

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA**

Subdirección de Posgrado



**EFFECTO DE TESTOSTERONA EXÓGENA SOBRE EL COMPORTAMIENTO  
SEXUAL DE MACHOS CABRÍOS Y LA EVALUACIÓN DEL EFECTO MACHO  
SOBRE LA RESPUESTA REPRODUCTIVA DE CABRAS EN ANESTRO**

Por:

**OSCAR ÁNGEL GARCÍA**

**TESIS**

Presentada como requisito parcial  
para optar al grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS  
EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA**

Torreón, Coahuila, México

Octubre de 2014

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA**

Subdirección de Posgrado



**TESIS**

**EFFECTO DE TESTOSTERONA EXÓGENA SOBRE EL COMPORTAMIENTO  
SEXUAL DE MACHOS CABRÍOS Y LA EVALUACIÓN DEL EFECTO MACHO  
SOBRE LA RESPUESTA REPRODUCTIVA DE CABRAS EN ANESTRO**

Por:

**OSCAR ÁNGEL GARCÍA**

Director:



---

**DR. FRANCISCO GERARDO VÉLIZ DERAS**

Torreón, Coahuila, México

Octubre de 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA

Subdirección de Posgrado

EFFECTO DE TESTOSTERONA EXÓGENA SOBRE EL COMPORTAMIENTO  
SEXUAL DE MACHOS CABRÍOS Y LA EVALUACIÓN DEL EFECTO MACHO  
SOBRE LA RESPUESTA REPRODUCTIVA DE CABRAS EN ANESTRO

TESIS

OSCAR ÁNGEL GARCÍA

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada  
como requisito parcial para optar al grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Comité particular de asesoría:

Director

  
Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras

Co-director

  
Dr. César Alberto Meza Herrera

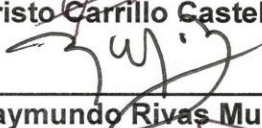
Asesor

  
Dr. Miguel Ángel Mellado Bosque

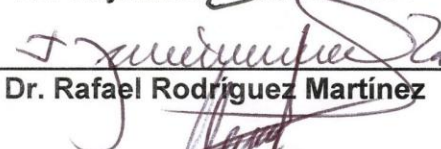
Asesor

  
Dr. Evaristo Carrillo Castellanos


Asesor

  
Dr. Raymundo Rivas Muñoz

Asesor

  
Dr. Rafael Rodríguez Martínez

Subdirector de Posgrado

  
Dr. Fernando Ruiz Zarate

Jefe de Dpto. Posgrado

  
Dr. Pedro Antonio Robles Trillo

Torreón, Coahuila, México

Octubre de 2014

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, Adán Ángel Chávez y Gaudencia García Venancio*

*A mis hermanos y sus familias Benjamin, Olíver, Alcibiades, Erubiel*

*A mi hermana Yesenia*

*Gracias por darme ese gran apoyo y comprensión por reanimarme siempre en el transcurso de la realización de mis estudios de posgrado, sus consejos brindados que me impulsaron a salir a delante durante todo este tiempo de mi formación profesional.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A dios, por permitirme llegar hasta aquí, y por llenar mi camino de bendiciones*

*A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; mi Alma Terra Mater, por recibirme y acogerme por tercera vez, y por ofrecerme la oportunidad de continuar con mi superación académica, así alcanzar esta meta.*

*Dr. Francisco Gerardo Veliz Deras, por fungir como director de tesis, por todas sus enseñanzas de investigación y por la confianza depositada en mí en sus trabajos realizados.*

*Ph.D. Cesar A. Meza Herrera, por el gran apoyo que me brindó y asesoría en este proyecto.*

*Dr. Miguel A. Mellado Bosque, por su gran apoyo y asesoría en la realización de este proyecto de investigación.*

*Dr. Rafael Rodríguez Martínez, por su asesoría brindada en la elaboración de esta tesis.*

*Dr. Pedro Antonio Robles Trillo, Dra. Ma. De los Angeles de Santiago Miramontes, por su asistencia, amistad y confianza brindada a lo largo de esta etapa.*

*M.C Ma. Guadalupe Calderón Leyva, por su gran apoyo, dedicación y tiempo que brindó en la elaboración y culminación del presente proyecto, y por estar conmigo en todo momento.*

*M.C. Luz María Tejada Ugarte, M.C Aracely Zuñiga Serrano, Dra. Leticia R. Gaytán Alemán, gracias por todos consejos por reanimarme e impulsarme a salir adelante.*

*M.C Viridiana Contreras Villarreal, por su apoyo y colaboración en la culminación de este proyecto.*

*A mis hermanos, por darme todo su apoyo y comprensión en el transcurso de la realización de este trabajo.*

*Al CONACYT por otórgame el apoyo económico para continuar con mi superación académica.*

*Sr. Pablo Cervera y familia, por facilitar animales e instalaciones donde se llevó a cabo este trabajo.*

*A todos aquellos que participaron en este trabajo de investigación, el no mencionarlos específicamente no significa que dejen de formar parte de mis experiencias vividas en todo este tiempo.*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS .....</b>	<b>vi</b>
<b>CUADRO DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>I. COMPENDIO .....</b>	<b>x</b>
<b>II. ABSTRACT .....</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>3</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
<b>4. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
4.1. Control endocrino de la reproducción.....	4
4.2. Estacionalidad reproductiva .....	8
4.2.1. Control endocrino de la estacionalidad .....	9
4.2.2. Kisspeptina y estacionalidad sobre la reproducción .....	17
4.2.3. Otros factores que afectan la estacionalidad.....	20
4.3. Reproducción en diferentes condiciones ambientales .....	26
4.3.1. Reproducción en zonas templadas.....	26
4.3.2. Reproducción en zonas subtropicales .....	28
4.3.3. Reproducción en zonas tropicales.....	32
4.3.4. Efecto de cambio de zonas ambientales en la reproducción .....	35
4.4. Inducción de la actividad reproductiva .....	36
4.4.1. Tratamientos fotoperiódicos.....	37
4.4.2. Tratamientos hormonales.....	39
4.4.3. Bioestimulación sexual .....	39
Artículo I .....	43
Seminal characteristics, libido and serum testosterone concentrations in mixed-breed goat bucks receiving testosterone during the non-breeding period.....	43
Artículo II .....	59
Effect of testosterone administration and different male-to-female ratios upon the male sexual behavior and the out-of-season reproductive response of anestrus goats ..	59
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>89</b>
<b>6. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>90</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

No.	TITULO DE FIGURAS	PÁG.
1	Detección del fotoperiodo	12
2	Interrelaciones en el control de la reproducción en el macho	14
3	Representación esquemática del control neuroendocrino de la actividad reproductiva estacional en cabras y ovejas	16
4	Efecto sobre el peso vivo, peso testicular, y concentración promedio de LH y T en machos cabríos adultos alimentados a voluntad con dietas de alta o baja calidad en el este subtropical de Australia	24
5	Esquema de los ciclos anuales en fotoperiodo y disponibilidad de pastura en regiones mediterráneas y subtropicales	29
6	Cambios en peso vivo, peso testicular y concentración plasmática de LH y testosterona en machos caprinos salvajes en pastura subtropical del este de Australia (29°S, 153°E)	30
7	Variación estacional de la ocurrencia de ovulación y el comportamiento estral en la oveja Ile-de-France (b) de la producción espermática y el peso testicular en borregos Ile-de-France	33
8	Diámetro testicular, comportamiento sexual y fertilidad del macho cabrío Criollo adulto	35
9	Representación esquemática de la asociación de descargas de la unidad de actividad múltiple (MUA) con la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) sobre pulsos de la hormona luteinizante (LH)	41
No.	TITULO DE CUADROS	PAG.
1	Características del semen y la variación estacional de machos cabríos nativos de Corea	32

### CUADRO DE ABREVIATURAS

<b>ABREVIATURA</b>	<b>ESPAÑOL</b>	<b>INGLÉS</b>
<b>%</b>	Porcentaje	Percentage
<b>°C</b>	Grados Celsius	Celsius degrees
<b>°N</b>	Grados Norte	North grades
<b>ASB</b>	Comportamiento sexual apetitivo	Appetitive sexual behavior
<b>BCS</b>	Condición corporal	Body condition score
<b>GC</b>	Grupo Control	Control group
<b>CCTV</b>	Circuito cerrado de televisión	Closed-circuit television
<b>cm</b>	Centímetro	Centimeter
<b>CP</b>	Proteína cruda	Crude protein
<b>CSA</b>	Comportamiento sexual apetitivo	Appetitive sexual behavior
<b>d</b>	Día	Day
<b>DM</b>	Materia seca	Dry matter
<b>DVR</b>	Grabador de video digital	Digital video recorder
<b>EHH</b>	Eje hipotálamo-hipófisis	Hypothalamus-hipofisis-axis
<b>Fig.</b>	Figura	Figure
<b>FSH</b>	Hormona folículo estimulante	Follicle-stimulating hormone
<b>g</b>	Gramo	Gram
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotropinas	Gonadotropin-releasing hormone
<b>Gα</b>	Proteínas G alfa especifica	Alfa G specific protein
<b>h</b>	Hora	Hour



<b>HHG</b>	Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal	Hypothalamic-pituitary-gonadal axis
<b>HMFR</b>	Proporción macho-hembra alta	High male:female ratio
<b>HMFR+T</b>	Proporción macho-hembra alto más testosterona	Testosterone-High male-to-female ratios
<b>IGF-I</b>	Factor de crecimiento asociado a insulina tipo 1	Insulin-like growth factor-1
<b>IM</b>	Intramuscular	Intramuscular
<b>ITH</b>	Índice temperatura y humedad	Temperature and humidity index
<b>Kg</b>	Kilogramo	Kilogram
<b>Kiss1</b>	Gen Kisspeptina 1	Kisspeptin gen type 1
<b>Kp</b>	Kispeptina	Kisspeptine
<b>LH</b>	Hormona luteinizante	Luteinizing hormone
<b>LMFR</b>	Proporción macho-hembra baja	Low male:female ratio
<b>LMFR+T</b>	Proporción macho-hembra bajo más testosterona	Testosterone-Low male-to-female ratios
<b>m</b>	Metros	Meters
<b>MCal</b>	Megacalorías	Megacalories
<b>ME</b>	Energía metabolizable	Metabolizable energy
<b>MFR</b>	Proporción macho-hembra	Male-female ratio
<b>mg</b>	Miligramo	Milligram
<b>MHz</b>	Megahercio	Megahertz
<b>Mj</b>	Megajoule	Megajoule
<b>ml</b>	Mililitro	Milliliters
<b>mm</b>	Milímetros	Millimeter
<b>MNTT</b>	Machos no tratados con testosterona	Non-testosterone treated bucks

