.

One experiment was conducted to determine if the onset of the reproductive activity and semen production could be modified by a previous treatment with exogenous melatonin, used to enhance reproductive activity during the seasonal anoestrous in Mediterranean bucks. Two balanced groups of bucks were used. The 18th march 2005, one group (M) received 3 s.c. implants of melatonin (N=7) and other group (N=4) was used like control (C). From June to September, body weight and testosterone was measured weekly and testicular weight every 15 days. The reproductive activity of each buck was assessed using characteristics of the testosterone profile. During the first 8 days of each month, volume of ejaculate and sperm concentration was assessed. Each of these 8-d periods was divided into 3-d periods of daily sperm collection separated by 2 d of rest. The semen was collected using an artificial vagina. The effect of treatment and month was studied on each variable. An interaction, month-treatment was observed on ejaculate volume, July was the month with higher volume (0.62 ± 0.058 ml vs. 1.07 ± 0.15 ml for M and C group respectively, $P<0.05$). Sperm concentration was influenced by treatment ($6.13 \times 10^9 \pm 2.49 \times 10^8$ vs. $4.26 \times 10^9 \pm 3.12 \times 10^8$ sperm/ml, for M and C, respectively, $P<0.05$). The onset of the reproductive activity, after the study of the testosterone concentrations was similar for both groups (31st August ± 7.89 days and 4th September ± 25.66 days for M and C group, respectively). Results demonstrate that melatonin treatment during the seasonal anoestrous does not influence the onset of the normal breeding season or ejaculate volume but it seems that could increases the sperm concentration at the normal breeding season in Mediterranean goat males.

Tropical and Subtropical Agroecosystems, 11 (2009): 131-1 34

Tropical and Subtropical Agroecosystems

NOTA CORTA [SHORT NOTE]

EFFECT OF MELATONIN DURING THE SEASONAL ANOESTROUS ON THE REACTIVATION OF THE SEXUAL ACTIVITY AND SEMEN PRODUCTION AT THE NORMAL BREEDING SEASON ON MEDITERRANEAN BUCKS

[EFECTO DE LA MELATONINA DURANTE EL ANESTRO ESTACIONAL EN LA REACTIVACIÓN DE LA ACTIVIDAD SEXUAL Y PRODUCCIÓN SEMINAL DURANTE LA ESTACIÓN REPRODUCTIVA DE MACHOS CABRIOS DEL MEDITERRANEO]

L. A. Zarazaga, M. C. Gatica[1], J. L. Guzmán, J. P. Casas[2]

Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819 Palos de la Frontera, Huelva, Spain. [1]Departamento de Agricultura del Desierto, Universidad Arturo Prat, Av. Arturo Prat 2120, Iquique, Chile [2]Ceva Salud Animal. C/ Carabela La niña, 12, 5ª Planta, 08017 Barcelona Spain. Corresponding author: zarazaga@uhu.es.

SUMMARY

One experiment was conducted to determine if the onset of the reproductive activity and semen production could be modified by a previous treatment with exogenous melatonin, used to enhance reproductive activity during the seasonal anoestrous in Mediterranean bucks. Two balanced groups of bucks were used. The 18th march 2005, one group (M group) received 3 s.c. implants of melatonin (N=7) and other group (N=4) was used like control (C group). From June to September, body weight and testosterone was measured weekly and testicular weight every 15 days. The reproductive activity of each buck was assessed using characteristics of the testosterone profile. During the first 8 days of each month, volume of ejaculate and sperm concentration was assessed. Each of these 8-d periods was divided into 3-d periods of daily sperm collection separated by 2 d of rest. The semen was collected using an artificial vagina. The effect of treatment and month was studied on each variable. An interaction, month-treatment was observed on ejaculate volume, July was the month with higher volume (0.62 ± 0.06 mL vs 1.07 ± 0.15 mL for M and C group respectively, $P < 0.05$). Sperm concentration was influenced by treatment ($6.13 \times 10^9 \pm 2.49 \times 10^8$ vs $4.26 \times 10^9 \pm 3.12 \times 10^8$ sperm/mL, for M and C, respectively, $P < 0.05$). The onset of the reproductive activity, after the study of the testosterone concentrations was similar for both groups (31st August ± 7.89 days and 4th September ± 25.66 days for M and C group, respectively). Results demonstrate that melatonin treatment during the seasonal anoestrous does not influence the onset of the normal breeding season or ejaculate volume but it seems that could increases the sperm concentration at the normal breeding season in Mediterranean goat males.

Keywords: Buck, Melatonin, Seasonality, Semen.

INTRODUCTION

The influence of photoperiod on sexual activity is greatest at high latitudes, decreasing gradually towards the equator (Hafez, 1952; Chemineau et al., 1995). Daylight length influences the secretion of the pineal gland, being responsible for transducing the photoperiodic cue into a hormonal signal (melatonin) (Hansen, 1985). Photoperiod information is conveyed to the neuro-endocrine system by the circadian secretion of melatonin from the pineal gland (Bittman et al., 1983). The profile of melatonin secretion is therefore an endocrine signal that relays photoperiodic information to the reproductive axis. As short days are characterized by a longer duration of melatonin secretion than long days, different attempts have been made to mimic the effect of short days by artificially prolonging the duration of high levels of circulating melatonin. Two mechanisms can be put forward to explain that action of melatonin implants: either they provide a short-day signal (very long duration) or they remove photoperiodic information (which is inhibitory at that time) because of the absence of a detectable rhythm. Short-day treatment can therefore be replaced by melatonin treatments so that the maintenance of constantly high levels of melatonin mimics a short day effect. Studies do not exist about the effect of exogenous melatonin used during the seasonal anoestrous on the onset of the normal breeding season in Mediterranean bucks.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted at the experimental farm of the University of Huelva (latitude 37º 15' N). The males were distributed at random into two groups balanced according to their live weight and testicular

weight. Group treated with exogenous melatonin: M group (n=7, received 3 s. i. the 18th March containing 18 mg of the hormone (Melovine®, CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain) and a control group (C group) without melatonin (n=4). We studied testosterone concentrations (TC) weekly, testicular weight (TW) every 15 days, volume and sperm concentrations monthly from 1st June to 30th September after a period of reproductive activity induced by the previous treatment (Gatica et al., 2006). The reproductive state was assessed using characteristics of the testosterone profile. Firstly, baseline level was defined as the averaged of the at least lowest plasma samples obtained during the experiment normaly sampled during the seasonal anoestrous. I think than the authors must re-write this part because there is no average in lowest sample…. Testicular activity was defined when two or more consecutive plasma samples had testosterone concentrations differing from the highest value obtained from this baseline by more than 3 SD. To study volume and sperm concentration, semen collection was assessed monthly during the first 8 days of each month (2 periods of 3days of daily sperm collection separated by 2 day of rest). The ejaculated semen volume was recorded immediately after collection from a graduated collection vial. Concentration was analyzed using a computer-aided sperm analyzer (Sperm Class Analyzer, Microptic, Barcelona, Spain). The effect of treatment and time was studied on each variable.

RESULTS

No effect of treatment was observed on TS (278.39 ± 8.85 gr and 292.39 ± 12.81 gr for M and C group, respectively). This line is related to TW and I did not find in he materials and method the techniques to evaluate this variable. The onset of the testicular activity, in order to the testosterone concentrations analysis, was not modified by the previous treatment with melatonin (31st August ± 7.89 days and 4th September ± 25.66 days for M and C group, respectively). Figure 1 shows the monthly mean of the ejaculate volume. A significant interaction time-treatment ($P < 0.05$) was observed with higher ejaculate volume for the C group in July ($P < 0.01$) (0.62 ± 0.07 mL vs 0.94 ± 0.05 mL for M and C group), but no effect of treatment was observed (1.05 ± 0.06 mL vs 0.95 ± 0.15 mL for M and C group). Figure 2 shows the monthly sperm concentration; a clear effect of treatment was observed on this parameter ($6.13x10^9$ ± $2.49x10^8$ vs $4.26x10^9$ ± $3.12x10^8$ sperm/mL, for M and C, respectively, $P < 0.05$) and differences between groups were observed in June, July and September, with higher values for the M group (at least $P < 0.05$).

DISCUSSION

There were no difference between groups on the reactivation of the testicular activity.The testosterone concentration response was later for both groups, compared with data described by Delgadillo et al. (2001) in Creole males treated with artificial long days and melatonin in January. In this trial the control group started reproductive activity in july (testoterone concentrations >5 ng/mL) and group treated with artificial long days and melatonin started reproductive activity in june. Similarly, Todini et al. (2007), working with four Mediterranean goat breeds they determined testosterone concentrations throughout 1 year in blood samples collected weekly, maintained without interactions with does. In this experiment the bucks of all the four breeds displayed a clear seasonality of plasma testosterone, with very low levels from January to May and high levels from July to November; hormone levels and pattern of seasonality were affected by breed and not by climate. Moreover, Zarazaga et al. (unpublished data) for the Payoya bucks in natural conditions that described the onset of the reproductive activity on the first fortnight of August. These differences could be originated by the different criteria used to define the onset of the reproductive activity. The results obtained for ejaculate volume, were similar to that obtained by Gatica et al. (2006) in males treated with exogenous melatonin during the anoestrous with the same animals but lower than described by Zarazaga et al. (unpublished data) for the Payoya bucks during autumn season that was 1.44 ± 0.04 mL. In the present experiment, the M group showed a very high sperm concentration, higher than described in bucks treated with melatonin during anoestrous (Gatica et al., 2006), or by Zarazaga et al. (unpublished data) during the breeding season on Payoya bucks using similar methodology and similar computer-aided sperm analyzer. However control group showed similar results than in those experiments, indicating that the origin of these differences could be the very high individual variability observed for this parameter.

CONCLUSION

Results demonstrate that melatonin treatment used during the seasonal anoestrous and that induced a clear reproductive activity during the seasonal anoestrous, does not influence the onset of the normal breeding season or ejaculate volume but it seems that could increases the sperm concentration at the normal breeding season in Mediterranean goat males.

ACKNOWLEDGMENTS

Tropical and Subtropical Agroecosystems, 11 (2009): 131-1 34

This work was supported by Grant PETRI 95-0964.OP and RZ2004-00006-C02-01 from C.I.C.Y.T. (Spain).

REFERENCES

Bittman, E.L., Dempsey, R.J., Karsch, F.J., 1983. Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. Endocrinology. 113, 2276-2283.

Chemineau, P., Malpaux, B., Thièry, J.C., Viguiè, C., Morello, H., Zarazaga, L., Pelletier, J., 1995. The control of seasonality: a challenge to small ruminant breeding. In: Enne, G., Greppi, G.F., Lauria, A. (Eds.), Reproduction and Animal Breeding. Advances and Strategy. Elsevier, Amsterdam. pp. 225–250.

Chemineau, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A., Guèrin, Y., Ravault, J.P., Thimonier, J. and Pelletier, J., 1992. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. Anim. Reprod. Sci. 30, 157-184.

Delgadillo, J.A., 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. J. Anim. Sci. 79, 2245-2252.

Gatica, M.C., Guzman, J.L., Farauste, R., Ijano, L., Martín, S., Martino, A., Zarazaga, L.A., 2006. Short
term effect of melatonin implants on sperm parameters in Mediterranean goat males. Reprod. Domest. Anim. 41, 107.

Hafez, E.S.E., 1952. Studies on the breeding season and reproduction in the ewe. J. Agric. Sci. 42, 189–265.

Hansen, P.J., 1985. Photoperiodic regulation of reproduction in mammals breeding during long days versus mammals breeding during short days. Anim. Reprod. Sci. 9, 301–315.

Todini, L., Malfatti, A., Terzano, G.M., Borghese, A., Pizzillo, M., Debenedetti, A. 2007. Seasonality of plasma testosterone in males of four Mediterranean goat breeds and in three different climatic conditions. Theriogenology. 67, 627-631.

Figure 1: Mean (±S.E.M.) for ejaculate volume (mL) of Mediterranean goat bucks treated with melatonin (M group, ■) or without melatonin treatment (C group, □). (**: $P < 0.01$).