<b>MT1</b>	Receptor tipo 1 de melatonina	Melatonin receptor type 1A
<b>MTT</b>	Machos tratados con testosterona	Testosterone- treated bucks
<b>MUA</b>	Unidad de actividad múltiple	Multiple-unit activity
<b>n</b>	Número	Number
<b>ARC</b>	Núcleo arqueado	Arcuate nucleus
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio	Sodium Chlorure
<b>ng</b>	Nanogramo	Nanogram
<b>NPY</b>	Neuropéptido Y	Neuropeptide-Y
<b>NRC</b>	Consejo Nacional de Investigación	National Research Council
<b>NTTB</b>	Machos no tratados con testosterona	Non-testosterone treated bucks
<b>P</b>	Probabilidad	Probability
<b>PMH</b>	Secreción pineal de melatonina	Pineal melatonin secretion
<b>s</b>	Segundo	Second
<b>SD</b>	Desviación estándar	Standard deviation
<b>GT</b>	Grupo tratado	Treated group
<b>T</b>	Testosterona	Testosterone
<b>THI</b>	Índice temperatura y humedad	Temperature humidity index
<b>TTB</b>	Machos tratados con testosterona	Testosterone- treated bucks
<b>TV</b>	Televisión	Television
<b>V1Rs</b>	Receptor vomeronasal-1	Vomeronasal Receptor-1
<b>V2Rs</b>	Receptor vomeronasal-2	Vomeronasal receptor-2
<b>w</b>	Semana	Week

## **I. COMPENDIO**

# **EFFECTO DE TESTOSTERONA EXÓGENA SOBRE EL COMPORTAMIENTO SEXUAL DE MACHOS CABRÍOS Y LA EVALUACIÓN DEL EFECTO MACHO SOBRE LA RESPUESTA REPRODUCTIVA DE CABRAS EN ANESTRO**

## **TESIS**

**Oscar Ángel García**

**Presentada como requisito parcial para optar al grado de:**

**DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA**

**Director:**

**Dr. Francisco Gerardo Veliz Deras**

En el presente estudio se evaluó el efecto de la administración de testosterona exógena sobre el comportamiento sexual de machos cabríos en reposo sexual a través del efecto macho con diferentes proporciones macho-hembra, la relación del comportamiento con el índice temperatura humedad (ITH) y la respuesta sexual de hembras en anestro estacional expuestas a estos machos durante 24 h, además del efecto de la testosterona sobre las células de Sertolí y las características seminales y niveles de testosterona en sangre. En un primer estudio, se utilizaron 12 machos divididos en dos grupos 1): Grupo control (GC; n=6) tratado con solución salina fisiológica, 2). Grupo tratado (GT; n=6) tratado con 25 mg de testosterona vía IM; ambos grupos fueron tratados cada tercer día durante tres semanas. Al final de los tratamientos se realizó una prueba de comportamiento sexual, la cual consistió en exponer cada macho a una hembra estrogenizada durante 15 minutos. El semen se colectó con una vagina artificial y se midió la latencia al eyaculado, así como la calidad del semen mediante el volumen de eyaculado y la concentración, viabilidad y motilidad espermática, además se tomaron biopsias testiculares para medir el número de células de Sertoli. También se colectaron muestras de sangre por punción yugular durante 4 semanas para determinar la concentración de testosterona en sangre. La latencia al eyaculado fue mayor en el GT con respecto al GC ( $96.0 \pm 45$  s vs  $25.0 \pm 44$  s;  $P < 0.05$ ), así como el volumen de semen ( $1.2 \pm 0.5$  vs.  $0.3 \pm 0.03$  ml;  $P < 0.05$ ) y el total de células espermáticas

por eyaculado ( $1.32 \pm 0.7$  vs  $0.33 \pm 0.02 \times 10^9$ ;  $P < 0.05$ ). La intensidad del olor en escala del 1-5 fue más alto en el GT con respecto al GC ( $1.8 \pm 0.1$  vs  $0.6 \pm 0.2$ ;  $P < 0.05$ ) y los niveles de testosterona en suero sanguíneo (8 ng/ml vs 2 ng/ml). En un segundo estudio se utilizaron 8 machos divididos en dos grupos: 1). Machos tratados con testosterona (MTT;  $n=4$ ; 25 mg de testosterona IM), y 2). Machos no tratados con testosterona (MNTT;  $n=4$ ; 1 ml, de solución salina IM); ambos grupos se trataron cada tercer día durante tres semanas. Al final del tratamiento se realizó una prueba de comportamiento sexual: comportamiento sexual apetitivo (CSA) y comportamiento sexual consumatorio (CSC) exponiendo cada macho a una hembra durante 1 h por dos días. Posteriormente estos machos fueron expuestos a 60 hembras anovulatorias divididas en 4 grupos con diferente proporción macho-hembra (MFR): 1). MFR alto [HMFR;  $n=20$ , 1:10], 2). MFR bajo [LMFR;  $n=10$ , 1:5], expuesto a dos grupos de MNTT, 3). MFR alto [HMFR;  $n=20$ , 1:10], 4). MFR bajo [LMFR  $n=10$ , 1:5], expuestos a dos grupos de MTT. Los MTT mostraron un alto CSA en comparación con los MNTT (91.9% vs 8.1%;  $P < 0.01$ ), además de que el MTT el CSC fue del 100%, mientras que el del grupo MNTT fue de 0 %. El grupo MFR alto expuesto a MTT presentó un mayor CSA comparado con el LMFR bajo expuesto a MTT, (65% vs 35%;  $P < 0.01$ ). No hubo diferencias estadísticas del CSC entre MFR alto y MFR bajo (41.7 vs 58%;  $P > 0.01$ ). La actividad estral de las hembras expuestas a los MTT fue del 86.6% con una tasa de preñez del 83.3%, mientras que los MNTT no estimularon ninguna hembra al estro. No se observaron diferencias estadísticas entre MFR alto y MFR bajo, ya sea para la respuesta estral (85% vs 90%;  $P > 0.01$ ; respectivamente) o para la tasa de preñez del (85% vs 80%  $P > 0.05$  respectivamente). Los intentos de montas y montas con eyaculado durante las 24 h fueron similares entre machos tratados expuestos a 5 y a 10 hembras ( $P > 0.05$ ). No se encontró ninguna correlación entre los comportamientos de los machos y las variables medioambientales ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, la actividad fue mayor en las horas luz (día) que durante la oscuridad. En conclusión, la administración de testosterona induce el comportamiento sexual en machos en época de reposo sexual ya que muestran un alto CSA e inducen la actividad estral en hembras anovulatorias; además el comportamiento sexual de estos machos, expuestos a diferentes proporciones de hembras durante 24 h es similar y no es influenciado por la temperatura, humedad e ITH, sin embargo, es mayor durante el día que la noche, y la aplicación de testosterona en machos sexualmente inactivos provoca un incremento de la testosterona sérica además de mejorar la calidad del semen.

**Palabras clave:** Comportamiento sexual, actividad estral, testosterona, calidad seminal, temperatura

## II. ABSTRACT

### EFFECT OF EXOGENOUS TESTOSTERONE ON THE SEXUAL BEHAVIOR OF BUCKS AND EVALUATION OF THE MALE EFFECT ON REPRODUCTIVE RESPONSE OF ANESTROUS GOATS

#### THESIS

Oscar Angel Garcia

Presented as partial to obtain the degree of:

DOCTOR OF SCIENCES IN AGRICULTURAL PRODUCTION

Director

Dr. Francisco Gerardo Veliz Deras

In the present study the effect of exogenous testosterone administration on sexual behavior of bucks during resting season through the male effect with different male-female ratios, the relationship of behavior with temperature humidity index (THI) and reproductive response in females in seasonal anoestrus exposed to males for 24 h, and the effect of testosterone on Sertoli cells, semen characteristics and testosterone levels in blood were evaluated. In *Exp. 1*, a total of 12 sexually mature mixed-breed bucks were used in this experiment to study the effects of testosterone application (T; 25 mg I.M. every 3 days during 3 weeks) during the period of sexual inactivity (end of March, 26°N) on libido, odor, Sertoli cell count, seminal characteristics and serum testosterone levels. The experimental design was completely random with two groups with six bucks in each group. Reaction time was shorter ( $P < 0.05$ ) in T treated bucks ( $96 \pm 45$  sec) than in control bucks ( $258 \pm 44$  sec). Testosterone treatment increased semen volume ( $1.2 \pm 0.5$  vs.  $0.3 \pm 0.03$  ml for T and control bucks, respectively) and total sperm cells/ejaculate ( $1.32 \pm 0.7$  vs.  $0.33 \pm 0.02 \times 10^9$  for T and control bucks, respectively). Buck's odor (scale 1-5) was more intense ( $P < 0.05$ ) in T treated bucks ( $1.8 \pm 0.1$ ) than control bucks ( $0.6 \pm 0.2$ ). Serum testosterone levels were threefold higher in T treated bucks (8 ng/mL) compared to control bucks (2 ng/mL) after 3 weeks of exogenous testosterone treatment. It was concluded that testosterone application to sexually inactive bucks provoke an increase in serum testosterone which in turn induces an intense sexual behavior and the improvement of semen quality. In *Exp. 2*, bucks ( $n=8$ ) received

two treatments: 1). Testosterone-treated bucks (**TTB**; n=4; 25 mg, i.m., of testosterone, every 3-d x 3-w), and 2). Non-testosterone treated bucks (**NTTB**; n=4; i.m. injection of saline every 3-d x 3-w). Thereafter, two sexual behavior tests were performed: **appetitive (ASB)** and **consummatory (CSB)** by exposing each group of males to a set of adult female goats (1-h x 2-d). Subsequently these males were exposed to anoestrous crossbred goats (n=60) which were randomly assigned to one of four treatments with different male-to-female ratios (**MFR**): 1). High MFR goats [**HMFR**; n=20, 1:10 ratio], 2). Low MFR [**LMFR**; n=10, 1:5 ratio] each group was exposed to two **NTTB**, 3). High MFR goats [**HMFR+T**; n=20, 1:10 ratio], and 4). Low MFR [**LMFR+T**; n=10, 1:5 ratio] each group was exposed to two **TTB**. While the **TTB** displayed higher **ASB** ( $P<0.01$ ; 91.9% vs 8.1 %), the **NTTB** did not express any **CSB** ( $P>0.05$ ; 100% vs 0%). This last was also true regarding **MFR**; sexual behavior was absent in the **NTTB**, irrespectively of the male-to-female load. Certainly, the **HMFR+T** depicted a higher **ASB** ( $P<0.01$ ; 65% vs 35%) than the **LMFR+T**, without differences in the **CSB** between **HMFR+T** and **LMFR+T** ( $P>0.05$ ; 41.7% vs 58.3%, accordingly). Besides, when exposed to the anestrous females, **TTB** induced estrus response (86.6%) and pregnancy rate (83.3%) while **NTTB** did not. Interestingly, no differences were observed between **HMFR+T** and **LMFR+T** for either estrus response (85% vs 90%, respectively) or pregnancy rate (85% vs 80%, respectively). Hence, testosterone administration was effective to induce sexual behavior in bucks during the male resting season. In addition, regardless of mating load (1:5 or 1:10), these bucks were able to induce estrus behavior in anestrous females, yet a high load elicited a higher rate of ASB. Therefore, this strategy could be effective to induce sexual behavior during the out-of-season, particularly under marginal production systems, besides sexual behavior during the 24h of these males exposed to different proportions of females is similar and is not influenced by temperature, humidity and ITH, however, is higher during the day than at night, and application of testosterone in sexually inactive males causes an increase in serum testosterone and improves semen quality.

**Key Words:** Goats; female anestrus season; male resting season; testosterone administration; male effect, sexual and reproductive outcomes.

## 1. INTRODUCCIÓN

El comportamiento sexual de los machos es uno de los factores más importantes que influyen en la bioestimulación (Álvarez y Zarco, 2001). En las cabras durante el anestro estacional, se puede inducir y sincronizar la actividad sexual con la introducción de un macho a lo cual se le denomina “efecto macho”. Sin embargo, para que se pueda inducir la actividad sexual, los machos deben mostrar un 80% del comportamiento sexual (Veliz *et al.*, 2006). En efecto, se ha demostrado que los machos tratados con testosterona (T) tienen la habilidad de inducir hasta el 93% de actividad estral en hembras anovulatorias, mientras que los machos no tratados no son capaces de inducir la actividad sexual de las hembras (Luna-Orozco *et al.*, 2012). Otro factor que puede afectar la respuesta de las hembras es el porcentaje de machos y hembra (Carrillo *et al.*, 2007). Cuando se incrementó la proporción macho-hembras de 1:10 a 1:100, la respuesta estral disminuyó del 87% al 25% respectivamente (Signoret *et al.*, 1982). Por otra parte, se ha descrito en animales en empadre en agostadero, que a un mayor porcentaje de hembras por machos disminuye el número de montas con eyaculación que un macho puede realizar por cada hembra, lo que disminuye drásticamente el porcentaje de preñez (Mellado *et al.*, 2000). Otro factor que afecta a los caprinos de las zonas subtropicales (25°-35° N y S) es el periodo de reposo sexual en la primera mitad del año, en la cual las hembras no presentan ciclos estrales y los machos tienen una mala calidad espermática, una baja libido, y un bajo

comportamiento sexual (Carrillo *et al.*, 2010; Delgadillo *et al.*, 2004). Por ejemplo, de enero a julio, los machos de raza Alpina del norte de México (26° N), estabulados y bien alimentados, tienen una calidad seminal mala, además de un peso testicular bajo, con una latencia al eyaculado y el número de rechazos al eyacular incrementados al doble (Carrillo *et al.*, 2010). En los machos, el comportamiento sexual es dependiente de la secreción de T, la cual disminuye durante el periodo de reposo sexual (Carrillo *et al.*, 2010; Delgadillo, 2005). Para contrarrestar este periodo de reposo se han utilizado tratamientos fotoperiódicos, los cuales consisten en someter a los machos cabríos a 2.5 meses de días cortos con luz artificial para inducir su actividad sexual (Delgadillo *et al.*, 2002), sin embargo, son tratamientos muy costosos. Existen otras opciones para inducir la actividad sexual de los machos durante la época de reposo sexual, entre ellos, el tratar a los machos cabríos con T exógena vía intramuscular durante tres semanas (Luna-Orozco *et al.*, 2012), el cual resulta más barato comparado con los tratamientos fotoperiódicos. Además, existen pocos estudios sobre el comportamiento sexual de los machos cabríos para ver si éste varía durante las 24 h del día, y si es afectado por las condiciones ambientales, como la temperatura y la humedad (Mellado *et al.*, 2000). Tampoco se conoce si la T mejora la calidad seminal, el número de células de Sertolí, y los niveles de T en suero sanguíneo. Por tal razón se optó por inducir la actividad sexual de machos cabríos en época de reposo sexual mediante la utilización de T.



## **2. HIPÓTESIS**

- La aplicación de T induce la actividad sexual en machos cabríos, mejorando las características seminales y aumentando los niveles de T en sangre en época de reposo sexual.
- Estos machos expuestos a diferentes proporciones macho-hembra, muestran el mismo comportamiento sexual sin ser afectado por variables ambientales.

## **3. OBJETIVOS**

- Inducir la actividad sexual de machos cabríos y mejorar las características seminales mediante la aplicación de T exógena en época de reposo sexual.
- Estimular la actividad sexual de cabras anovulatorias mediante el efecto macho y con diferentes proporciones macho: hembra, además de correlacionar el comportamiento sexual de los machos tratados con T con variables ambientales.

## 4. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Control endocrino de la reproducción

La liberación de las hormonas gonadotrópicas es impulsada por la hormona liberadora de gonatropinas (GnRH) producida por el hipotálamo y derivada de la pituitaria anterior vía Eje hipotálamo-hipófisis (EHH). La GnRH y las hormonas gonadotrópicas son liberadas de manera pulsátil. Las variaciones en la frecuencia y pulsatilidad de la liberación de GnRH pueden tener un efecto diferencial en la producción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). Muchos factores externos afectan la actividad del pulso generador en el sistema nervioso central. Las gonadotropinas tienen múltiples funciones, por ejemplo, en la hembra incluyen en el control del desarrollo de los folículos ováricos, ovulación, formación y función del cuerpo lúteo y la regulación de la producción de hormonas gonadales. En el macho estimulan la esteroideogénesis en las células de Leyding y de Sertolí. La inhibina, activina y folistatina son producidas por las gónadas y reguladas por la liberación de FSH por la pituitaria. La inhibina reduce la producción de FSH mientras que la activina aumenta la producción de FSH independientemente del GnRH (Squires, 2003).

La actividad hipotalámica dirige la descarga episódica de las gonadotropinas en la circulación periférica. Los pulsos de LH secretados por la hipófisis y definidos con su frecuencia y amplitud, estimulan en el macho la

descarga de T por los testículos y en la hembra la de estradiol y progesterona por los ovarios. La FSH parece ser secretada más continuamente, en una forma no episódica. En ambos sexos, la estacionalidad de la actividad neuroendocrina es responsable de las grandes variaciones estacionales en la actividad sexual. Este efecto es mediado por el fotoperiodo, el cual actúa sobre el sistema nervioso central a través de la modificación de la duración de la secreción nocturna de la melatonina (Chemineau y Delgadillo, 1993a)

El sistema nervioso central, por medio de la GnRH, estimula a la hipófisis anterior, y esta a su vez secreta las hormonas gonadotrópicas LH y FSH. La actividad espermatogénica depende de la LH y FSH. Estas hormonas inducen la diferenciación y la multiplicación de las células germinales, así como la síntesis y la secreción de la T por las células de Leyding del testículo. La T participa en el mantenimiento de la espermatogénesis, también induce el comportamiento sexual y ejerce una retroalimentación sobre la secreción de las gonadotropinas. La LH es liberada de manera pulsátil (periodos breves de secreción) por la hipófisis provocado por la actividad de las neuronas de GnRH del hipotálamo, las que se alternan con un periodo de reposo en los que se registra un nivel basal. Estos cambios bruscos de la concentración plasmática de LH provocan una estimulación rápida de las células de Leyding del testículo, las cuales responden liberando la T a nivel sanguíneo. Cada pulso de LH es seguido de un pulso de T, cuya amplitud varía según la situación fisiológica del animal. Cuando la frecuencia no es muy elevada vuelve a su nivel basal entre dos pulsos (Chemineau y Delgadillo, 1993c).

Aunque la actividad espermática y el comportamiento sexual siempre están presentes, hay una variación marcada según la estación del año en que se encuentren (Chemineau *et al.*, 2010). Durante el reposo sexual, la secreción de LH, de T, el peso testicular y la producción espermática cualitativa y cuantitativa se encuentran disminuidos (Carrillo *et al.*, 2010; Delgadillo *et al.*, 2001), por lo tanto, en dicho periodo, el comportamiento sexual de los machos se ve reducido, el número de montas disminuye y las copulaciones pueden desaparecer totalmente (Carrillo *et al.*, 2010).

En un estudio realizado en machos cabríos de la raza Zuraibi en Egipto, (latitudes 31°E, 30°N), se demostró que la estación del año ejerce un efecto sobre las características físicas de la calidad del semen. La estructura histológica del testículo indicó que durante el otoño (estación de reproducción natural), los túbulos seminíferos ocuparon la mayoría de los tejidos testiculares (76.6%) y las capas espermáticas fueron mayores. Se puede decir que los machos Zuraibi tienen una actividad estacional distinta, con características cualitativas y cuantitativas pobres del semen durante el invierno y la primavera, lo cual es un obstáculo crítico para la implementación de sistemas intensivos cuando se aplica la monta natural. La estructura histológica en el testículo mostró una clara diferencia entre las estaciones siendo más activo en verano y otoño, que en la primavera e invierno. El número de capas espermáticas, considerado como el mejor indicador de actividad testicular para el proceso de la espermatogénesis fue más bajo durante la primavera que en el otoño (Barkawi *et al.*, 2006).

Los machos cabríos de la raza Blanca en China muestran cambios en los niveles sanguíneos de T en los machos de 2,3, 4 y 6 años de edad que fueron estudiados durante un año (enero a diciembre). Los análisis realizados muestran que los promedios mensuales generales de T durante los 12 meses tienen diferencias significativas entre las estaciones primavera-invierno (Polat *et al.*, 2012).

Los esteroides son principalmente responsables de la espermatogénesis, de la aparición del comportamiento sexual y del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios. También ejercen una retroalimentación negativa o positiva sobre el eje hipotálamo-hipofisario, impidiendo un desbloqueo del sistema hormonal. Los equilibrios y las relaciones que existen entre estas diferentes hormonas condicionan el desarrollo temporal de la actividad sexual de los machos cabríos (espermatogénesis y comportamiento sexual). Existen factores capaces de alterar este equilibrio: el fotoperiodo que por la vía sensorial ocular modula la intensidad de la actividad sexual; la presencia de parejas sexualmente activas a través de la vía sensorial olfativa; y el nivel alimenticio (Chemineau y Delgadillo, 1993c).