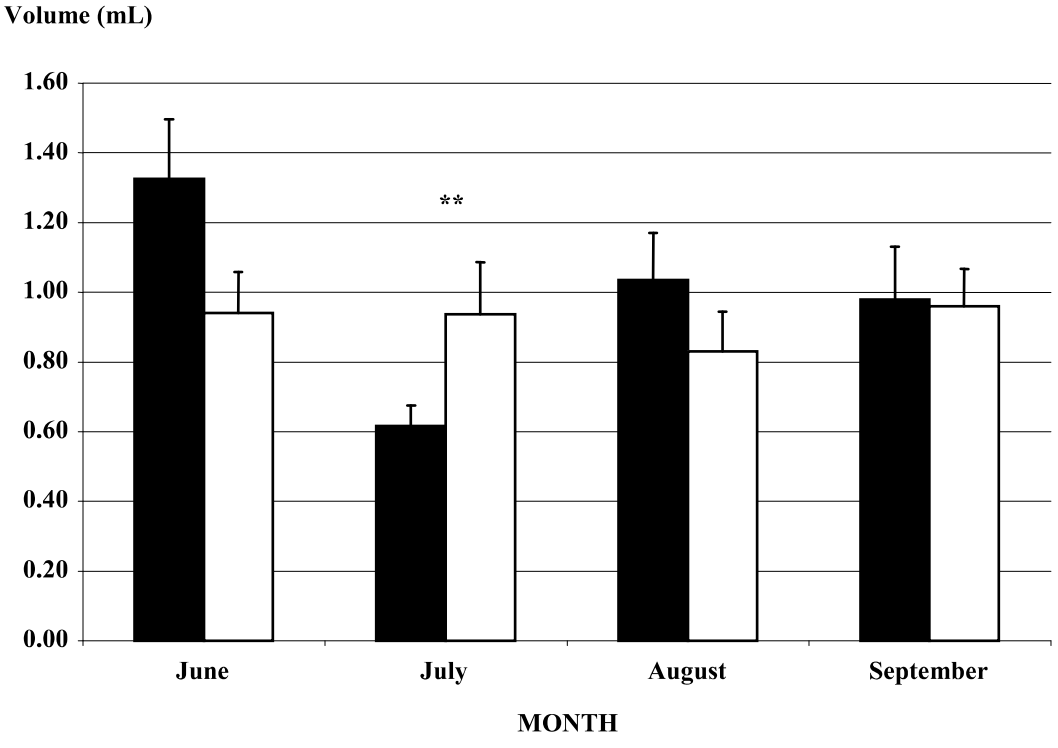
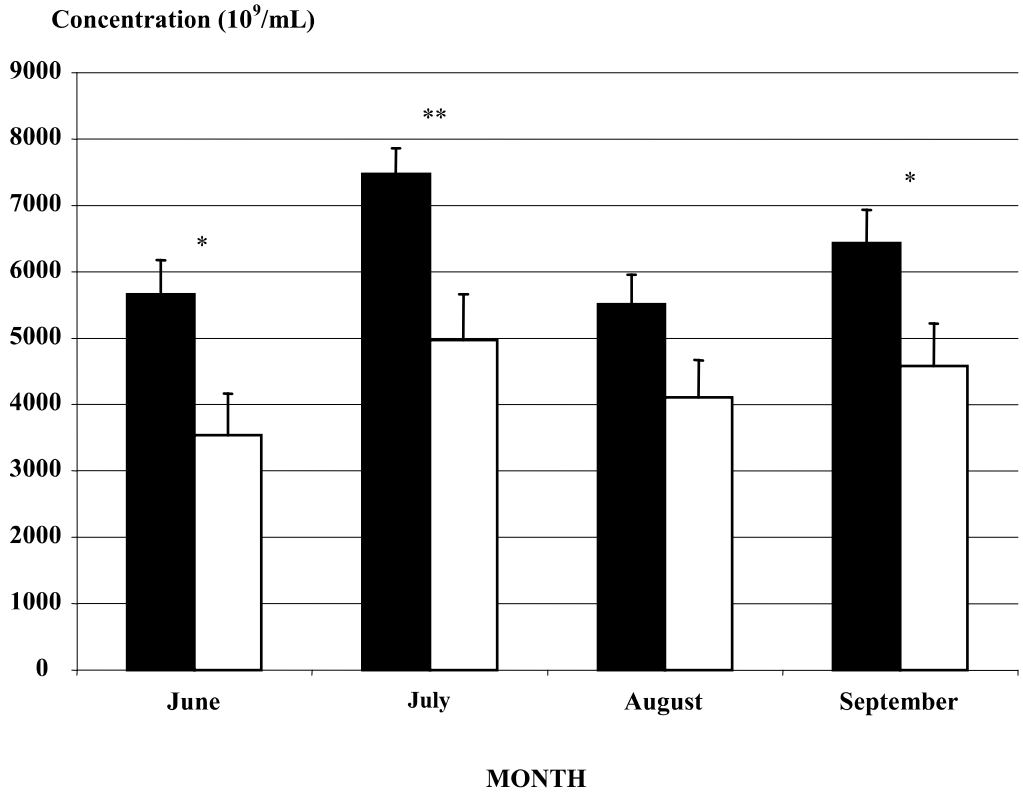


Figure 2: Mean (±S.E.M.) for sperm concentration (mL) of Mediterranean goat bucks treated with melatonin (M group, ■) or without melatonin treatment (C group, □). (*: $P < 0.05$ and **: $P < 0.01$).



Submitted July 01, 2008 – Accepted May 25, 2009

Comunicación 9: Se corresponde con el objetivo 2:

Tipo: Póster (P14)

La reactivación de la actividad sexual en hembras caprinas Mediterráneas no es modificada por el tratamiento previo con la combinación de fotoperiodo artificial de días largos y melatonina usados durante el anestro estacionario.

Reactivation of sexual activity in Mediterranean goat females is not modified by previous treatment with artificial long days and exogenous melatonin used during the seasonal anoestrous.

Luis Ángel Zarazaga, María Carolina Gatica, José Luis Guzmán.

En Actas de la I Congreso Internacional de la Asociación Española de Reproducción Animal (AERA) y de la Sociedad Británica de Andrología (BAS), Gijón, España. *Reproduction in Domestic Animals* 43(2008):59.

evaluate the effect of twin pregnancy on the pregnancy loss rate. With this aim, the reproductive data (2002–2006) from a group of 80 farms (2000 cows) under reproductive control by means of ultrasonography were used. Results indicated a global percentage of 11% of early pregnancy losses during these years, as well as 4% average of twin births (increasing with the parity number). The use of ultrasonography allowed detection of 50–60% of twin pregnancies, while a second ultrasonography diagnosis showed pregnancy losses among 30% of animals that carried twin pregnancy. Among cows with a previous diagnosis of twin pregnancy loss, 17% presented a new pregnancy loss in the same calving interval. In conclusion, twin pregnancy is a very important factor risk to an early pregnancy loss from dairy cattle and the ultrasonography is an effective method for its diagnosis.

Abstract P14

Reactivation of Sexual Activity in Mediterranean Goat Females is Not Modified by Previous Treatment with Artificial Long Days and Exogenous Melatonin Used During the Seasonal Anoestrous

LA Zarazaga[1], MC Gatica[2] and JL Guzmán[1]

[1]*Universidad de Huelva;* [2]*Universidad Arturo Prat, Spain*

One experiment was designed to determine if the date of reactivation of female sexual activity in the normal breeding season is modified by a previous treatment with exogenous melatonin and artificial long days during seasonal anoestrous. Two balanced groups (by body weight and body condition score) of does were used. One group was subjected to artificial long days-melatonin treatment (LD-M, n = 17) and the control group was maintained under natural photoperiod (C, n = 17). At the end of the artificial long days (16L : 8O) (from the 14th November to the 20th February) the treated group received 1 s.c. melatonin implant. Oestrous activity was evaluated daily from 1st June to 30th September after a period of reproductive activity induced by the previous treatment. Ovulation rate was evaluated by laparoscopy 7 days after positive identification of oestrous. Plasma progesterone concentrations were measured weekly. The effects of treatment and time were studied on each variable. No effect of treatment on the date of the first detected oestrous (28 September ± 6.1 vs 18 September ± 5.2 for LD-M and C group respectively) or on the date of the first ovulatory activity (26 September ± 5.6 vs 13 September ± 6.4 for LD-M and C group respectively) was observed. Moreover, no effect of treatment on ovulation rate of the first detected oestrous was observed (1.8 ± 0.3 and 1.6 ± 0.1 for LD-M and C group respectively). We conclude that LD-M treatment does not modify the normal reactivation of sexual activity in Mediterranean goat females.

Abstract P15

Ovarian Response to FSH and eCG Administered During Follicular Wave Emergence in Alpacas (*Vicugna pacos*)

T Huanca[1], W Huanca[2], J Becerra[3], L Quintela[3] and PG Herradón[3]

[1]*EE-ILPA INIA, Puno, Perú;* [2]*Universidad de San Marcos, Lima, Perú;* [3]*Reproducción y Obstetricia, Facultad de Veterinaria-USC, Lugo, Spain*

The aim of this study was to compare the efficacy of FSH and eCG, administered during follicular wave emergence, to induce superovulation in alpacas. Ovarian response was evaluated ultrasonographically through the observation of structures developed in the ovaries. Superovulatory treatments were initiated 48 h after ovulation induction of the dominant follicle with GnRH (4 μg, im). Alpacas (n = 22 per group) were treated with 1) 200 mg of FSH im in decreasing doses every 12 h for 5 days or 2) 750 IU of eCG as a single im dose. On day 4 after gonadotrophin treatment a single im dose of tiaprost (0.15 mg) was administered. All animals were mated on day 5 and were given GnRH at that time. Our results showed that the mean number of preovulatory follicles was variable (2–21 follicles) and the mean value was 8.5 ± 5.5. However the number of animals not responding to the hormonal treatments was very low. In FSH treated females, a higher number of follicles with a diameter < 7 mm was observed, whereas in females treated with eCG the number and mean size of preovulatory follicles was higher. An important proportion of the treated females (34.1%) developed cystic follicles this being much more frequent in females receiving eCG (71.4%). The number of corpora lutea (CL) present in the ovary before uterine flushing showed that most of the treated females (93.2%) had responded to treatment, and the mean number of CL was higher in females treated with eCG (9.9 ± 0.9 vs 5.7 ± 1.3).

Abstract P16

Follicular Population Characteristics of Primiparous Rabbit Does Under Different Reproductive Rhythms

M Arias-Álvarez[1], RM García-García[1], PG Rebollar[2], L Revuelta[1] and PL Lorenzo[1]

[1]*Department Animal Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, UCM, Madrid, Spain;* [2]*Dpto. Producción Animal, ETSIA-UPM, Madrid, Spain*

Our aim was to categorize rabbit ovarian follicular population and analyse apoptosis index in primiparous does under semi-intensive rhythm (artificially inseminated (AI) at 11 days post-partum; lactation period) and extensive rhythm (AI at 32 days post-partum; post-weaning period). Serum oestradiol 17β (E_2) and testosterone (T) levels were recorded at time of AI in NZW x California rabbits, under semi-intensive (Group A; n = 15) or extensive rhythm (Group B; n = 15). In addition, after euthanasia ovaries were stained for histological studies, and apoptosis was determined by TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labelling). Statistical analysis was performed by student's *t*-test. Serum E_2, T and E_2: T ratio were similar in both groups (16.2 ± 0.8 vs 20.5 ± 5.0 pg/ml; 0.7 ± 0.05 vs 1.09 ± 0.1 ng/ml; 22.2 ± 1.8 vs 26.3 ± 8.7). A total of 4282 follicles were recorded and no significant differences were found in mean follicular population (antral, 16.6 ± 2.5 vs 11.8 ± 2.1; secondary, 6.3 ± 0.8 vs 7.5 ± 1.9; primary, 16.2 ± 3.6 vs 12.7 ± 2.3 and primordial follicles, 97.6 ± 15.4 vs 117.3 ± 28.3). However, in 952 follicles studied, group A showed higher apoptosis index of follicles (26.8 ± 1.9 vs 15.4 ± 1.7%, p < 0.001) than group B. In conclusion, extensive rhythm seems to enhance the health of follicular populations, thus it could be more adapted to the reproductive physiology of primiparous does (Funded by CM, FSE and MEC).

© 2008 The Authors. Journal compilation © 2008 Blackwell Verlag

REACTIVATION OF SEXUAL ACTIVITY IN MEDITERRANEAN GOAT FEMALES IS NOT MODIFIED BY A PREVIOUS TREATMENT WITH ARTIFICIAL LONG DAYS AND EXOGENOUS MELATONIN USED DURING THE SEASONAL ANOESTROUS.

Luis A. Zarazaga, María Carolina Gatica[1], José Luis Guzmán,
Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819 Palos de la Frontera, Huelva, Spain. zarazaga@uhu.es
[1]Departamento de Agricultura del Desierto, Universidad Arturo Prat, Av. Arturo Prat 2120, Iquique, Chile

INTRODUCTION

- In many seasonally breeding animals reproductive cycles are controlled by photoperiodic changes.
- Exogenous melatonin and photoperiodic treatments has been used during seasonal anoestrous to enhance reproductive activity.
- The constant exhibition to "short photoperiod" signal provided by exogenous melatonin generates photorefractoriness.

AIMS

- The aim of this study was to determine if the date of the reactivation of sexual activity at the normal breeding season is modified by a previous treatment with exogenous melatonin and artificial long days used during the seasonal anoestrous in Mediterranean goat females.

MATERIAL AND METHODS

Goat females were divided into two groups balanced according with their live weight (LW) and body condition score (BCS). The effect of treatment and time was studied on each studied variable.

LD-M group: N=15 treated with long days (LD) from November 14th to February 20th, and at this moment received 3 subcutaneous melatonin implants (Melovine®, CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain)

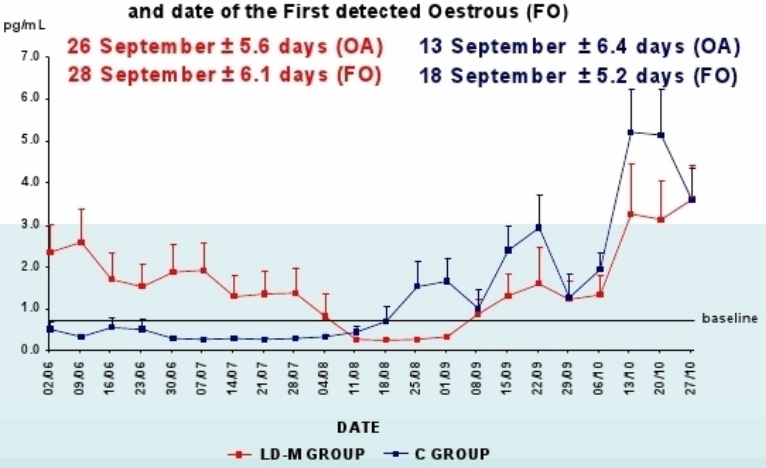
C group: N= 16, without any supplementary light.