## 4.2. Estacionalidad reproductiva

Muchas especies muestran variaciones estacionales sobre la frecuencia de ovulación (presencia o ausencia de ovulación), la actividad espermatogénica (de moderada disminución a ausencia completa de la producción de espermatozoides), la calidad del gameto (variaciones en el índice de fertilización y supervivencia embrionaria) y también del comportamiento sexual. Los mecanismos involucrados son una compleja combinación de ritmos endógenos circanuales, conducidos y sincronizados por la luz y la melatonina (Chemineau *et al.*, 2008). Por ejemplo, la estacionalidad reproductiva es una característica de las razas de ovejas y cabras originarias o adaptadas a latitudes templadas. Mientras que la actividad reproductiva de los mamíferos es dependiente de las hormonas, en varios casos el entorno social puede ejercer alguna acción moduladora (Véliz *et al.*, 2002). En ovinos y caprinos se ha reconocido al fotoperiodo como el elemento principal en la regulación de la actividad reproductiva, iniciándose éste en el momento en que los días empiezan a reducir su duración, lo que permite que los nacimientos sean en la época en que la disponibilidad de forraje es mayor (Chemineau *et al.*, 2008). Los animales de granja generalmente expresan variaciones en sus características de producción, induciendo de este modo la disponibilidad de productos de origen animal frescos (carne, leche y queso) ó el desempeño (caballos). Esto es debido, en ovejas, cabras y en caballos, a una marcada época de nacimiento y distribución, pero no en ganado lechero. El pico de

nacimientos se produce al final del invierno y a principios de primavera, durante el periodo más favorable para la progenie y su supervivencia.

#### **4.2.1. Control endocrino de la estacionalidad**

Hay una sorprendente relación entre el ambiente y las adaptaciones de la conducta reproductiva, muy evidente en animales estacionalidad reproductiva que pueden reproducirse en días cortos o largos, de acuerdo a factores proximales, especialmente el fotoperiodo que provoca cambios fotoneuroendocrinos. Estos cambios involucran fotoreceptores, un reloj biológico y el aparato neuroendocrino. Intervienen en esta regulación las gonadotropinas, el desarrollo gonadal, la retroalimentación negativa de las gonadotropinas por los esteroides sexuales, la intervención de las fibras retino-hipotalámica y los núcleos supraquiasmáticos, así como la secreción de melatonina. El pulso generador de la eminencia media del hipotálamo es importante en el control de la adenohipófisis respecto de la secreción de LH y FSH. En el testículo, los endocrinocitos (células intersticiales de Leyding) que secretan T (principalmente), establecen un asa de retroalimentación con la adenohipófisis y el hipotálamo en un circuito de asa larga, corta y ultracorta, en el que las neuronas neuroendocrinas tienen un rol importante. Los sustentocitos (células de Sertolí intratubulares), son importantes por su rol mecánico, trófico y metabólico respecto a las células germinales y la secreción de la activina e inhibina, las que provocan o inhiben respectivamente la secreción de FSH. Los sustentocitos también secretan diferentes proteínas específicas, entre las cuales

se encuentra la proteína que liga andrógenos, importante porque concentra 100 veces la T en el parénquima testicular. La secreción tónica, por pulsos de gonatropinas, especialmente de LH, es debida a la actividad hipotalámica que se inicia en la pubertad a través del control de la generación de estos pulsos (Bustos-Obregón y Torres-Díaz, 2012).

El macho también presenta estacionalidad en su actividad reproductiva, la cual ha sido bien definida mediante el análisis de las variaciones en las concentraciones plasmáticas de T y el tamaño testicular (Santiago-Moreno *et al.*, 2005a). Al igual que las hembras, en el macho, las características reproductivas también se ven influenciadas por la época del año, de tal manera que su actividad sexual es durante los meses de mayo a diciembre (verano-otoño) seguida de un periodo de reposo sexual que ocurre de enero a abril (invierno-primavera) (Delgadillo *et al.*, 1999). Aunque la actividad espermática y el comportamiento sexual siempre están presentes, hay una variación marcada según la estación del año en que se encuentren (Chemineau *et al.*, 2010). Durante el reposo sexual, la secreción de LH, de testosterona, el peso testicular y la producción espermática cualitativa y cuantitativa se encuentran reducidos (Delgadillo *et al.*, 1999; Delgadillo *et al.*, 2001), por lo tanto, en dicho periodo el comportamiento sexual de los machos se ve disminuido, el número de montas baja y las copulaciones pueden desaparecer totalmente (Carrillo *et al.*, 2010). Esta estacionalidad reproductiva depende principalmente de las variaciones anuales del fotoperiodo (Delgadillo *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2010). Esta acción se genera a nivel de eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (HHG) mediante la vía

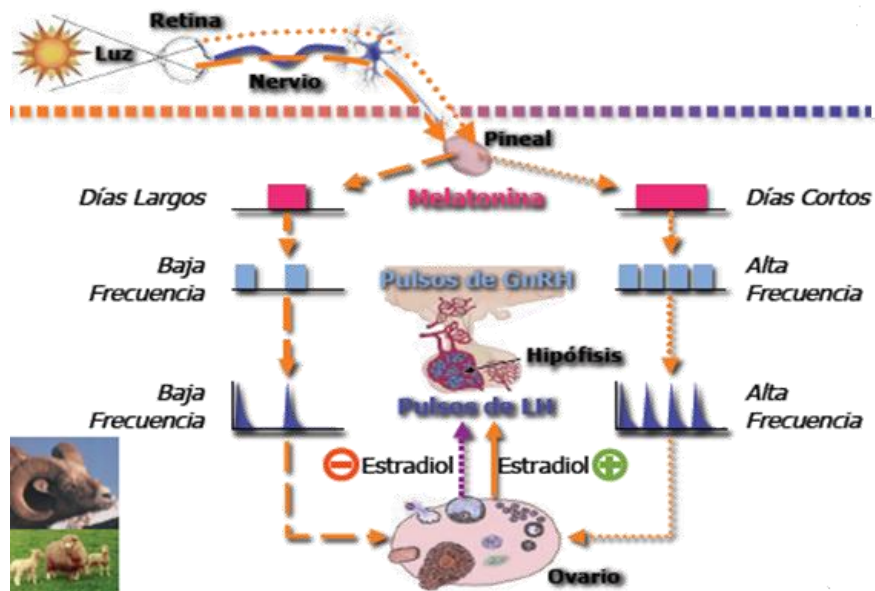


de la epífisis o glándula pineal. Dicha glándula recibe las variaciones de horas luz por día y actúa transformando los impulsos ópticos en hormona melatonina (Chemineau y Thimonier, 1986), la cual regula la secreción de GnRH, que a su vez influye sobre la secreción de las gonadotropinas (LH y FSH).

En ovejas tanto en machos como hembras existen variaciones estacionales de la capacidad reproductiva relacionadas con los niveles hormonales. Por ejemplo, las concentraciones de FSH y LH en la pituitaria se reducen al 50% durante la época no reproductiva. En la sangre periférica, las concentraciones de LH varían a lo largo del año, mientras que las concentraciones de prolactina siguen el patrón de la duración del día. Las hormonas esteroides y sus acciones de retroalimentación en el eje hipotálamo-pituitaria juegan un papel en la regulación de la reproducción estacional (Thimonier, 1981).

La melatonina, secretada por la glándula pineal en los animales diurnos ejerce un patrón circadiano de secreción caracterizado por niveles basales durante el día y elevados durante la noche. Las variaciones en la secreción de esta hormona reflejan el fotoperiodo, haciendo de transductor de la información fotoperiódica a una respuesta hormonal, transmitida al eje HHG. La melatonina transmite la información del fotoperiodo en el área premamilar hipotalámica (Malpoux *et al.*, 1988) regulando la secreción de GnRH que a su vez regula la secreción de las dos hormonas gonadotropas producidas en la adenohipófisis, LH y FSH (Clarke *et al.*, 1984) El principal mecanismo de regulación de la

estacionalidad por parte de la melatonina, se efectúa mediante una modulación, a nivel hipotalámico, de su sensibilidad a una retroalimentación negativa realizada por los esteroides gonadales (Figura 1).



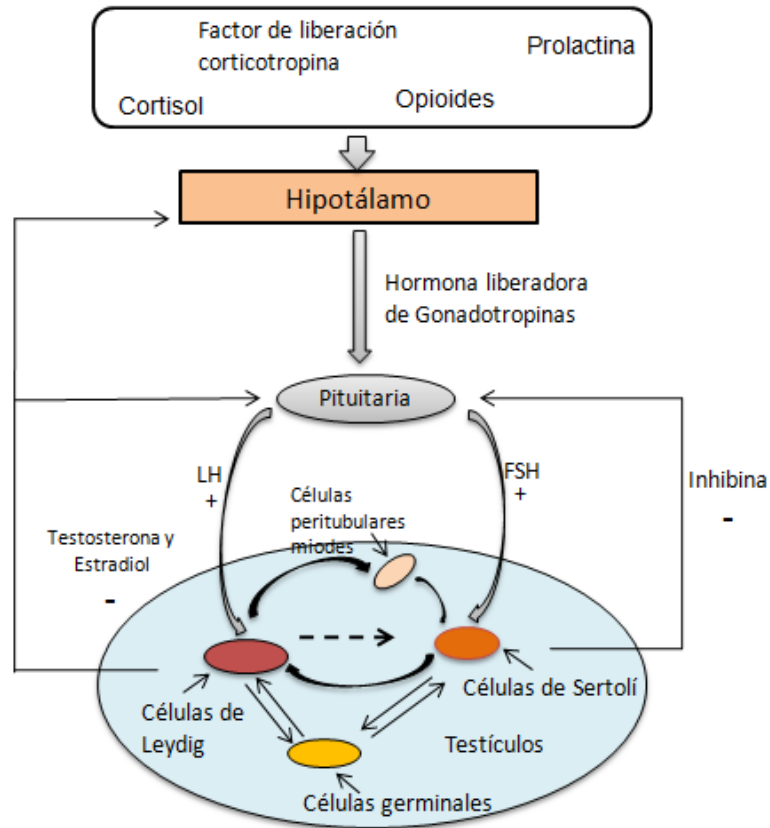
**Figura 1.** Detección del fotoperiodo (Tomado de Clarke *et al.*,1984).

El aumento de las horas de oscuridad durante el fotoperiodo de días cortos, incrementa la duración de la secreción nocturna de melatonina, disminuyendo el umbral de sensibilidad a los esteroides gonadales (estradiol en la hembra y T en el macho) que induce un incremento de la frecuencia de pulsos de GnRH, lo que aumenta la frecuencia de pulsos de LH. La disminución en la duración de la secreción de la melatonina durante los días largos determina un incremento de esta sensibilidad a la acción inhibitoria de los esteroides gonadales, estableciéndose una inhibición de la actividad reproductiva (Bustos-Obregón y Torres-Díaz, 2012).

La máxima actividad testicular se aprecia en los meses de septiembre a diciembre. El inicio del incremento del tamaño testicular y de la secreción de T en el mes de septiembre, coincide con el establecimiento de los grupos mixtos y las luchas entre machos, que establecerán el orden en la cubrición de las hembras en el mes de octubre. Este mecanismo adaptativo está orientado a conseguir los mayores niveles de T y la mayor producción espermática, concentrados en el periodo de mayor competitividad y desgaste. Sin embargo, al final de la estación reproductiva se detecta una disminución de las características cualitativas y cuantitativas seminales y se ve disminuida la producción seminal, los machos pueden mantener una capacidad de fecundación, y poder cubrir a aquellas hembras que no quedaron gestantes en las primeras ovulaciones de otoño y que aún presentan actividad ovulatoria cíclica hasta la primavera (Bustos-Obregón y Torres-Díaz, 2012).

A nivel testicular, la FSH controla la actividad de las células de Sertolí, 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 sinergismo con la T (Tilbrook *et al.*, 1993, 1999). La LH, por su parte, actúa sobre las células de Leyding regulando la producción de T (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 negativo de la T es seguido por un incremento en la secreción de T que permitirá un adecuado desarrollo de las

glándulas accesorias (Santiago-Moreno *et al.*, 2005b) y un medio óptimo para el desarrollo de una espermatogénesis normal.

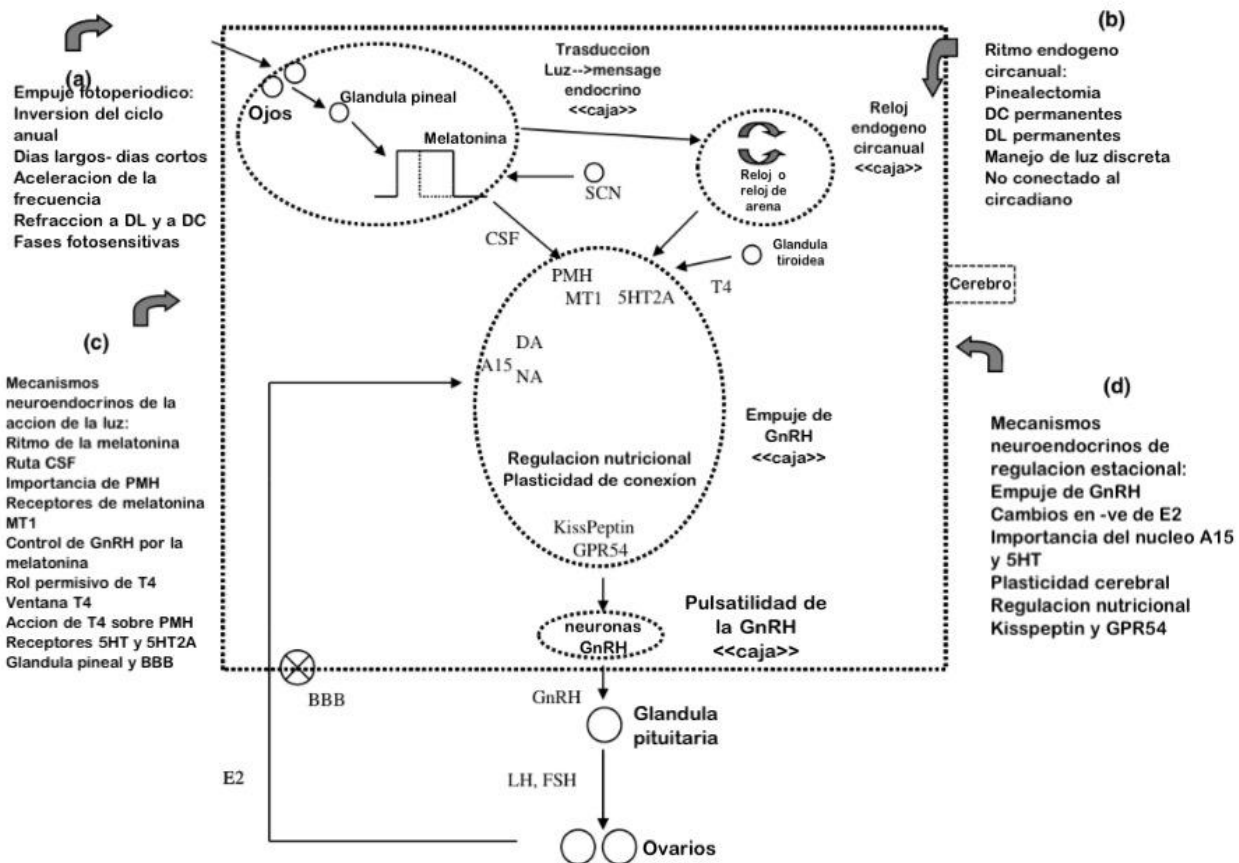


**Figura 2.** Interrelaciones en el control de la reproducción en el macho (modificado de Pérez-Clariget, 1998).

La reactivación gonadal lleva consigo también cambios morfológicos en los testículos. Cuando se activa el eje (HHG), se produce un aumento en el peso testicular durante el periodo verano-otoño, mientras que en primavera el peso testicular es menor. Este ciclo testicular es la expresión de los cambios andrógeno-dependientes originados en los túbulos seminíferos, que inducen cambios tanto en el diámetro como en la longitud. A nivel celular se constata un

aumento del volumen de las células de Leyding con un incremento del tamaño del núcleo (Bustos-Obregón y Torres-Díaz, 2012).

Aunque de alguna manera la actividad espermatogénica y el comportamiento sexual de los machos cabríos y los carneros siempre están presentes, varían de gran forma con la estación (Chemineau *et al.*, 2010). Los cambios estacionales en la actividad reproductiva se originan casi exclusivamente por los cambios en la secreción de LH y FSH por la glándula pituitaria (Rosa y Bryan, 2002), la cual, es a su vez es controlada por la pulsatilidad de la GnRH en el sistema portal-cerebral a nivel pituitaria (Barrell *et al.*, 1992; Chemineau y Delgadillo, 1993c). La frecuencia de la liberación de GnRH en el sistema portal es un mensaje esencial enviado por el cerebro de manera estacional, para controlar todo el eje (HHG) (Thiery *et al.*, 2006; Tricoire *et al.*, 2002). Estos cambios estacionales en la actividad pulsátil de la GnRH son accionados por el fotoperiodo y la melatonina (Malpaux *et al.*, 2001), que actúa como sincronizadora del ritmo endógeno de la reproducción (Thiery *et al.*, 2009; Tricoire *et al.*, 2003). Estos mecanismos pueden ser acomodados en 4 grupos principales, fuertemente interrelacionados entre ellos (*Figura 3*).



**Figura3.** Representación esquemática del control neuroendocrino de la actividad reproductiva estacional en cabras y ovejas (Tomado de Chemineau *et al.*, 2010).

- La conducción fotoperiódica de la actividad reproductiva, demostrada por variados y numerosos experimentos de control de luz utilizando la inversión del ciclo anual, regímenes de días largos y días cortos, aceleración de la frecuencia anual, mantenimiento de término medio en fotoperiodos largos y cortos constantes (los que inducen a la refracción) y la iluminación de fases foto sensitivas (Malpaux *et al.*, 1988).
- El ritmo circannual endógeno de la actividad reproductiva, cuya existencia fue fuertemente sugerida por los resultados de la pinealectomía, o por el mantenimiento a largo plazo de periodos largos/cortos constantes. Este ritmo endógeno circannual es sincronizado por señales de luz externas discretas y pueden trabajar ya sea en base a un reloj o a un reloj de arena (Malpaux *et al.*, 1997).
- El mecanismo neuroendocrino de la acción de la luz en la actividad reproductiva, el cual se ha demostrado que es manejado por la secreción pineal de melatonina en el fluido cerebroespinal (PMH, por sus siglas en inglés), probablemente vía el receptor tipo 1 de melatonina (MT1, por sus siglas en inglés), y la cascada de eventos de control de la GnRH (Batailler *et al.*, 2004; Malpaux *et al.*, 1994).
- Los mecanismos neuroendocrinos involucrados en la regulación estacional de la actividad reproductiva, fuertemente asociada con los mecanismos antes descritos, y de los cuales se demostró que varían estacionalmente y que controlan la actividad pulsátil de la GnRH (Álvarez y Zarco, 2001).

En las razas estacionales, la alteración entre periodos de actividad e inactividad es de origen central. Los cambios de la actividad gonadotrópica son responsables de la baja actividad en primavera y verano y de la intensa actividad en otoño e invierno. Por ejemplo, de enero a mayo en el macho cabrío Alpino los niveles basales de T son de 0.3 ng/ml en plasma, la frecuencia de los pulsos son alrededor de 1 en 8 horas, la amplitud de éstos son menores de 0.2 ng/ml y, como consecuencia, la concentración media de LH (0.4 ng/ml de plasma), es baja. En junio y julio, la amplitud aumenta progresivamente hasta alcanzar 1.0 ng/ml en agosto. Después, en septiembre, la frecuencia de los pulsos aumenta bruscamente (3.5 pulsos en 8 horas), mientras que su amplitud disminuye probablemente debido a la existencia de una correlación negativa entre frecuencia y amplitud y a los altos niveles plasmáticos de T (4 ng/ml en agosto; 13 ng/ml en septiembre). Después de los niveles altos de LH y T en agosto y septiembre, se mantiene una disminución progresiva hasta enero; después, el ciclo anual empieza nuevamente (Zarazaga *et al.*, 2010).

#### **4.2.2. Kisspeptina y estacionalidad sobre la reproducción**

Las Kisspeptinas (Kp) son una familia de neuropéptidos producidos principalmente por dos poblaciones de células neuronales hipotalámicas. Las Kp han surgido recientemente como un importante regulador del eje reproductivo y que se acciona a través de la GnRH. En menos de 10 años un cuerpo creciente de literatura ha demostrado la participación de estos péptidos en la mayoría, si no en todos los aspectos de la maduración y la función del eje

reproductivo. La reproducción requiere la realización de una buena comunicación entre el eje HHG (Caraty *et al.*, 2012). Los genes de Kp se expresan en una amplia gama de tejidos además del cerebro. En el cerebro de roedores, el gen Kiss1 se expresa en el núcleo arqueado y el núcleo anteroventral periventricular. En el cerebro de ovejas, las neuronas Kp se localizan en el arco y el área preóptica (Kitahashi y Parhar, 2013).

En la mayoría de las especies, es inequívoco un fuerte efecto estimulador de Kp en la secreción de gonadotropinas, con la única excepción de un informe sobre peces en la que se le reporta un papel inhibitorio. Inicialmente, la evidencia del efecto estimulador de la Kp sobre la liberación de gonadotropina se obtuvo mediante inyección en el ventrículo cerebral del ratón. Este hallazgo se confirmó más tarde ampliamente en muchas especies utilizando inyecciones intravenosas o subcutáneas de Kp: en ratas, monos, ovejas, cerdo, vaca, yegua y cabras así como también en seres humanos. El efecto estimulante de la Kp en la secreción de gonadotropinas está mediada principalmente por una acción estimulante sobre la liberación de GnRH (Caraty *et al.*, 2012). Los aspectos comparativos en la regulación génica de la Kp se centran en los aspectos comparativos de Kp y su regulación de genes, con énfasis en el papel de señales, que incluyen a los esteroides gonadales, el fotoperíodo y las señales metabólicas (Kitahashi y Parhar, 2013).