From July to October

- Progesterone concentrations → Weekly
- Oestrous activity was tested daily using aproned bucks.
- Ovulation rate was determined by laparoscopy 7 days after positive identification of oestrus.
- Ovulatory activity was confirmed when two or more consecutive plasma samples had progesterone concentrations above baseline (0.5 ng/ml) with ciclicity.

RESULTS

Evolution of the progesterone concentration to determine the onset of the Ovarian Activity (OA) and date of the First detected Oestrous (FO)



Range of variation of the onset of the ovarian activity from 28 August to 19 October and 28 July to 22 October for LD-M and C group respectively.

Range of variation of the first detected oestrous from 28 August to 19 October and 17 August to 19 October for LD-M and C group respectively.

No effect of treatment on ovulation rate at the first detected oestrous was observed (1.8 ± 0.3 and 1.6 ± 0.1 corpora lutea for LD-M and C group respectively).

CONCLUSIONS

We can conclude that LD-M treatment does not modify the normal reactivation of the sexual activity in Mediterranean goat females.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Grant PETRI 95-0964.OP from C.I.C.Y.T. (Spain). The authors are grateful to CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain, for providing Melovine®, implants.

Comunicación 10: Se corresponde con el objetivo 5:

Tipo: Póster (P81)

El uso de fotoperiodo artificial de días largos no es efectivo para desencadenar actividad reproductiva pero incrementa la producción espermática en machos caprinos Mediterráneos.

The use of artificial long days is not effective to enhace reprodcutive actvity but increases sperm production in Mediterranean bucks

María Carolina Gatica, José Luis Guzmán, Irma Celi, Luis Ángel Zarazaga.

En Actas de la I Congreso Internacional de la Asciación Española de Reproducción Animal (AERA) y de la Sociedad Británica deAndrología (BAS), Gijón, España. *Reproduction in Domestic Animals* 43(2008):78.

of thorax perimeter (TP), back height (BH) and body length (BL) were determined with a metric tape. Data were analyzed through lineal multiple regression and analysis of variance. Results indicate that non penis adherence was determined in 10, 17.5, 22.5, 27.5, 47.5 years 60% of males from 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20 and 24 month age, respectively. Differences between males with and without adherence were compared to BH (82.2 ± 3.7 vs 85.9 ± 2.8 cm); BL (57.3 ± 3.1 vs 60.6 ± 3.2 cm); TP (83.2 ± 3.8 vs 86.5 ± 3.1 cm) ($p < 0.05$). A positive correlation exists between BH ($r = 0.57$); BL ($r = 0, 56$) and TP ($r = 70$). Results suggest a relation between penis adherence and biometric parameters and that only 60% of animals under natural pasture condition have free prepuce adherence.

Abstract P81

The Use of Artificial Long Days is Not Effective to Enhance Reproductive Activity but Increases Sperm Production in Mediterranean Bucks

MC Gatica[1], JL Guzmán[2], I Celi[2] and LA Zarazaga[2]

[1]*Universidad Arturo Prat, Santiago, Chile;* [2]*Universidad de Huelva, Spain*

A study was conducted to determine if treatment with artificial long days is appropriate to induce an increase in the reproductive activity and on the semen production in Mediterranean bucks during the seasonal anoestrous. Two balanced groups of bucks according to their Body Weight (BW) and Testicular Size (TS) were used. One group was subjected to artificial long days treatment (16L : 8O) (LD, n = 7) from 17th November to 5th February, and the control group was maintained under natural photoperiod (C, n = 8). During the experiment, sperm production and behaviour were studied monthly. The effect of treatment and month was studied on each variable. Photoperiodic treatment influenced positively the sperm production (8812.54 ± 474.00 vs 6554.25 ± 313.50 sperm/ejaculate for LD and C group, respectively $p < 0.01$). Interaction treatment-month was close to significance ($p = 0.1$). The sperm production of the LD group was significantly higher than the C group in March, April and May (at least $p < 0.05$). Concerning the percentage of active bucks no differences between groups were observed but, differences in January, February and March between groups were observed as consequence the photoperiodic treatment ($p < 0.01$) (42.5%, 55.0% and 62.5% vs 77.1%, 82.9% and 91.4% for LD and C group respectively). These results indicate that, LD photoperiod from November to February, increases sperm production. However, the percentage of active males was not significantly higher after this management so it may not benefit reproductive activity in standard, livestock conditions.

Abstract P82

Reactivation of Sexual Activity in Mediterranean Bucks after a Treatment with Artificial Long Days and Exogenous Melatonin during Seasonal Anoestrous

JL Guzmán[1], MC Gatica[2] and LA Zarazaga[1]

[1]*Universidad de Huelva, Spain;* [2]*Universidad Arturo Prat, Santiago, Chile*

A study was conducted to determine if the date of reactivation of sexual activity at the normal breeding season is modified by a previous treatment during seasonal anoestrous with exogenous melatonin and artificial long days in bucks. Two balanced groups according to body and testicular weight were used. One group was subjected to artificial long days-melatonin treatment (LD-M, n = 6) and the control group was maintained under natural photoperiod (C, n = 5). The artificial long days (16L : 8O) started 14th November and 20th February, received 3 s.c. implants of melatonin. We studied weekly testosterone concentrations and monthly volume and sperm concentrations from 1st June to 30th September after a period of reproductive activity induced by the previous treatment. The effect of treatment and time was studied on each variable. Testosterone concentrations were clearly influenced by treatment and time ($p < 0.01$) with higher testosterone concentrations in the C group (4.31 ± 0.48 vs 10.13 ± 0.94 ng/ml for LD-M and C group, respectively). Similarly, an interaction with treatment-time was observed ($p < 0.05$). The effect of treatment on the date of the reactivation of the testicular activity was close to significance ($p = 0.07$) (15th August ± 2.2 vs 16th July ± 6.1 for LD-M and C group, respectively). There were no differences were observed in volume and sperm concentration between groups or during the whole study. We can conclude that LD-M treatment produces a moderate delay on the onset of the normal reproductive activity in Mediterranean bucks.

Abstract P83

Breeding Soundness Evaluation in Asturiana de Valles Young Bulls

JA García Paloma and A Katchicualula

Genética y Reproducción-SERIDA, Gijón, Spain

Usually, the bull breeding soundness evaluation (BSE) is obtained measuring the scrotal circumference (SC) and the seminal quality via electroejaculation. There are two main classifications: satisfactory (meet all minimum requirements) and unsatisfactory (do not meet someone), but sometimes, it's added other clearly subjective, the questionable classification (do not meet someone, but it does not result in a marked reduction of fertility). We propose one methodology less strict and more objective, through one threshold for SC and the quantitative evaluation of the seminal quality. Over 32 cm of SC, the BSE was defined by the value of one seminal index (SI). A scale of 10 steps was established for each one of the parameters (0–100 points), assigning 70 points to the step of minimum requirements: normal morphology (70–77%), progressive motility (60–69%) and concentration (400–600 × 10^6 sperm/ml). SI was calculated as (morphology*0.4 + motility*0.4 + concentration*0.2) and the BSE was assigned: unsatisfactory (< 30), questionable (30–69) and satisfactory (> 69). 137 bulls with 13–14 months of age were evaluated with the following results (%): satisfactory (63), questionable (30) and unsatisfactory (7). Since the seminal quality can improve with the age, the recommendation for the bulls with questionable classification would be a later evaluation, or his use in herds with low reproductive demand. We conclude that for its minor subjectivity, the proposed methodology can contribute to the unification of criteria between veterinarians and to a more widespread use of the BSE.

© 2008 The Authors. Journal compilation © 2008 Blackwell Verlag

THE USE OF ARTIFICIAL LONG DAYS IS NOT EFFECTIVE TO ENHANCE REPRODUCTIVE ACTIVITY BUT INCREASES SPERM PRODUCTION IN MEDITERRANEAN BUCKS.

María Carolina Gatica[1], José Luis Guzmán, Inma Cell, Luis A. Zarazaga.
Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819 Palos de la Frontera, Huelva, Spain. zarazaga@uhu.es
[1]Departamento de Agricultura del Desierto, Universidad Arturo Prat Av. Arturo Prat 2120, Iquique, Chile

INTRODUCTION

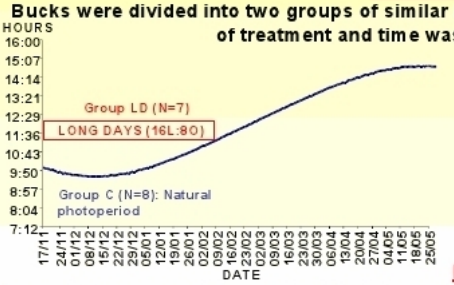
- Mediterranean goats males shows a clear seasonality of reproductive activity.
- Photoperiodic treatments has been used during seasonal anoestrous to enhance reproductive activity in different breeds of goat but the data are scarce about the results of this method in Mediterranean goat males.
- The European regulation restricts increasingly the use of hormones in the livestock production.

AIMS

- One experiment was conducted to determine if the treatment with artificial long days is appropriate to induce an increase in the reproductive activity and on the semen production in Mediterranean bucks during the normal seasonal anoestrous.

MATERIAL AND METHODS

Bucks were divided into two groups of similar body weight (BW) and testicular weight (TW). The effect of treatment and time was studied on each studied variable.



Sperm production | Behaviour

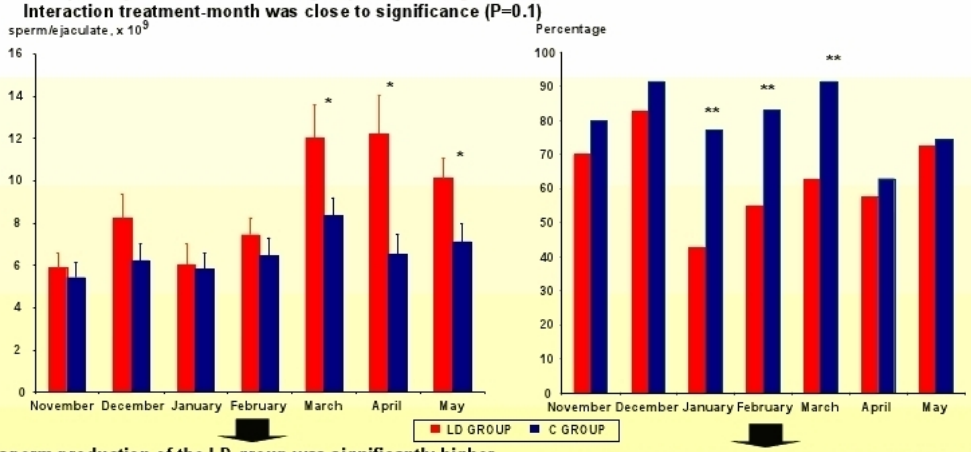
First 8 days of each month

3-d periods of daily sperm collection separated by 2 d of rest. Using artificial vagina. Bucks had 5 minutes to ejaculate following exposure to estrogenized female.

RESULTS

Photoperiodic treatment influenced positively the total number of spermatozoa per ejaculate (8812.5 ± 474.0 x10^6 vs 6554.3 ± 313.5 x 10^6 sperm/ejaculate for LD and C group, respectively P<0.01). Interaction treatment-month was close to significance (P=0.1)

No differences between groups were observed in the mean percentage of active bucks.



sperm production of the LD group was significantly higher than the C group in March, April and May (P<0.05).

Differences between groups were observed in January, February and March between groups were observed as consequence the photoperiodic treatment (P<0.01).

CONCLUSIONS

These results indicate that, the treatment with long days from November to February, allows to obtain a higher sperm production after treatment. However, not a lower percentage of males were actives, when these animals could be used to breed in livestock conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Grant PETRI 95-0964.OP from C.I.C.Y.T. (Spain).

Comunicación 11: Se corresponde con el objetivo 5:

Tipo: Póster (P82)

Reactivación de la actividad sexual en machos caprinos Mediterráneos después del tratamiento con fotoperiodo artificial de días largos y melatonina exógena aplicados durante el anestro estacionario.

Reactivation of sexual activity in Mediterranean bucks after a treatment with artificial long days and exogenous melatonin during seasonal anoestrous

José Luis Guzmán, María Carolina Gatica, Luis Ángel Zarazaga.

En Actas de la I Congreso Internacional de la Asociación Española de Reproducción Animal (AERA) y de la Sociedad Británica de Andrología (BAS), Gijón, España. *Reproduction in Domestic Animals* 43(2008):78.

of thorax perimeter (TP), back height (BH) and body length (BL) were determined with a metric tape. Data were analyzed through lineal multiple regression and analysis of variance. Results indicate that non penis adherence was determined in 10, 17.5, 22.5, 27.5, 47.5 years 60% of males from 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20 and 24 month age, respectively. Differences between males with and without adherence were compared to BH (82.2 ± 3.7 vs 85.9 ± 2.8 cm); BL (57.3 ± 3.1 vs 60.6 ± 3.2 cm); TP (83.2 ± 3.8 vs 86.5 ± 3.1 cm) ($p < 0.05$). A positive correlation exists between BH ($r = 0.57$); BL ($r = 0, 56$) and TP ($r = 70$). Results suggest a relation between penis adherence and biometric parameters and that only 60% of animals under natural pasture condition have free prepuce adherence.