Las especies domésticas y salvajes muestran una estacionalidad en su función reproductiva controlada predominantemente por el fotoperíodo. Las



alteraciones estacionales en el estatus de la reproducción son causadas por cambios en la secreción de GnRH, mediada por vías neurales aferentes. En particular, la Kp parece jugar un papel importante en la estacionalidad de la reproducción, al transducir el efecto de retroalimentación de los esteroides gonadales, así como tener un efecto (dependiente no esteroideo) sobre el ritmo circanual (Clarke y Caraty, 2013).

Se conoce que las hormonas sexuales esteroideas como el estradiol (E2) y la T, son algunos de los principales reguladores de los genes Kp. Las altas y bajas regulaciones de los genes Kp por hormonas esteroideas sexuales, corresponden a la retroalimentación negativa y positiva del eje HHG. El hallazgo de este esteroide en la regulación del gen Kp fue un gran avance en el campo de neuroendocrinología reproductiva para explicar el mecanismo de retroalimentación de los esteroides en el eje HHG (Kitahashi and Parhar, 2013).

Un conjunto importantes de datos sobre este tema ha sido obtenido de estudios en ovejas y hámsteres y estos han sido revisados a detalle. La quiescencia relativa de las células de Kp en la estación no reproductiva puede ser contrarrestada mediante la administración del péptido, lo que lleva a la activación de la función reproductiva. Aunque la melatonina tiene un papel importante en la transducción de fotoperiodo con el sistema reproductivo, las células de Kp no parecen expresar el receptor de la melatonina, por lo que los medios por los cuales la estacionalidad cambia el nivel de la actividad Kp sigue siendo desconocido (Clarke y Caraty, 2013). Diversos trabajos han revelado

que la Kp estimula la liberación de GnRH y controla el HPG en la mayoría de los vertebrados. Estudios recientes sugieren que las neuronas Kp son una parte del mecanismo de regulación ambiental de la reproducción, lo que explica cómo el fotoperíodo, estado de energía, el estrés y las hormonas esteroideas sexuales regulan el sistema reproductivo (Kitahashi y Parhar, 2013).

#### **4.2.3. Otros factores que afectan la estacionalidad**

Existen variables extrínsecas (asociadas con los cambios estacionales, en clima y la disponibilidad de alimentos) e intrínsecas (asociadas con el tamaño corporal final, la duración de los diferentes eventos reproductivos y la longevidad del individuo) que determinan que los animales desarrollen o no "estrategias" estacionales para su reproducción (Avdi *et al.*, 1993; Chemineau y Delgadillo, 1993b) que a su vez están reguladas por una compleja interacción de factores físicos (fotoperíodo, temperatura, precipitación pluvial) (Chemineau *et al.*, 2003b), nutricionales (disponibilidad de alimentos) (De la Isla-Herrera *et al.*, 2010) y sociales (presencia del macho, prácticas de manejo o crianza) (Delgadillo *et al.*, 2006; Porras-Almeraya *et al.*, 2003a).

##### **4.2.3.1. Control fotoperiódico**

En los caprinos de zonas templadas, el fotoperíodo y sus variaciones determinan los cambios estacionales de la actividad neuroendocrina. La percepción de la duración del día se hace por la retina que trasmite, vía

nerviosa, la información a la glándula pineal. Esta última sintetiza y secreta únicamente durante la oscuridad, la melatonina a la circulación general. La duración diaria de la secreción está directamente ligada a la duración de la noche. Por intermedio de la duración de la secreción, los animales interpretan la duración del día y responden a las variaciones fotoperiódicas. Los días cortos estimulan la actividad pulsátil de LH y los días largos la inhiben. La T comienza a elevarse desde la cuarta semana después de los días cortos y disminuye la segunda semana después de los días largos (Chemineau y Delgadillo, 1993c).

- **Control de la estacionalidad reproductiva por el fotoperiodo**

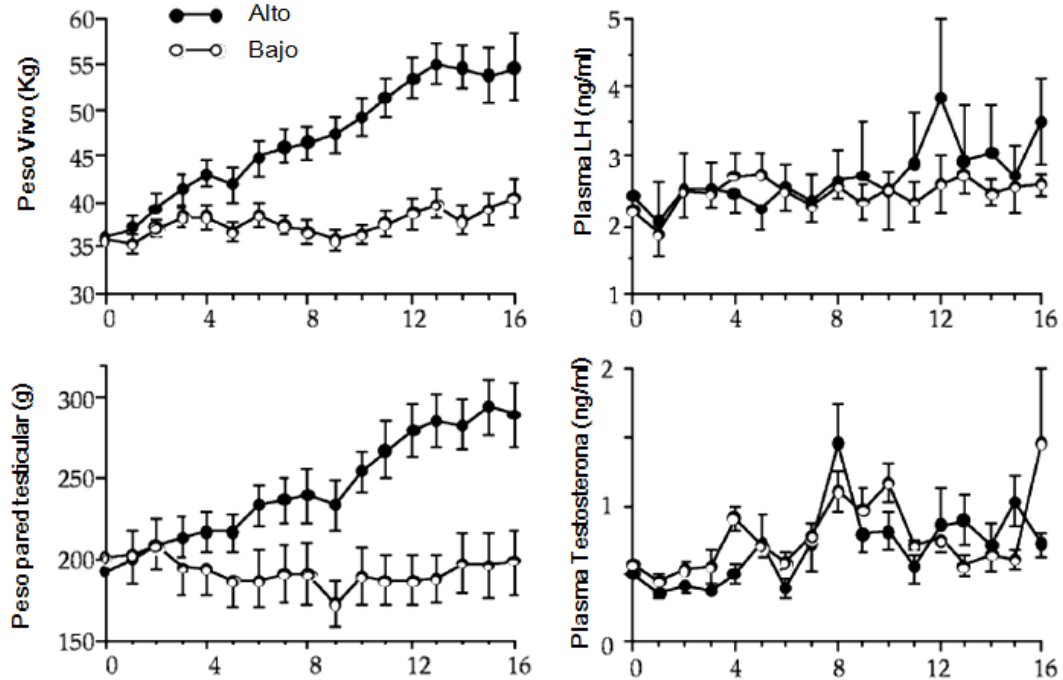
Se conoce que en reproductores de días cortos como los borregos y cabras la actividad sexual se inhibe por los días largos, mientras que los días cortos la estimulan (Chemineau y Delgadillo, 1993c). Aunque estos efectos, específicos de la longitud del día, no son permanentes y cuando están sujetos a un fotoperiodo constante, los animales se vuelven “refractarios”, “escapan” del fotoperiodo prevaleciente: los días largos dejan de ser inhibidores y los días cortos dejan de estimularla (Chemineau y Delgadillo, 1993c; Malpoux *et al.*, 1988). En cabras y borregas, esta refracción podría ser considerada conceptualmente apenas como el primer paso de la expresión del ritmo endógeno circanual, el cual puede ser sobrepasado (“roto”) por animales en transferencia del fotoperiodo opuesto (Malpoux *et al.*, 1988), fenómeno conocido como refracción a los días cortos, el cual ocurre de manera natural en

borregas durante finales de invierno, y se rompe por dos meses de exposición a días largos en diciembre-enero, permitiendo que la eficacia de la estimulación de los días cortos se restablezca (Arrebola *et al.*, 2010; Jackson *et al.*, 1988).

#### **2.2.3.2. Nutrición**

Los cambios bruscos en la nutrición tienen efectos marcados en el desarrollo testicular de los caprinos, tanto en tamaño testicular, como en peso vivo (Walkden-Brown *et al.*, 1994b) Este incremento está asociado a un aumento en la producción diaria de espermatozoides debido tanto a un incremento total en la masa testicular como a un incremento en la eficiencia de producción de espermatozoides por gramo de tejido testicular.

Aún durante la estación no reproductiva, los machos salvajes tienen una marcada respuesta testicular a los cambios nutricionales, con incrementos testiculares de hasta el 50% cuando son alimentados a voluntad con pellets de alfalfa por 16 semanas, lo que podría ser explicado porque aquellos animales cuyo desarrollo y eje reproductivo parecen estar bajo un significativo control fotoperiódico, han desarrollado la flexibilidad de responder oportunamente a cambios por una mejor nutrición aún bajo condiciones fotoperiódicas adversas, aunque sin cambios en LH o secreción de T (Figura 4). Nuevamente, la respuesta testicular estuvo asociada muy estrechamente con aumentos en el peso vivo (Martin y Banchemo, 1999).



**Figura 4.** Efecto de la nutrición sobre el peso vivo, peso testicular, y concentración promedio de LH y T en machos cabríos adultos alimentados a voluntad con dietas de alta o baja calidad en el este subtropical de Australia (29°S, 153°E) (Tomado de Martín y Banchero, 1999).

Delgadillo *et al*, (2004) también señalan como otro factor importante en la modulación de la actividad sexual de los pequeños rumiantes a la alimentación. Por ejemplo, se ha reportado que restringir el 25% de los requerimientos nutricionales afecta la función reproductiva de la cabras durante el periodo de transición, pero no durante la época reproductiva (Rosales-Nieto *et al.*, 2006).

La influencia de la nutrición en la reproducción se ha investigado extensamente, concluyéndose que la secreción de GnRH se reduce en los animales desnutridos. Sin embargo, el mecanismo a través del cual las señales metabólicas generadas por una nutrición deficiente son captadas a nivel central para regular la secreción de GnRH es complejo y no se ha establecido de

manera precisa. Se han estudiado distintos indicadores metabólicos que participan en este proceso, como la glucosa, ácidos grasos volátiles, algunos aminoácidos y ácidos grasos no esterificados. También se investigaron mediadores endocrinos entre el estado nutricional y los procesos reproductivos; entre ellos, el factor de crecimiento asociado a la insulina (IGF-I), la hormona del crecimiento, la colesistoquinina, el neuropéptido Y (NPY), los péptidos opioides endógenos y su relación con la insulina. La glucosa regula la liberación de GnRH y, al parecer, los péptidos asociados a la insulina participan en el control del metabolismo de energía en el cerebro. En ovejas con una condición corporal baja, ovariectomizadas y tratadas con implantes subcutáneos de estradiol, se reduce el IGF-I, lo cual inhibe el incremento de secreción de LH asociado con el inicio de la época reproductiva. Por lo tanto, una nutrición inadecuada puede prolongar el anestro estacional (Arroyo, 2011).

Una alternativa es la alimentación la cual tiene un efecto a través de los pulsos generados por la GnRH y un efecto sobre el sistema de retroalimentación negativa por las hormonas testiculares para cambiar la capacidad de respuesta del hipotálamo a éstas. Es posible que los cambios en la tasa de crecimiento metabólico, en lugar de los cambios en las tasas de secreción, puedan tener un efecto potencial de las concentraciones sanguíneas de hormonas de la reproducción. Los cambios en la dieta afectan a la actividad del hígado, el sitio del catabolismo de las muchas hormonas, mientras que un elevado plano de la nutrición podría resultar en una disminución en las concentraciones circulantes de testosterona que podrían alterar la secreción de

gonadotropinas y por lo tanto, la actividad testicular en el eje (Martin *et al.*, 1992).