Abstract P81

The Use of Artificial Long Days is Not Effective to Enhance Reproductive Activity but Increases Sperm Production in Mediterranean Bucks

MC Gatica[1], JL Guzmán[2], I Celi[2] and LA Zarazaga[2]

[1]*Universidad Arturo Prat, Santiago, Chile;* [2]*Universidad de Huelva, Spain*

A study was conducted to determine if treatment with artificial long days is appropriate to induce an increase in the reproductive activity and on the semen production in Mediterranean bucks during the seasonal anoestrous. Two balanced groups of bucks according to their Body Weight (BW) and Testicular Size (TS) were used. One group was subjected to artificial long days treatment (16L : 8O) (LD, n = 7) from 17th November to 5th February, and the control group was maintained under natural photoperiod (C, n = 8). During the experiment, sperm production and behaviour were studied monthly. The effect of treatment and month was studied on each variable. Photoperiodic treatment influenced positively the sperm production (8812.54 ± 474.00 vs 6554.25 ± 313.50 sperm/ejaculate for LD and C group, respectively $p < 0.01$). Interaction treatment-month was close to significance ($p = 0.1$). The sperm production of the LD group was significantly higher than the C group in March, April and May (at least $p < 0.05$). Concerning the percentage of active bucks no differences between groups were observed but, differences in January, February and March between groups were observed as consequence the photoperiodic treatment ($p < 0.01$) (42.5%, 55.0% and 62.5% vs 77.1%, 82.9% and 91.4% for LD and C group respectively). These results indicate that, LD photoperiod from November to February, increases sperm production. However, the percentage of active males was not significantly higher after this management so it may not benefit reproductive activity in standard, livestock conditions.

Abstract P82

Reactivation of Sexual Activity in Mediterranean Bucks after a Treatment with Artificial Long Days and Exogenous Melatonin during Seasonal Anoestrous

JL Guzmán[1], MC Gatica[2] and LA Zarazaga[1]

[1]*Universidad de Huelva, Spain;* [2]*Universidad Arturo Prat, Santiago, Chile*

A study was conducted to determine if the date of reactivation of sexual activity at the normal breeding season is modified by a previous treatment during seasonal anoestrous with exogenous melatonin and artificial long days in bucks. Two balanced groups according to body and testicular weight were used. One group was subjected to artificial long days-melatonin treatment (LD-M, n = 6) and the control group was maintained under natural photoperiod (C, n = 5). The artificial long days (16L : 8O) started 14th November and 20th February, received 3 s.c. implants of melatonin. We studied weekly testosterone concentrations and monthly volume and sperm concentrations from 1st June to 30th September after a period of reproductive activity induced by the previous treatment. The effect of treatment and time was studied on each variable. Testosterone concentrations were clearly influenced by treatment and time ($p < 0.01$) with higher testosterone concentrations in the C group (4.31 ± 0.48 vs 10.13 ± 0.94 ng/ml for LD-M and C group, respectively). Similarly, an interaction with treatment-time was observed ($p < 0.05$). The effect of treatment on the date of the reactivation of the testicular activity was close to significance ($p = 0.07$) (15th August ± 2.2 vs 16th July ± 6.1 for LD-M and C group, respectively). There were no differences were observed in volume and sperm concentration between groups or during the whole study. We can conclude that LD-M treatment produces a moderate delay on the onset of the normal reproductive activity in Mediterranean bucks.

Abstract P83

Breeding Soundness Evaluation in Asturiana de Valles Young Bulls

JA García Paloma and A Katchicualula

Genética y Reproducción-SERIDA, Gijón, Spain

Usually, the bull breeding soundness evaluation (BSE) is obtained measuring the scrotal circumference (SC) and the seminal quality via electroejaculation. There are two main classifications: satisfactory (meet all minimum requirements) and unsatisfactory (do not meet someone), but sometimes, it's added other clearly subjective, the questionable classification (do not meet someone, but it does not result in a marked reduction of fertility). We propose one methodology less strict and more objective, through one threshold for SC and the quantitative evaluation of the seminal quality. Over 32 cm of SC, the BSE was defined by the value of one seminal index (SI). A scale of 10 steps was established for each one of the parameters (0–100 points), assigning 70 points to the step of minimum requirements: normal morphology (70–77%), progressive motility (60–69%) and concentration (400–600 × 10^6 sperm/ml). SI was calculated as (morphology*0.4 + motility*0.4 + concentration*0.2) and the BSE was assigned: unsatisfactory (< 30), questionable (30–69) and satisfactory (> 69). 137 bulls with 13–14 months of age were evaluated with the following results (%): satisfactory (63), questionable (30) and unsatisfactory (7). Since the seminal quality can improve with the age, the recommendation for the bulls with questionable classification would be a later evaluation, or his use in herds with low reproductive demand. We conclude that for its minor subjectivity, the proposed methodology can contribute to the unification of criteria between veterinarians and to a more widespread use of the BSE.

© 2008 The Authors. Journal compilation © 2008 Blackwell Verlag

REACTIVATION OF SEXUAL ACTIVITY IN MEDITERRANEAN BUCKS AFTER A TREATMENT WITH ARTIFICIAL LONG DAYS AND EXOGENOUS MELATONIN DURING THE SEASONAL ANOESTROUS.

José Luis Guzmán, María Carolina Gallca[1], Luis A. Zarazaga.
Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819 Palos de la Frontera, Huelva, Spain. zarazaga@uhu.es
[1]Departamento de Agricultura del Desierto, Universidad Arturo Prat; Av. Arturo Prat 2120, Iquique, Chile

INTRODUCTION

·Mediterranean goats males shows a clear seasonality of reproductive activity.
· Exogenous melatonin and photoperiodic treatments has been used during seasonal anoestrous to enhance reproductive activity.
· The constant exhibition to "short photoperiod" signal provided by exogenous melatonin generates photorefractoriness.

AIMS

·The aim of this study was to determine if the date of the reactivation of sexual activity at the normal breeding season is modified by a previous treatment with exogenous melatonin and artificial long days used during the seasonal anoestrous in Mediterranean goat bucks.

MATERIAL AND METHODS

Two balanced groups according to their live weight (LW) and Testicular weight (TW) of bucks were used. The effect of treatment and time was studied on each studied variable.

LD-M group: N=6 treated with long days (LD) from November 14th to February 20th, and at this moment received 3 subcutaneous melatonin implants (Melovine®, CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain)

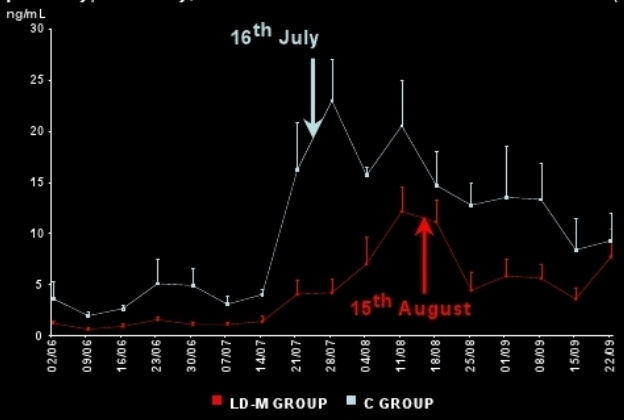
C group: N= 5, without any supplementary light.

From July to September

- Testosterone concentrations → Weekly
- Sperm concentration
- Volume ejaculate
- First 8 days of each month
- 3-d periods of daily sperm collection separated by 2 d of rest. Using artificial vagina. Bucks had 5 minutes to ejaculate following exposure to estrogenized female.

RESULTS

Testosterone concentrations were clearly influenced by treatment and time (P<0.01) with higher testosterone concentrations in the C group (4.31 ± 0.48 vs 10.13 ± 0.94 ng/ml for LD-M and C group, respectively). Similarly, an interaction treatment-time was observed (P<0.05).



The effect of the treatment on the date of the reactivation of the testicular activity was closely to significance (P=0.07) (15th August ± 2.2 vs 16th July ± 6.1 for LD-M and C group, respectively).

No differences between groups or during the whole experiment were observed on ejaculate volume or on sperm concentration.

CONCLUSIONS

We can conclude that LD-M treatment used during the seasonal anoestrous could induce a little delay on the reactivation of the reproductive activity at the normal breeding season in Mediterranean bucks.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Grant PETRI 95-0964.OP from C.I.C.Y.T. (Spain). The authors are grateful to CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain, for providing Melovine®, implants.

Comunicación 12: Se corresponde con el objetivo 1, 2, 3, 4 y 5.

Utilización de fotoperiodo y melatonina en el control de la reprducción en la especie caprina.

Luis Ángel Zarazaga, María Carolina Gatica, Irma Celi, José Luis Guzmán, Benoît Malapaux.

Ponencia. En Actas del XVIII Congreso de Zootecnia UTAD-Vila Real, Portugal, (2009):153-168.

UTILIZACIÓN DE FOTOPERIODO Y MELATONINA EN EL CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN EN LA ESPECIE CAPRINA

L.A. Zarazaga[*], M.C. Gatica, I. Celi, J.L. Guzmán, B. Malpaux[a]
Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819, Palos de la Frontera, Huelva, Spain
[*]Corresponding author (L.A. Zarazaga) zarazaga@uhu.es
[a]Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux, Centre INRA de Tours, 37380 Nouzilly, France.
Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819, Palos de la Frontera, Huelva, Spain

1. Introducción

La estacionalidad reproductiva manifestada en la especie caprina, es una estrategia de adaptación a las condiciones climáticas y de disponibilidad de alimentos heredada de sus ancestros salvajes (figura 1). En éstos, dicho mecanismo permite a las crías nacer en un momento del año en que las condiciones son más favorables tanto para su supervivencia y crecimiento como para el mantenimiento y producción de leche por parte de su madre. La domesticación ha supuesto la casi total eliminación de la estacionalidad en determinadas especies, ya que en este caso las condiciones medioambientales naturales disminuyen y como consecuencia de ello la duración de los periodos de actividad reproductiva tienden a incrementarse, pero es un mecanismo que sigue existiendo principalmente en los pequeños rumiantes. Como consecuencia de los ciclos reproductivos de estas especies se producen importantes variaciones en la producción de leche y carne que provoca, a su vez, importantes variaciones en el precio pagado a los productores y/o en la disponibilidad de los diferentes productos destinados al consumo humano.

Nos centraremos en los mecanismos fisiológicos involucrados en estas variaciones estacionales de la actividad reproductiva así como en los métodos que permitan el control de las cubriciones, especialmente mediante la utilización de melatonina y tratamientos fotoperiódicos que se puedan aplicar en edificios abiertos y la necesidad de utilización del efecto macho.

2. Estacionalidad reproductiva: papel del fotoperiodo.

Entre los principales factores medioambientales, como son la temperatura o la disponibilidad de alimentos, el fotoperiodo o variación diaria del número de horas de luz es el factor más repetible a lo largo de los años. Este hecho, junto a que los animales que se localizan en latitudes bajas, o cerca del Ecuador, muestran actividad reproductiva casi durante todo el año mientras que los animales que se encuentran en latitudes elevadas se caracterizan por importantes variaciones de su actividad reproductiva a lo largo del año, han puesto de manifiesto la importancia del papel del fotoperiodo en el control de la actividad reproductiva.

En este aspecto, 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. Estos hechos, en condiciones naturales, conllevan a que en nuestras latitudes la hembra de la especie caprina presente un periodo de actividad reproductiva entre el mes de agosto y enero (Zarazaga *et al.*, 2005), y que incluso los machos tengan una importante reducción de su líbido durante la primavera, momento en que en las explotaciones caprinas es muy habitual la realización del efecto macho (Zarazaga *et al.*, 2009a), independientemente del nivel de alimentación. Recientes resultados obtenidos por nuestro grupo trabajando con cabras ovariectomizadas y portadoras de un implante de 3 cm de silastic (d.i.=3.3 mm; d.e. = 4.6 mm) (Karsch *et al.*, 1973) conteniendo estradiol (Sigma Chemical Co., St. Louis), sometidas a periodos alternantes de 90 días cortos (8 horas de luz: 16 de oscuridad) y 90 días largos (16 horas de luz: 8 de oscuridad), han mostrado que la actividad reproductiva se inicia aproximadamente entre los 49 y 62 días después de haber comenzado los días cortos mientras que la secreción de LH se ve inhibida entre los 32 y los 25 días de haberse iniciado los días largos (Zarazaga *et al.*, resultados no

publicados). De todos modos el papel del fotoperiodo es más complejo de lo que pudiera parecer, en el sentido de que los días cortos estimulan la actividad reproductiva y los días largos la inhiben, puesto que en el momento en el que los animales son mantenidos en días cortos constantes éstos cesan su actividad reproductiva, mientras que, por el contrario, cuando son sometidos a días largos constantes éstos inician su actividad reproductiva, debido a que se ponen en marcha mecanismos de fotorrefractariedad (Thimonier, 1989). En caprinos mediterráneos hemos observado como aproximadamente hacia los 160 días de estar las cabras sometidas a días largos éstas iniciaban su secreción de LH manifestando el mecanismo de fotorrefractariedad a los días largos (Zarazaga *et al*., resultados no publicados).

Por lo tanto existen dos mecanismos principales implicados en el control de las variaciones estacionales de la reproducción: por un lado está el ritmo endógeno de actividad neuroendocrina que aparece cuando los animales son mantenidos experimentalmente en fotoperiodo constante; así cuando ovejas Suffolk ovariectomizadas y portadoras de un implante de estradiol han sido mantenidas en días cortos constantes durante más de 3 años, aparece un ritmo circanual de reproducción pero desincronizado (Karsch *et al.*, 1989) y el mismo fenómeno también ocurre en cabras (Aguilar *et al.*, 2001). De todo ello se desprende que el papel del fotoperiodo es sincronizar y ajustar el ciclo reproductivo a los 365 días de duración del año.