En carneros Merino, la inmunización activa contra la inyección de GnRH resultó en la regresión testicular. Sin embargo, este efecto se retrasó por un plan nutricional elevado (Hötzel *et al.*, 1993), lo que sugiere que en los machos, el efecto de la nutrición en el crecimiento testicular es parcialmente independiente de los cambios en la secreción de gonadotropina. Tales respuestas pueden implicar hormonas metabólicas tales como la insulina, IGF-I, la hormona del crecimiento y la prolactina, que se ha demostrado tienen receptores testiculares y pueden actuar mediante la replicación celular y la producción de esteroides y podrían modular el efecto de las gonadotropinas en los testículos (Martin *et al.*, 1992).

#### **4.2.3.3. Temperatura**

La elevación de la temperatura medio ambiental provoca una serie de cambios drásticos en las funciones biológicas de los animales de granja que conducen al deterioro de la producción y la reproducción. Existe evidencia de que en aquellas especies en las que no hay un control endógeno de la temperatura corporal (vertebrados poiquilotérmicos), la termoperiodicidad generalmente domina a la fotoperiodicidad para la sincronización del ritmo reproductivo anual. También existe evidencia de que la temperatura medio ambiental es capaz de interactuar con el fotoperiodo para sincronizar los ritmos

reproductivos de vertebrados homeotérmicos. Así, por ejemplo, la actividad sexual del hámster dorado disminuye durante el otoño, cuando decrece la duración del día. Sin embargo, en condiciones de fotoperiodo corto, la atrofia ovárica se presenta más rápido a medida que la temperatura ambiental es menor (Porras-Almeraya *et al.*, 2003b).

En las ovejas Merino sometidas a temperaturas de 40° a 43° C después de su inseminación, se ocasiona una reducción en su índice de gestación. También la exposición al estrés calórico antes y después de la inseminación, reduce la fertilidad. Sin embargo, todos estos efectos de las temperaturas extremas no pueden considerarse como un mecanismo de regulación normal, sino más bien una respuesta fisiológica a un estrés térmico excesivo, que normalmente no se presenta en la región de la cual se originaron dichas razas ovinas (Porras-Almeraya *et al.*, 2003b).

### **4.3. Reproducción en diferentes condiciones ambientales**

#### **4.3.1. Reproducción en zonas templadas**

En estas zonas, las razas de cabras permanecen anéstricas y anovulatorias durante los días largos de la primavera y el verano y comienzan a mostrar actividad sexual al mismo tiempo que disminuye el fotoperiodo durante el otoño (Malpoux *et al.*, 1997). Registros colectados durante 35 años por la Sociedad Británica de Caprinocultura indican que en el hemisferio norte, la estación de reproducción de las cabras inicia en agosto y se extiende hasta el mes de marzo. Asimismo, dichos registros señalan que en estas cabras existe



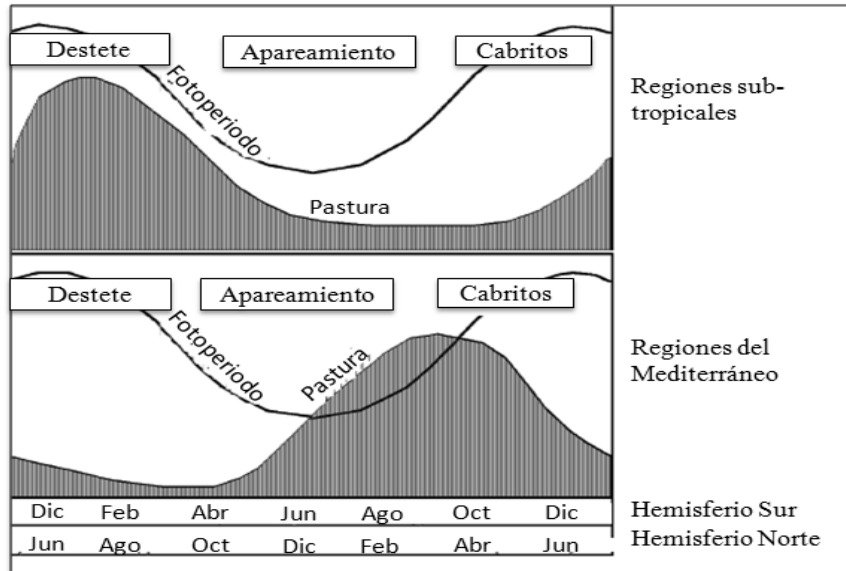
un pico de apareamientos que se presenta durante octubre y noviembre. En las cabras Alpinas y Saanen en Francia, el periodo natural de reproducción se desarrolla de septiembre a febrero, es decir en otoño e invierno (Chemineau *et al.*, 1992b). En la región norte de la provincia de Neuquén en la Patagonia Argentina (41°S), las hembras caprinas Criollas presentaron una actividad reproductiva estacional. Esto es, un periodo de ovulaciones totales (con o sin estros), que se extendió desde fines de marzo a principios de septiembre (Cueto *et al.*, 2003).

En un estudio en machos cabríos de zonas templadas de la raza Tinerfeño de Islas Canarias, España, han puesto de manifiesto una fuerte correlación entre los cambios estacionales y la actividad sexual (Benavente *et al.*, 2007).

Los machos de las razas Alpina y Saanen de las zonas templadas (45° N) muestran una marcada estacionalidad reproductiva (Chemineau *et al.*, 2003a). En los machos de estas latitudes mantenidos en condiciones naturales, el comportamiento sexual depende de la secreción de T, la cual decae durante la primavera y el verano, disminuyendo consecuentemente el volumen del eyaculado y el número total de espermatozoides/ml, siendo el fotoperiodo el principal factor del medio ambiente que sincroniza la actividad sexual.

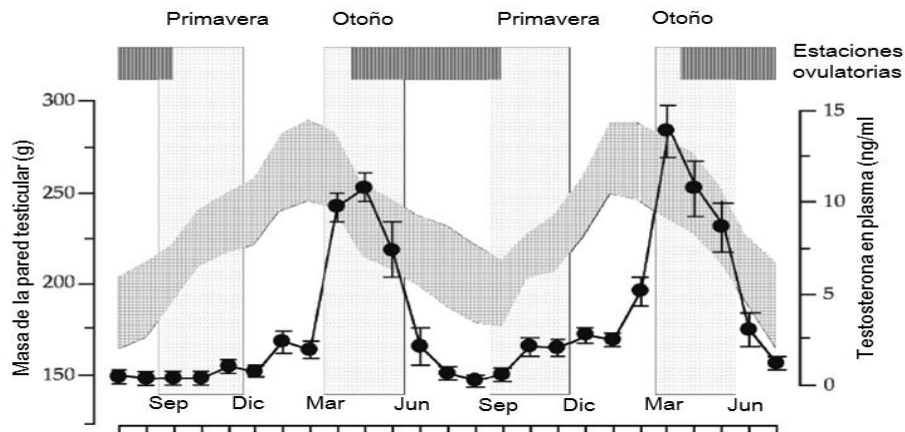
#### **4.3.2. Reproducción en zonas subtropicales**

Se ha observado que las cabras Cashmere, localizadas en las regiones subtropicales de Australia (29° S), presentan variaciones estacionales en su actividad sexual. En efecto, Restall, (1992) encontró que en esas cabras la época de actividad sexual se presentó de febrero a agosto (otoño-invierno), mientras que el periodo de inactividad sexual lo hizo de septiembre a enero (primavera-verano). En argentina (30°S), las cabras nativas Criollas muestran su actividad reproductiva de marzo a septiembre y el periodo de anestro estacional ocurre de octubre a febrero. Estos antecedentes describen claramente que las cabras localizadas en regiones subtropicales presentan marcadas variaciones estacionales en su actividad reproductiva. De modo interesante, estos ciclos están algo desfasados del ciclo anual de las pasturas (Figura 5), con el peso vivo y el tamaño testicular declinando durante el otoño, pese a la presencia de pastura de alta calidad, e incrementándose intensamente en primavera, pese a que la calidad y la cantidad de la pastura disponible están disminuyendo.



**Figura 5.** Esquema de los ciclos anuales en fotoperíodo (-) y disponibilidad de pastura (barras verticales) en regiones mediterráneas y subtropicales (Tomado de Martin y Banchemo, 1999).

Otros estudios con machos estabulados alimentados a voluntad, confirmaron la sincronización de los ciclos estacionales con el peso vivo y el tamaño testicular y sugirieron que ambos ciclos fueron secundarios al ciclo del apetito inducido por el fotoperíodo (Walkden-Brown *et al.*, 1994a). La presencia de este ciclo del apetito, una de las características de la clásica "raza de días cortos", sugiere que estos animales han conservado una dependencia considerable de las entradas fotoperiódicas. Esta impresión está confirmada por un claro patrón circanual en la secreción de T con picos durante el otoño, la "clásica" estación de cría, a pesar de una disminución en el peso vivo y en el tamaño testicular (Figura. 6). Agregado a este patrón circanual, los machos pueden responder rápidamente a mejoras agudas en la nutrición, a pesar de el ambiente fotoperiódico.



**Figura 6.** Cambios en peso vivo, peso testicular y concentración plasmática de LH y testosterona en machos caprinos salvajes (n=6) en pastura subtropical del este de Australia (29°S, 153°E). (Modificado de Martin y Banchemo, 1999).

En el subtrópico mexicano, y en particular en la Comarca Lagunera (26° N), existe una estacionalidad de los partos en las hembras locales mantenidas en condiciones extensivas, con un alto porcentaje de ellos entre noviembre y febrero, lo que indica que el inicio de la actividad sexual ocurre en junio (Delgadillo *et al.*, 1995). En las cabras locales de las zonas áridas de México (26° N), el anestro estacional se presenta de marzo a junio, mientras que en los machos de esta misma raza, el periodo de reposo sexual se extiende de enero mayo (Delgadillo *et al.*, 2004).