Y en segundo lugar están los cambios de la duración del día y su interpretación por el sistema nervioso central. Dicha interpretación se lleva a cabo vía duración de la secreción de melatonina por la glándula pineal. La información fotoperiódica es captada por la retina y transmitida a los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo desde donde llega hasta los ganglios cervicales superiores pasando por los núcleos paraventriculares, y por último, a la glándula pineal (Tamarkin *et al.*, 1985). Esta glándula pineal tiene como misión la síntesis y secreción de melatonina. Esta hormona única y exclusivamente se sintetiza durante la noche ya que la información luminosa captada por la retina es inhibidora de su síntesis. De este modo, la duración de la secreción de melatonina es larga durante los días cortos y corta durante los días largos (figura 2, Delgadillo *et al.*, 2001). La percepción de esta duración permite a los animales controlar su actividad reproductiva (Bittman *et al.*, 1983).

La melatonina traduce la información fotoperiódica, de tal forma que la pinealectomía del animal inhibe los efectos del fotoperiodo sobre la reproducción. Sobre este modelo, la melatonina administrada por vía periférica simulando un perfil de secreción determinado restablece los efectos estimulantes de los días cortos o los efectos inhibidores de los días largos sobre la secreción de LH (Malpaux, 2001). Este control de la secreción de LH se debe a que la melatonina es liberada, además de a la circulación general, al líquido cerebroespinal (Tricore *et al*., 2002) y se une a receptores que se encuentran en el hipotálamo medio basal (Malpaux *et al*., 1997). A través de estudios farmacológicos y de hibridación *in situ* estos sitios de unión han sido identificados como el receptor oMT_1 (Mailliet *et al*., 2004; Migaud *et al*., 2005). Si bien existen también otros receptores de unión de la melatonina cuyo papel está todavía por demostrar (Legros *et al*., 2007). La acción de la melatonina sobre la secreción de GnRH es indirecta interviniendo un gran número de neuromediadores. La utilización de implantes de melatonina modifica la síntesis de dopamina en la eminencia media (Viguie *et al*., 1995). Otros neurotransmisores como la serotonina están implicados en la inhibición de la GnRH en el anestro. Así, en caprinos mediterráneos se ha observado como el sistema dopaminérgico y serotoninérgico están implicados en la inhibición de la secreción de LH al inicio del periodo de anestro estacionario (Zarazaga *et al.,* 2009b). Durante el periodo de pleno anestro estacionario la inyección de pimozide, un antagonista dopaminérgico, incrementa las concentraciones medias y el número de pulsos de LH (Zarazaga *et al.*, 2009c) y al final del periodo de anestro estacionario la inyección de naloxone, un antagonista del sistema opioidérgico, incrementa las concentraciones medias de LH, el número de pulsos y la amplitud de los mismos (Zarazaga *et al.*, 2009d).

3. Técnicas de control de la estacionalidad reproductiva: fotoperiodo y melatonina

Reducir el periodo de anestro estacionario, para lograr un adelanto del periodo de actividad reproductiva o incluso conseguir un periodo de actividad reproductiva durante este anestro estacionario, es uno de los principales objetivos a nivel de la reproducción caprina. Así, en los últimos años se ha trabajado mucho para intentar poner en práctica métodos que puedan ser aplicados y que sean efectivos a nivel de explotación, de modo que el uso de los tratamientos fotoperiódicos y de implantes de melatonina se ha incrementado mucho últimamente para controlar la reproducción caprina.

La base de estos tratamientos es la siguiente:

1- Se ha demostrado que para que los tratamientos fotoperiódicos sean efectivos, es necesaria la alternancia de días largos y de días cortos puesto que no es posible mantener a los animales en fotoperiodo estimulante permanentemente (mecanismo de fotorrefractariedad).

2- Los días largos pueden ser reemplazados mediante un flash de luz durante la fase fotosensible que se produce alrededor de las 16 horas después del alba (Chemineau *et al.,* 1992).

3- Los días cortos, que estimulan la reproducción, pueden ser reemplazados por un tratamiento con melatonina cuando los animales han percibido un número de días crecientes suficientes (días largos) a partir del solsticio de invierno. Por lo tanto, la acción de los implantes de melatonina actúa imitando el efecto estimulatorio de los días cortos.

4- La utilización de los implantes de melatonina a nivel comercial se asocia con el "efecto macho" y el tratamiento se lleva a cabo en ambos sexos.

Utilización de tratamientos fotoperiódicos

La utilización de los tratamientos fotoperiódicos se realiza generalmente en centros de inseminación artificial donde se requiere una producción de semen constante a lo largo del año y en los que los machos se mantienen en edificios cerrados lo que facilita un control exhaustivo del encendido y apagado de las luces. En estos centros de inseminación artificial una alternancia de un mes de días largos y un mes de días cortos se muestra muy eficaz (Pelletier y Almeida, 1987), permitiendo mantener una producción de semen constante y de alta calidad a lo largo del año y produciendo un 70% más de dosis seminales para la inseminación artificial que aquellos machos mantenidos en fotoperiodo natural (Delgadillo *et al.*, 1992).

La aplicación de fotoperiodo artificial no tiene porque ser una práctica exclusiva en edificios cerrados. En animales alojados en edificios abiertos se pueden aplicar de dos a tres meses de días largos seguidos por implantes de melatonina (Delgadillo *et al.*, 2001; Gatica *et al.*, 2007a, b). De esta forma, en nuestras latitudes, un tratamiento de 3 meses de días largos, entre el mes de noviembre y enero, y a continuación la colocación de implante subcutáneo de melatonina en la base de la oreja se ha mostrado efectivo tanto en machos como con hembras. En cuanto a los machos, se logró un incremento en las concentraciones de testosterona por encima de los 5 pg/ml, considerados como línea base indicativa de actividad reproductiva, a los 21,5 ± 2,4 días de la colocación de los implantes (figura 3B), lo que demuestra la rápida respuesta de estos animales al tratamiento. Sin embargo, este tratamiento no estimuló a los machos que habían sido sometidos al fotoperiodo natural y no experimentaron durante el periodo de anestro estacionario ninguna modificación de sus concentraciones de testosterona. Cuando este mismo tratamiento fue aplicado a las hembras caprinas mediterráneas los resultados obtenidos fueron muy similares, de manera que la primera actividad ovárica se produjo el día 7 abril ± 2,4 días, manteniéndose esta actividad, en el anestro estacionario, durante 55,1 ± 5,9 días (figura 4). Este tratamiento provocó que el 94,1% de las cabras mostraran actividad ovárica y que el 88,2% manifestaran actividad estral. Sin embargo, de nuevo, ninguna de las cabras que no habían sido sometidas a dicho tratamiento experimentaron actividad ovárica o estral alguna. En el caso de los machos este tratamiento supuso un pequeño retraso en el inicio de la nueva época de actividad reproductiva de 52 días en relación con el lote no tratado. Estos hechos indican que, en nuestras latitudes, si se quiere tener una elevada efectividad a la hora de llevar a cabo cubriciones en primavera

utilizando este protocolo es necesaria su aplicación en ambos sexos y además llevando a cabo el tratamiento a todos los animales.

Otra manera de realizar este tipo de tratamientos fotoperiódicos en edificios abiertos sería sin la necesidad de utilizar implantes de melatonina; para ello, el tratamiento fotoperiódico debería hacerse lo suficientemente temprano como para que al final del tratamiento de días largos todavía queden días lo suficientemente cortos cómo para que sean adecuadamente interpretados por los animales (Delgadillo *et al.,* 2002). En nuestras latitudes y con caprinos mediterráneos el tratamiento con 3 meses de días largos, entre noviembre y enero y a continuación fotoperiodo natural, no se ha mostrado efectivo para inducir una adecuada actividad reproductiva en el periodo de anestro estacionario ni en los machos (Gatica *et al.*, 2008) ni en las hembras (Zarazaga *et al.*, 2008). En el caso de los machos se observó un incremento de las concentraciones de testosterona a los 17,6 ± 3,9 días tras el final del periodo de días largos (figura 3A) pero, sin embargo, la actividad reproductiva, medida como el porcentaje de machos que aceptaron eyacular, fue muy baja. En el caso de las hembras, sucedió algo similar puesto que sólo el 54% de las hembras mostraron actividad ovárica y sólo el 17% mostraron celo (figura 5). La efectividad de este tratamiento en las hembras es muy baja si se compara con los resultados obtenidos por otros autores; así este tratamiento permite en cabras, cuando es asociado a efecto macho, una fertilidad de un 76% (Chemineau *et al.*, 1998). De igual forma, este mismo protocolo utilizado en latitudes subtropicales permite incrementar la líbido y producción espermática de los machos tratados (Flores *et al.*, 2000; Delgadillo *et al.*, 2001). Los resultados encontrados por nuestro equipo indicarían, en el caso de los machos y en nuestras latitudes, que tal vez el momento de aplicación del tratamiento fotoperiódico habría que adaptarlo y llevarlo a cabo en otro momento del año, probablemente habría que iniciarlo antes para que finalizara en el momento en que los días naturales son más cortos y que la información fotoperiódica fuera interpretada mejor por parte de los animales. En el caso de las hembras, tal vez este tratamiento debería estar asociado a efecto macho para que su efectividad mejore, puesto que los resultados obtenidos fueron sin llevar a cabo efecto macho asociado.

Aplicación de implantes de melatonina

La utilización de melatonina exógena para el control de la reproducción en pequeños rumiantes se incrementó una vez que se demostró claramente su implicación en el control de la actividad reproductiva. De esta manera, se ensayaron diferentes vías de aplicación buscando siempre que las concentraciones de melatonina en sangre se incrementaran durante un periodo de tiempo relativamente largo. La vía definitiva fue la utilización de implantes subcutáneos que se aplican en la base de la oreja y que contienen 18 mg de melatonina; estos implantes inducen unos niveles plasmáticos de la hormona de 100 a 300 pg/ml durante unos 70 a 100 días. Este modo de aplicación hace que esta melatonina exógena proporcione una información fotoperiódica que es interpretada por los animales tratados como de días cortos (Malpaux *et al.*, 1997), siempre y cuando los animales hayan percibido un número suficiente de días largos o crecientes. Por ello, el momento de aplicación de los implantes de melatonina es uno de los puntos clave a la hora de analizar su efectividad. Estos días largos, previos al inicio del tratamiento, pueden ser provocados mediante el encendido de las luces durante el periodo del año en el que los días son más cortos, o mediante la estimulación de la fase fotosensible situada alrededor de 16 horas después del alba (figura 6, Chemineau *et al.*, 1992). Sin la utilización de fotoperiodo artificial adicional, la gran mayoría de los estudios, usando implantes de melatonina en la especie ovina, se han llevado a cabo iniciando el tratamiento en torno al solsticio de verano, si bien en nuestras latitudes la mayor efectividad se ha logrado colocándolos entorno al equinoccio de primavera (López e Inskeep, 1991). Cuando este protocolo de utilización se ha realizado en la especie caprina, los resultados han sido muy alentadores; cuando el implante de melatonina se ha colocado el 18 de marzo, en el caso de los machos, se logra un incremento de las concentraciones de testosterona a los 16,3 ± 1,5 días tras la colocación del implante de melatonina (figura 7), provocando un mayor volumen, concentración y producción espermática en el lote tratado frente al lote control

(Gatica *et al.*, 2006a). Cuando este tratamiento ha sido utilizado en las hembras sin llevar a cabo efecto macho, se ha iniciado la actividad ovárica el 18 abril ± 2,82 días, manteniéndose las concentraciones plasmáticas de progesterona elevadas, en pleno anestro estacionario, durante un periodo de 54 ± 4,95 días (figura 8). En este experimento el 100% de las hembras tratadas manifestaron actividad ovárica y el 85,7% actividad estral, sin embargo, ninguna de las cabras control, que no recibieron tratamiento con melatonina exógena pero que se encontraban en contacto con las cabras implantadas, presentaron manifestación de actividad reproductiva alguna durante el periodo de anestro estacionario (Gatica *et al.*, 2006b). Otro hecho destacable en este experimento es que, al no realizar efecto macho asociado, estos resultados indican que los implantes de melatonina por sí solos, colocados entorno al equinoccio de primavera, son capaces de estimular la actividad reproductiva en caprinos mediterráneos. Estos hechos se confirmaron puesto que, simultáneamente, se disponía de un lote de cabras ovariectomizadas, portadoras de un implante de estradiol, que también fueron implantadas con melatonina y que estuvieron aisladas de todo contacto con los machos. Estas cabras presentaron un aumento de las concentraciones plasmáticas de LH como el observado en las cabras enteras. Estos resultados contrastan con los observados en la especie ovina en los que la colocación de implante de melatonina en el mismo momento del anestro estacionario fue incapaz de desencadenar actividad hipofisaria (Forcada *et al.*, 2002), sugiriendo que la especie ovina y caprina manifiestan diferente sensibilidad al control de la reproducción por la melatonina.

4. Conclusiones.

Parece que en el caso de la especie caprina, en nuestras latitudes, la colocación de un implante de melatonina entorno al equinoccio de primavera es capaz por sí solo de desencadenar actividad reproductiva, hecho que no sucede en la especie ovina.

En nuestras latitudes, la utilización de un tratamiento de fotoperiodo artificial de días largos entre noviembre y enero y la colocación de implantes de melatonina a la finalización del tratamiento se han mostrado efectivos para desencadenar actividad reproductiva tanto en el macho como en la hembra. En este último caso, la separación entre machos y hembras no se haría necesaria, hecho que es muy importante en los sistemas de explotación caprina actuales en los que en muchos casos se dificulta dicha separación.

Sin embargo, la utilización única y exclusiva de fotoperiodo de días largos entre el mes de noviembre y enero, y a continuación que los animales experimenten el fotoperiodo natural, muestra una baja efectividad tanto en los machos como en las hembras. No obstante, en latitudes más bajas este tratamiento ha mostrado una elevada efectividad sobre todo cuando se ha usado en los machos cabríos. En cuanto a la utilización de este tratamiento en las hembras tal vez en nuestras latitudes y con nuestras razas sea necesaria la utilización de efecto macho asociado para lograr una mejora de su efectividad.

Bibliografía

Aguilar, J., De La Torre, S., Duarte, G., Malpaux, B., Delgadillo, J.A., 2001. Las hembras caprinas del subtrópico mexicano manifiestan un ritmo endógeno de reproducción. XLIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Agosto 26-30, Monterrey, Nuevo León, México, O27.

Bittman, E.L., Dempsey, R.J., Karsch, F.J., 1983. Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. Endocrinology 113:2276-2283.

Chemineau, P., Malpaux, B., Guérin, Y., Maurice, F., Daveau, A., Pelletier, J., 1992. Lumière et mélatonine pour la maîtrise de la reproduction des ovins et des caprins. Annales de Zootechnie, 41:247-261.

Chemineau, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A., 1998. Photopériodisme et reproduction chez les caprins. Colloque "Reproduction caprine: nouveaux contextes, derniers acquis", Niort 30 avril, Chambre d'Agriculture des Deux Sèvres, C 1, 21 pp.

Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P., 1992. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. Small Ruminant Research, 9:47-59

Delgadillo, J.A., Carrillo, E., Moran, 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 J.A., Flores, J.A., Veliz, F.G., Hernandez, H.F., Duarte, G., Vielma, J., Poindron, P., Chemineau, P., Malpaux, B., 2002. Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificial long days. Journal of Animal Science, 80:2780-2786.

Forcada, F., Abecia, J.A., Zúñiga, O., Lozano, J.M., 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.

Flores, J.A., Veliz, F.G., Perez-Villanueva, J.A., Martinez de la Escalera, G., EREZ- Poindron, P., Chemineau, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A., 2000. Male reproductive condition is the limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anestrus in female goats. Biology of Reproduction, 62:1409-1414

Gatica, M.C., Guzmán, J.L., Martín, S., Martino, A., Vilar, P., Zarazaga L.A., 2006a. Short term effect of melatonin implants on sperm parameters in Mediterranean goat males. Reproduction in Domestic Animals, 41:107

Gatica, M.C., Guzmán, J.L., Farauste, R., Ijano, L., Martín, S., Martino, A., Zarazaga L.A., 2006b. Short term effect of melatonin implants on sexual activity in Mediterranean goat does without male effect. Reproduction in Domestic Animals, 41:107.

Gatica, M.C., Guzmán, J.L., Martin, S., Zarazaga L.A., 2007a. Effect of exogenous melatonin associated with artificial long days on sexual activity in Mediterranean goat does without male effect. Reproduction in Domestic Animals, 42:138.

Gatica, M.C., Guzmán, J.L., Martino, A., Zarazaga L.A., 2007b. Effect of exogenous melatonin associated with artificial long days on sexual activity in Mediterranean goat does without male effect. Reproduction in Domestic Animals, 42:96.

Gatica, M.C., Guzmán, J.L., Celi, I., Zarazaga L.A., 2008. The use of artificial long days is not effective to enhance reproductive activity but increases sperm production in Mediterranean bucks. Reproduction in Domestic Animals, 43:78.

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.

Karsch, F.J., Robinson, J.E., Woodfill, C.J.I., Brown, M.B., 1989. Circannual cycles of luteinizing hormone and prolactin secretion in ewes during prolonged exposure to a fixed photoperiod: evidence for an endogenous reproductive rhythm. Biology of Reproduction, 41:1034-1046.

Legros, C., Chalivoix, S., Gabriel, C., Mocaer, E., Delagrange, P., Fuchs, E., Malpaux, B., 2007. First evidence of melatonin receptors distribution in the suprachiasmatic nucleus of tree shrew brain Neuroendocrinology Letters, 28:267-273.

López, A., Inskeep, E.K., 1991. Response of ewes of Mediterranean sheep breeds to subcutaneous implants of melatonin. Livestock Production Science, 27:177-184.

Migaud, M., Daveau, A., Malpaux, B., 2005. MTNR1A melatonin receptors in the ovine premammillary hypothalamus: day–night variation in the expression of the transcripts. Biology of Reproduction, 72:393–398.

Mailliet, F., Audinot, V., Malpaux, B., Bonnaud, A., Delagrange, P., Migaud, M., Barrett, P., Viaud-Massuard M.-C., Lesieur, D., Lefoulon, F., Renard, P., Boutin, J.A., 2004. Molecular pharmacology of the ovine melatonin receptor: comparison with recombinant human MT1 and MT2 receptors. Biochemical Pharmacology, 67:667–677.

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

Malpaux, B., 2001. Environnement et rythmes de reproduction. La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme. C. Thibault an td M.-C. Levasseur, Ellipse Editions- INRA Editions: 699-724.

Ortavant, R., Pelletier, J., Ravault, J.P., Thimonier, J. and Volland-Nail, P., 1985. Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm animals. In: Oxford Reviews of Reproductive Biology, Clarendon Press, Oxford, Vol. 7, pp. 305-345.

Pelletier, J., Almeida, G., 1987. Short light cycles induce persistent reproductive activity in Ile-de-France rams. Journal of Reproduction and Fertility, Suppl. 34:215-226

Tamarkin, L., Baird, C.J., Almeida, O.F.X. 1985. Melatonin: A coordinating signal for mammalian reproduction? Science, 227:714-720.

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

Viguié, C., Caraty, A., Locatelli, A., Malpaux, B., 1995. 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.

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. Animal Reproduction Science, 87:253–67.

Zarazaga, L.A., Gatica, M.C., Guzmán, J.L., Celi, I., 2008. The use of artificial long days is not effective to induce reproductive activity in Mediterranean goat does without isolation from males. Reproduction in Domestic Animals, 43:89.

Zarazaga, L.A., Guzmán, J.L., Domínguez, C., Pérez, M.C., Prieto, R., 2009a. Effects of season and feeding level on reproductive activity and semen quality in Payoya buck goats. Theriogenology, 71:1316-1325.

Zarazaga, L.A., Celi, I., Guzmán, J.L., Malpaux, B., 2009b. Nutritional and neuroendocrinological involvement in the control of luteinizing hormone secretion of Mediterranean goats females during the onset of the seasonal anoestrous season. Congress of the European Association of the Animal Production, Barcelona 2009.

Zarazaga, L.A., Celi, I., Guzmán, J.L., Malpaux, B., 2009c. Nutritional and neuroendocrinological involvement in the control of luteinizing hormone secretion of Mediterranean goats females during the seasonal anoestrous. Congress of the European Association of the Animal Production, Barcelona 2009.

Zarazaga, L.A., Celi, I., Guzmán, J.L., Malpaux, B., 2009d. Nutritional and neuroendocrinological involvement in the control of luteinizing hormone secretion of Mediterranean goats females during the onset of the breeding season. Congress of the European Association of the Animal Production, Barcelona 2009.

Figura 1: Evolución de la actividad reproductiva a lo largo del año de diferentes especies estacionales. La época de cubriciones de cada una se indica mediante rectángulos blancos y la época de partos mediante rectángulos de color negro. Adaptado de Ortavant *et al*. (1985).

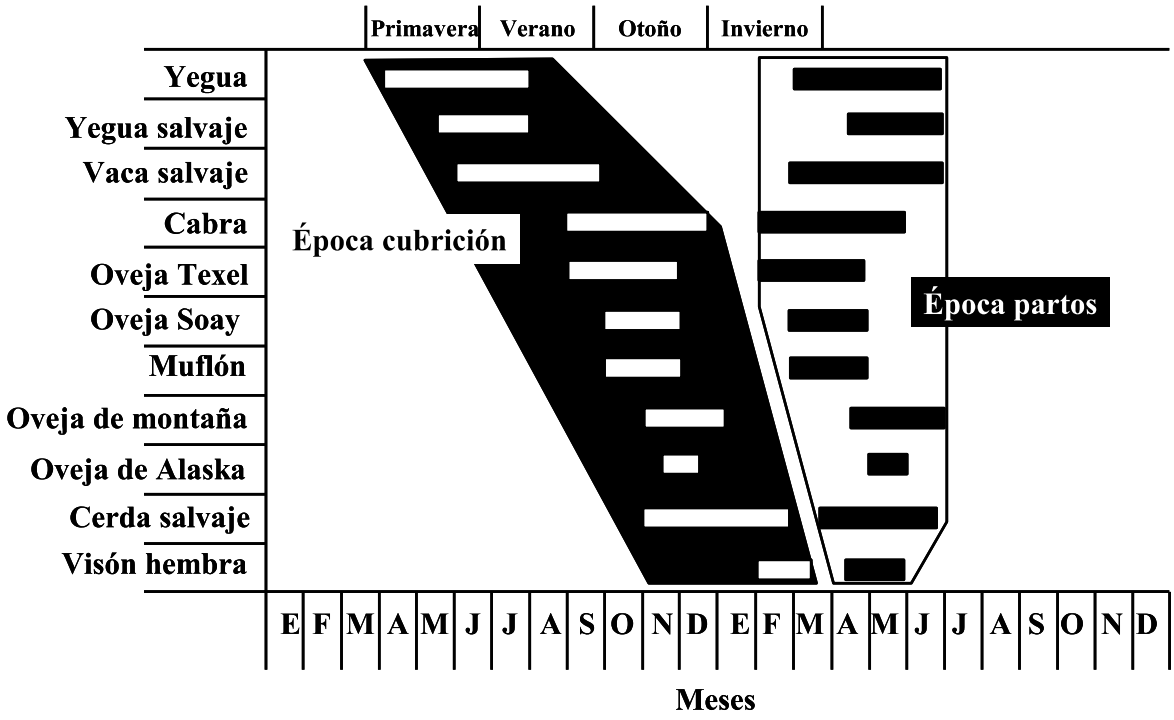


Figura 2: Evolución de las concentraciones plasmáticas de melatonina en machos cabríos sometidos a fotoperiodo natural de días cortos o a fotoperiodo artificial de días largos (16 horas de luz: 8 de oscuridad). El periodo de oscuridad se indica mediante un rectángulo gris. Adaptado de Delgadillo *et al*. (2001).

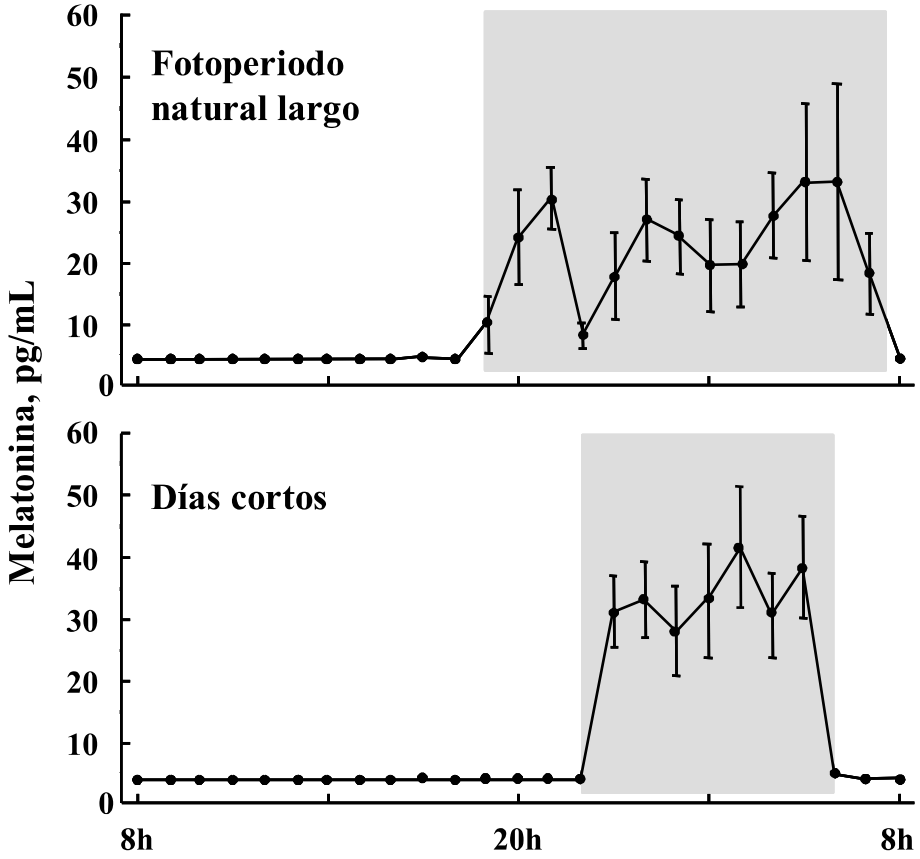


Figura 3: Evolución de las concentraciones plasmáticas de testosterona en machos cabríos sometidos a fotoperiodo natural (grupo control, ●) o tratados con 99 días largos entre el 14 de noviembre y el 20 de febrero (grupo LD, ■) (3A) y en este momento se les colocan 3 implantes subcutáneos de melatonina (grupo LD-M, ◊) (3B). En gris se indica el periodo de tiempo durante el cual se llevó a cabo el tratamiento fotoperiódico con días largos (Zarazaga *et al.,* resultados no publicados).

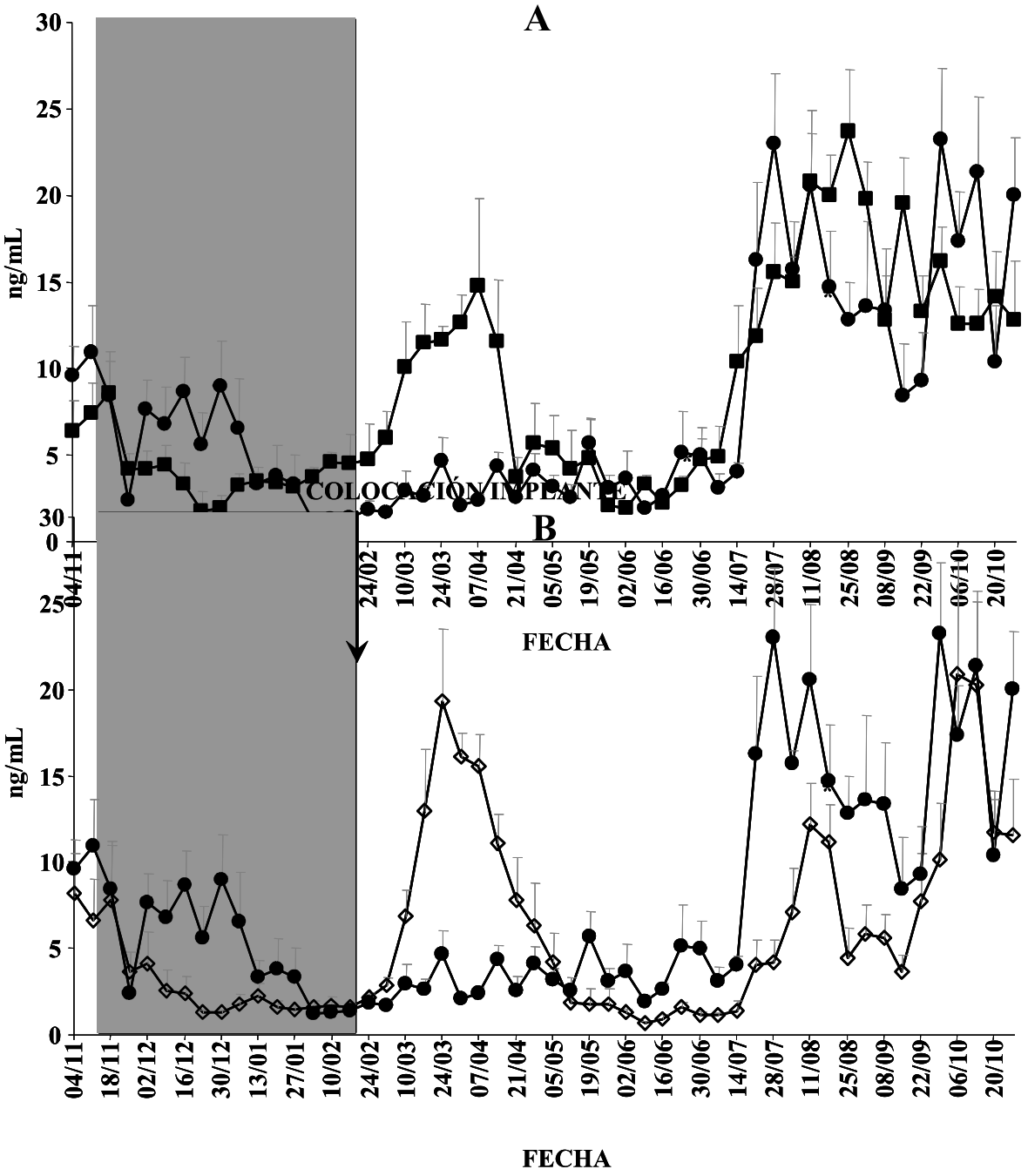


Figura 4: Evolución semanal (± S.E.M.) de las concentraciones plasmáticas de progesterona (ng/mL) de cabras sometidas a fotoperiodo natural (grupo control, □) o tratadas con 99 días largos, entre el 14 de noviembre y el 20 de febrero (grupo LD-M, ♦), y concentraciones de LH (ng/mL) en cabras ovariectomizadas y portadoras de un implante de estradiol que habían sido tratadas con 99 días largos, entre el 14 de noviembre y el 20 de febrero, tratadas con un implante de melatonina (grupo OVX, △). En gris se indica el periodo de tiempo durante el cual se llevó a cabo el tratamiento fotoperiódico con días largos (Zarazaga *et al.,* resultados no publicados).

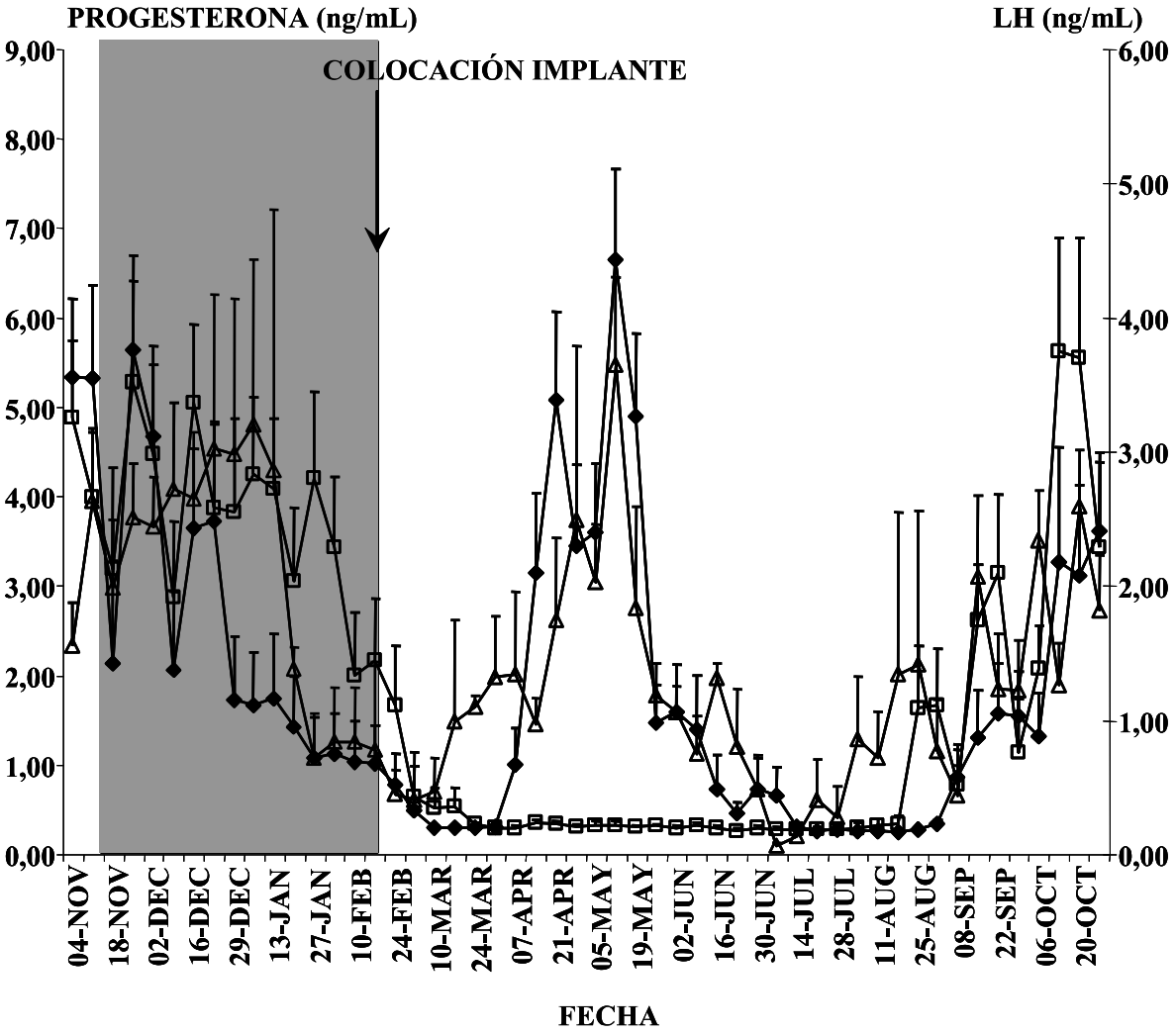


Figura 5: Evolución de las concentraciones plasmáticas de progesterona en hembras caprinas sometidas a fotoperiodo natural (grupo control, ▲) o tratadas con 80 días largos, entre el 17 de noviembre y el 5 de febrero (grupo LD, ■). En gris se indica el periodo de tiempo durante el cual se llevó a cabo el tratamiento fotoperiódico con días largos (Zarazaga *et al.,* resultados no publicados).

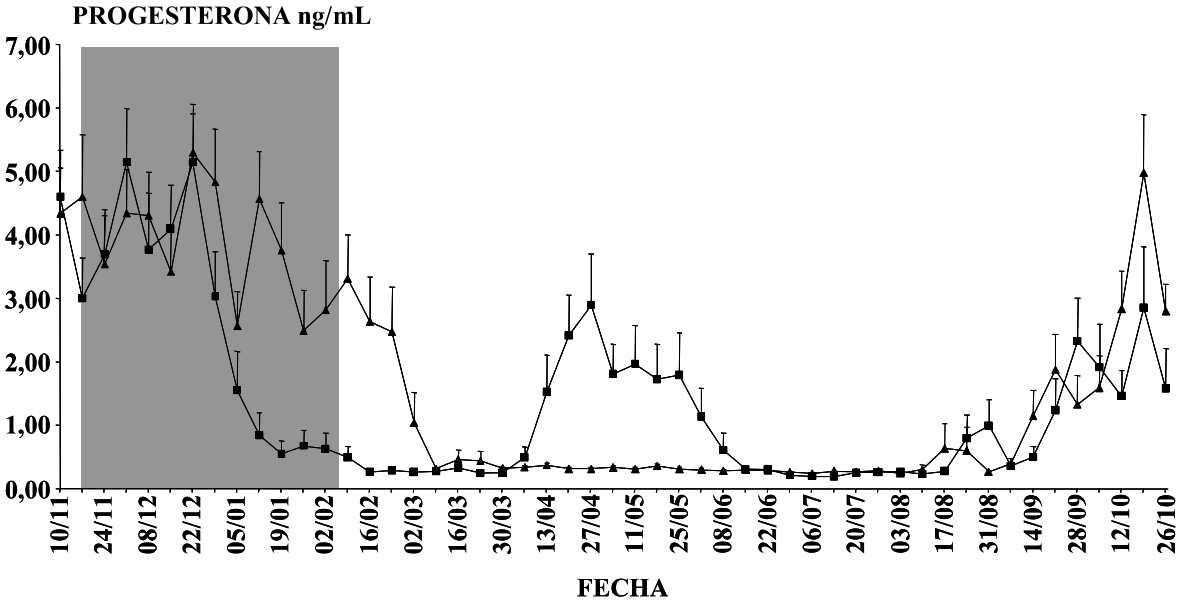


Figura 6: Tratamientos fotoperiódicos para controlar la actividad sexual de los pequeños rumiantes en edificios cerrados o abiertos. Adaptado de Chemineau *et al*. (1992).

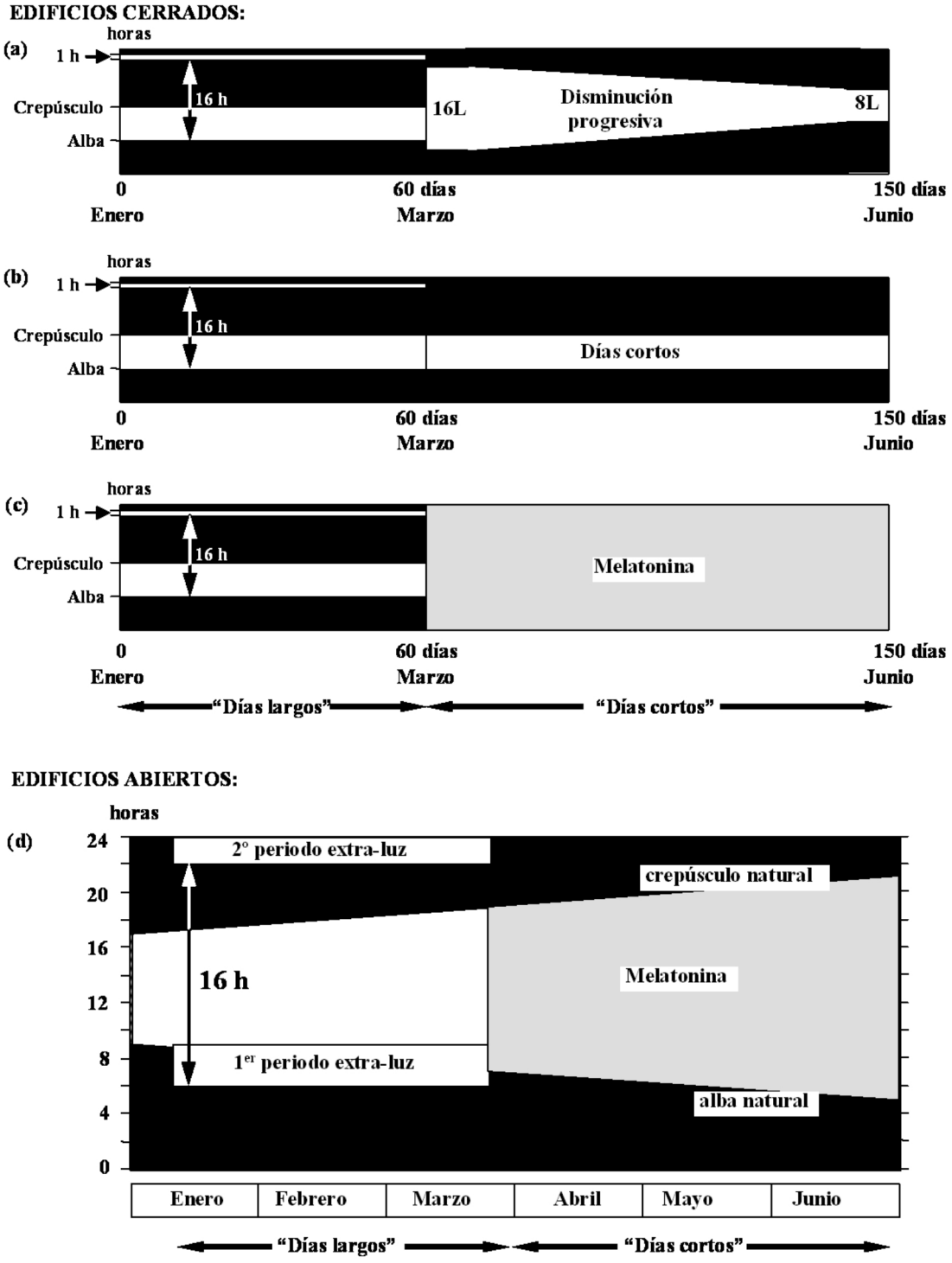


Figura 7: Evolución de las concentraciones plasmáticas de testosterona en machos cabríos sometidos a fotoperiodo natural (grupo control, ●) o tratados con 3 implantes subcutáneos de melatonina el 18 de marzo (grupo tratado con melatonina, △) (Zarazaga *et al.,* resultados no publicados).

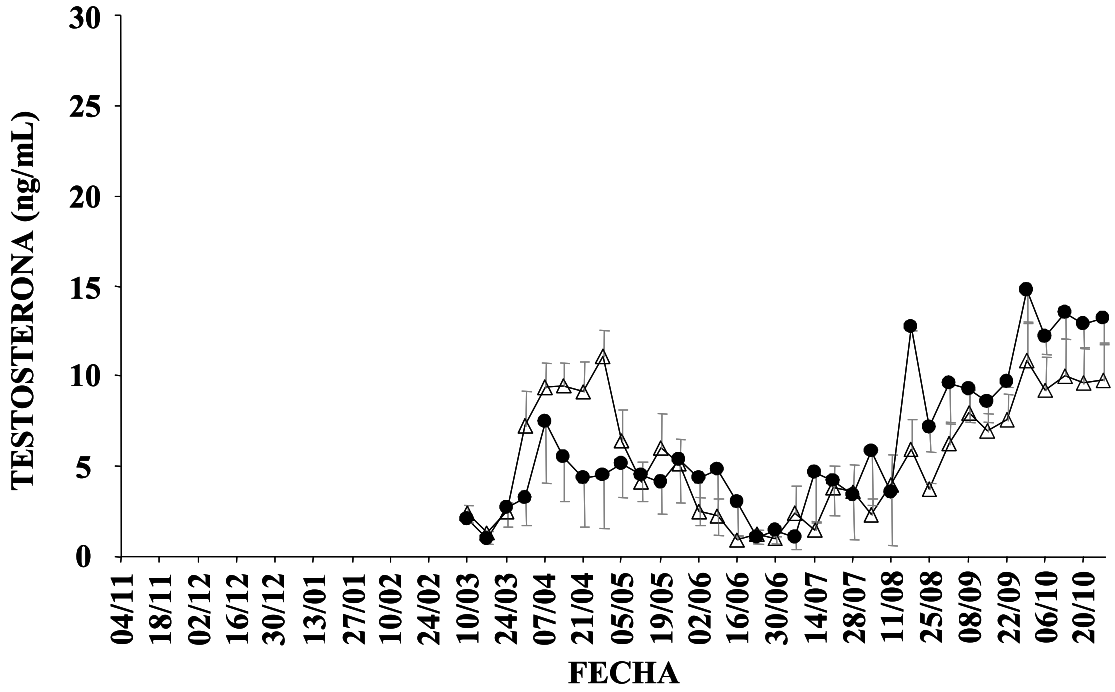
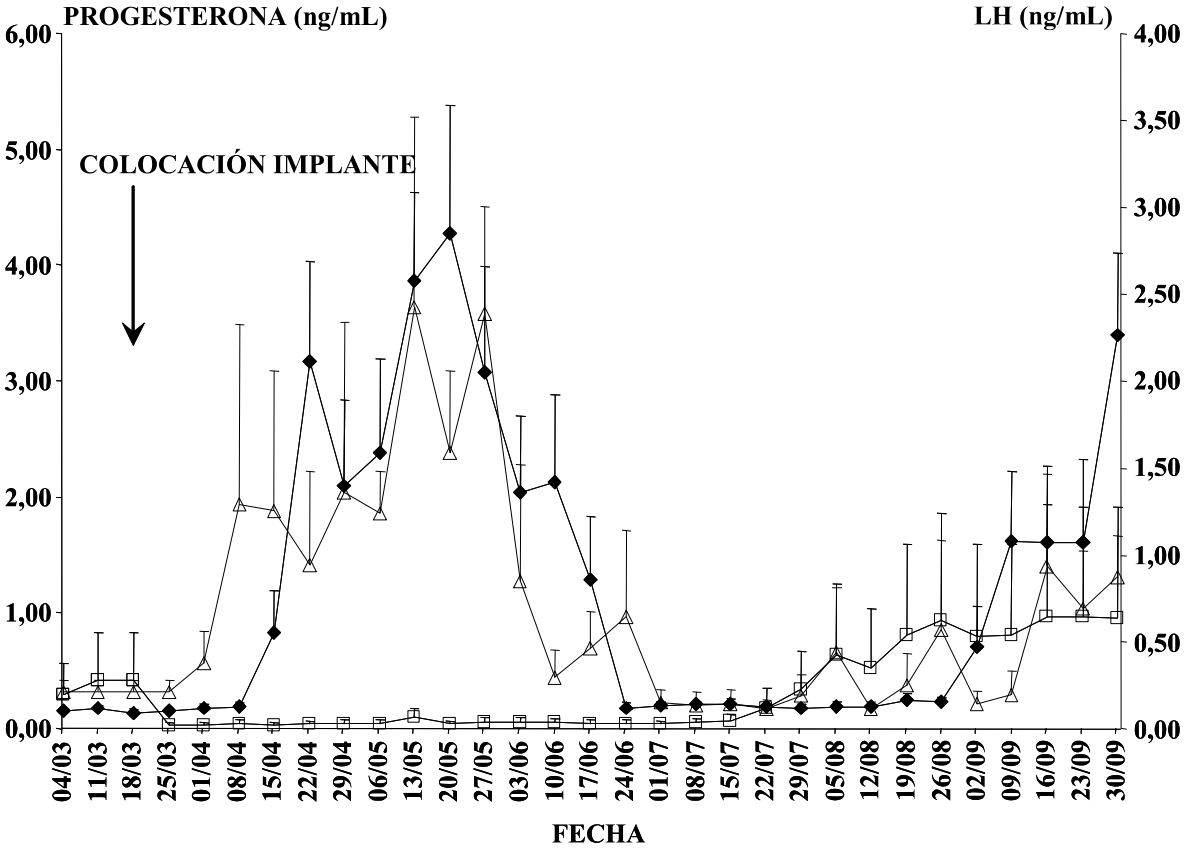


Figura 8: Evolución semanal (± S.E.M.) de las concentraciones plasmáticas de progesterona (ng/mL) de cabras sometidas a fotoperiodo natural (grupo control, □) o tratadas con implante de melatonina el 18 de marzo (grupo M, ◆) y concentraciones de LH (ng/mL) en cabras ovariectomizadas y portadoras de un implante de estradiol que habían sido implantadas con un implante de melatonina el 18 de marzo (grupo OVX, △) (Zarazaga *et al.,* resultados no publicados).



Comunicación 13: Se corresponde con el objetivo 4:

Tipo: Póster

El efecto raza en el uso de implantes de melatonina en caprinos Mediterráneos.

Breed effect on the use of melatonin implants in Mediterranean goats.

María Carolina Gatica, José Luis Guzmán, Irma Celi, Benoît Malpaux, Luis Ángel Zarazaga.

En Actas de la X conferencia Internacional sobre Caprinos de la International Goat Association. 2010, Recife, Brasil

Breed and protocol effect on the use of melatonin implants in Mediterranean goats.

Gatica, M.C.[2,1], Guzman, J.L.[1], Celi, I.[1], Malpaux, B.[3], Zarazaga, L.A.[1]
1. UHU, Universidad de Huelva. 2. UNAP, Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile.. 3. INRA, P.C.R.INRA, Nouzilly, France.
carolina.gaticajorquera@gmail.com

Abstract / **Resumo:**

The aim of this work was to determine the effectiveness (fertility) of exogenous melatonin depends on the used breed or the used protocol. Two farms located in the same latitude at a distance of two kilometre housing Murciano-Granadina (N=534 females) or Payoya (N=535 females) goat breeds were used. Animals for each breed were distributed at random depending on the use of exogenous melatonin or not. Exogenous melatonin (Melovine®) was implanted around the spring equinox. After the implant insertion, isolation during 45 days between males and females was performed to induce a male effect. For each breed, the used protocols were: males and females implanted with melatonin, females without melatonin breed with males implanted with melatonin and females implanted with melatonin breed with males without melatonin. When both gender and only males were implanted, melatonin implant was more effective in Murciano-Granadina breed ($P < 0.01$). When only females were implanted no differences between breeds were observed. The higher fertility was observed when both gender and only females were implanted with melatonin (at least, $P < 0.05$) in comparison with the only buck implantation. These results demonstrate that the effectiveness of exogenous melatonin depends on the used breed and the used protocol. Supported by Grant PETRI 95-0964.OP.

10th International Conference on Goats:
"Technological development and associative attempts to a sustainable small livestock production"
Recife, Brasil, September 19 – 23, 2010

BREED EFFECT ON THE USE OF MELATONIN IMPLANTS IN MEDITERRANEAN GOATS

Gatica, M.C.[1], Guzmán, J.L.[2], Celi, I.[2], Malpaux, B.[3], Zarazaga L.A.[2]
[1]Departamento de Agricultura del Desierto, Universidad Arturo Prat, Av. Arturo Prat 2120, Iquique, Chile. zarazaga@uhu.es, [2]Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819 Palos de la Frontera, Huelva, Spain, [3]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.

INTRODUCTION

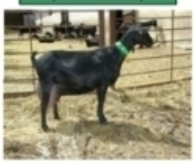
- Productivity in farm species, especially sheep, is limited by seasonality, which in turn is regulated by photoperiod.
- Subcutaneous implants of this hormone were designed as a means of inducing artificial control of oestrous activity in goats.
- In Mediterranean sheep has been reported differences in the efficacy of melatonin implants depending of the breed.
- Commercially is recommended to insert melatonin implants to both gender, but no data exits about the reproductive performances obtained depending witch gender is implanted in Mediterranean goats.

AIMS

- After 10 years of commercializing melatonin implants in Spain in ewes and 1 year in goats. The objective of this work was to determine the efficacy of melatonin implants at commercial level by inserting the implants around the spring equinox to improve the reproductive performances of two breeds of goats and the used protocol for each gender.

MATERIAL AND METHODS

Murciano-Granadina (N=534 females)



Payoya (N=535 females)

Distance between farms: 2 KM

Exogenous melatonin (Melovine®) was implanted around the spring equinox.

Isolation during 45 days between males and females

MALE EFFECT

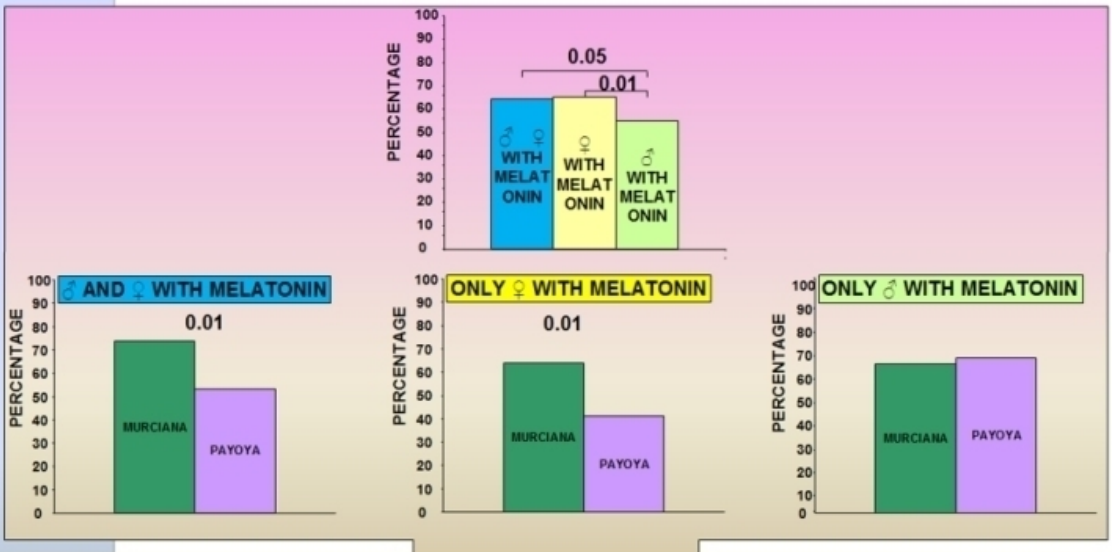
For each breed

Protocol 1: Males and females implanted with melatonin.

Protocol 2: Females without melatonin and used males implanted with melatonin.

Protocol 3: Female implanted with melatonin and used males without melatonin.

RESULTS



CONCLUSIONS

These results demonstrate that the efficacy of exogenous melatonin depends on the used breed and the used protocol.

ACKNOWLEDGEMENTS

Research supported by Grant PETRI 95-0964. OP.. The authors are grateful to CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain, for providing Melovine® implants