En los caprinos, las variaciones estacionales de la actividad sexual de las hembras y los machos provocan que los animales se encuentren durante un 70% del año en inactividad sexual. El fotoperiodo controla las variaciones de la conducta sexual en esta especie, lo que ha hecho necesario proponer

tratamientos que permitan limitar los efectos de las horas luz (Chemineau *et al.*, 1999)

Debido a la gran diversidad de ambientes en los que crece la especie caprina, se han desarrollado diversas estrategias reproductivas (Walkden-Brown y Restall, 1996). Una de ellas utiliza al fotoperiodo como señal predictiva de los periodos más favorables para el nacimiento y posterior desarrollo de las crías. En este sentido, se tienen razas de caprinos en las cuales su estrategia reproductiva está basada rígidamente por el fotoperiodo o de fotoperiodo rígido; dentro de este esquema se contemplan la mayoría de las razas originarias de latitudes templadas o altas (Walkden-Brown y Restall, 1996) en las que se manifiestan marcadas variaciones en la actividad reproductiva; es decir, tienen un periodo de actividad sexual o anestro asociado frecuentemente con la ausencia de ovulación, y un periodo de estación sexual caracterizado por la manifestación de ciclos estrales y ovulatorios (Chemineau *et al.*, 1992a). La alimentación no es el factor que determina la estacionalidad reproductiva. Sin embargo, el nivel de nutrición sí la modifica, adelantando el inicio de la estación sexual en machos y hembras bien alimentados (Duarte *et al.*, 2010; Walkden-Brown *et al.*, 1994a).

Algunos estudios demuestran que los machos cabríos Alpino-Francés jóvenes, criados con un esquema intensivo a 26° LN en el subtrópico Mexicano, muestran un patrón estacional con respecto a la calidad espermática, libido y peso testicular y las hembras en su actividad estral ovárica (Delgadillo *et al.*,

2003b). Las cabras presentan su actividad sexual de agosto a febrero y los machos cabríos la manifiestan de mayo a diciembre (Delgadillo *et al.*, 2003a; Delgadillo y Vélez, 2010). Por ejemplo se conoce que en machos cabríos nativos de Corea la recogida de semen durante cuatro estaciones del año muestra diferencias bien marcadas en cuanto al volumen, concentración, ph, motilidad y viabilidad de los espermatozoides, siendo mayores en primavera y verano y menos marcada en el invierno, como se muestra en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Características del semen y la variación estacional de machos cabríos nativos de Corea (Choe *et al.*, 2006).

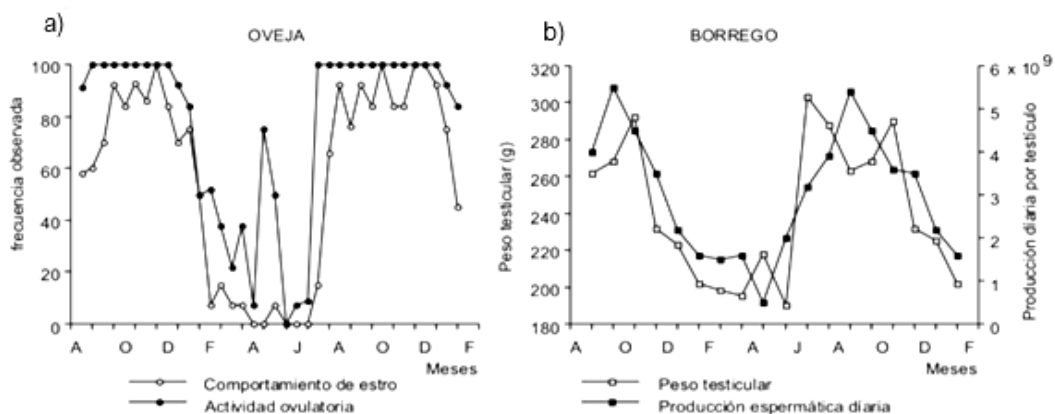
Estación	Volumen (ml)	Concentración ( $10^8/ml$ )	Total de esperma ( $10^8/ml$ )	Espermas vivos (%)	Motilidad (0-5)
Primavera	2.2±1.5	24.3±2.0	53.6±36.0	87.1±5.7	4.0±1.0
Verano	2.1±1.0	23.9±7.3	50.9±26.1	87.8±4.9	4.6±0.6
Otoño	2.1±1.0	21.8±7.6	44.7±30.0	90.2±7.2	5.0±0.0
Invierno	1.4±0.4	17.3±3.1	23.6±6.4	85.0±0.0	5.0±0.0
Media	2.1±1.0	22.9±7.0	47.4±27.8	88.2±5.6	4.7±0.6

#### 4.3.3. Reproducción en zonas tropicales

Los trópicos tienen condiciones ambientales estables debido a que el fotoperíodo sobre estos territorios es similar durante todo el año, sin embargo, mientras más nos alejamos de los trópicos la reproducción estacional se vuelve cada vez más evidente y precisa en su sincronización (Bustos-Obregón y Torres-Díaz, 2012).

Las razas caprinas tropicales muestran una actividad sexual permanente a lo largo del año, con escasa o ninguna variación estacional. Las concepciones ocurren durante todos los meses del año, con periodos de alta fertilidad vinculados a la disponibilidad de alimentos. En las hembras adultas no gestantes, se mantienen en forma continua los ciclos ovulatorios y estrales; en el macho cabrío la producción espermática y el comportamiento sexual son igualmente continuos durante el año (Chemineau, 1993).

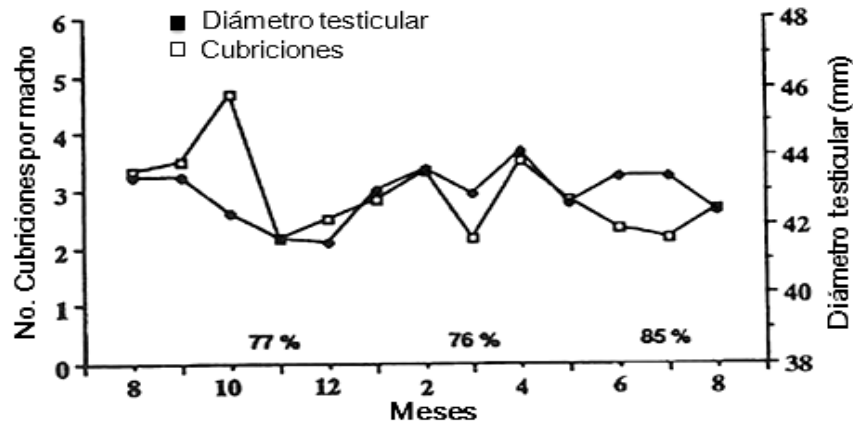
En las zonas tropicales, las ovejas y los borregos presentan un comportamiento diferente al de las zonas subtropicales, al igual que lo presentan la ovejas de zonas templadas (Arroyo, 2011), donde se muestra la ocurrencia de ovulaciones y el comportamiento estral así como la producción espermática y peso testicular de los machos los cuales muestra variaciones estacionales como se observa en la Figura 7.



**Figura.7.** Variación estacional (a), de la ocurrencia de ovulación y el comportamiento estral en la oveja Ile-de-France (b) de la producción espermática y el peso testicular en borregos Ile-de-France (tomado de Chemineau, 1993b).

A diferencia de otras especies, en las ovejas y cabras de las zonas tropicales el fotoperiodo tiene una influencia limitada sobre la producción. Tal es el caso de las razas adaptadas a las zonas tropicales o de latitud menor a 25° N. En diversos estudios se ha demostrado que los caprinos, tanto hembras como machos, originarios de estas regiones, carecen de una estación de anestro y/o reposo sexual que les permite aparearse y concebir durante casi todo el año (Chemineau, 1993). Un ejemplo de estas razas no fotosensibles son los caprinos criollos de la isla de Guadalupe en el Caribe (latitud 16° N), los cuales, en el caso de los machos, no presentan variaciones estacionales en el peso testicular, que es el reflejo de la espermatogénesis (Chemineau y Thimonier, 1986). En este tipo de animales, las lluvias, la disponibilidad de alimento y las interacciones sociales, son los factores que juegan un papel preponderante en la manifestación de su actividad reproductiva anual. En los pequeños rumiantes adaptados a condiciones tropicales, la actividad reproductiva podría estar regulada, aparte del fotoperiodo, por otros factores del medio ambiente, entre ellos la precipitación, relacionada con la disponibilidad del alimento, la temperatura y la variación de la humedad (Chemineau, 1993). Por ejemplo, en las zonas tropicales no existe una variación estacional marcada las características de reproducción en el macho (producción espermática por el testículo), o de la fertilidad y pueden reproducirse todo el año (Figura 8).





**Figura 8.** Diámetro testicular, comportamiento sexual y fertilidad del macho cabrío Criollo adulto (Tomado de Chemieneau,1993).

A los factores medioambientales sólo se les confiere una acción secundaria o restringida a determinadas características seminales o de comportamiento, existiendo diferencias importantes según las latitudes, de tal forma que en latitudes tropicales (<25°N) la mayoría de las razas autóctonas de cabras pueden exhibir ciclos de estro dependientes de factores medioambientales, como la lluvia y la disponibilidad de alimento o factores sociales, que pueden llevar a una distribución no aleatoria de la actividad reproductora (Benavente *et al.*, 2007).

#### 4.3.4. Efecto de cambio de zonas ambientales en la reproducción

En muchas especies, la estacionalidad reproductiva es un fenómeno fisiológico de adaptación para enfrentar los cambios estacionales de las condiciones climáticas, para que los partos se presenten durante el momento

más favorable para la supervivencia de las crías. La domesticación ha conducido a una pérdida casi completa de la adaptación de las especies al medio ambiente como ha sucedido con los bovinos y porcinos; sin embargo, especies como los ovinos, caprinos y equinos han retenido la capacidad de adaptación, dando como resultado una reproducción estacional, por lo que las razas de ovinos y caprinos de regiones templadas y subtropicales son sexualmente activos durante el otoño e invierno, de manera que los nacimientos ocurren durante la primavera (Malpaux *et al.*, 1993), característica de algunas razas caprinas originarias o adaptadas a las regiones subtropicales (Delgadillo *et al.*, 1999; Walkden-Brown *et al.*, 1994a)

#### **4.4. Inducción de la actividad reproductiva**

Existen diversos métodos para estimular el comportamiento sexual en el macho caprino, como la aplicación de tratamientos hormonales como el GnRH y T, además de la bioestimulación sexual y tratamientos fotoperiódicos. Por ejemplo, hay estudios realizados en borregos que demuestran que la aplicación de dosis múltiples de GnRH inducen un incremento en el fluido testicular a la hora posterior al tratamiento (Ungerfeld y Fila, 2011). Además, también hay estudios en machos cabríos inactivos sujetos a fotoperiodo con días largos o a T que demuestran que la aplicación de T exógena en época de reposo sexual, estimula su comportamiento sexual e induce a la actividad estral en cabras anovulatorias (Luna-Orozco *et al.*, 2012). De igual manera, en los machos, la alternancia de días cortos y días largos cada 2, 3 ó 4 meses, induce una

actividad sexual que inicia al final de los días largos y alcanza su máximo nivel en los días cortos. Estos resultados demuestran que las variaciones fotoperiódicas permiten modificar la actividad sexual anual en ambos sexos (Delgadillo *et al.*, 1993).

#### **4.4.1. Tratamientos fotoperiódicos**

La repetitividad del ciclo anual de reproducción observado en los caprinos locales de la Comarca Lagunera, sugiere que el fotoperiodo sincroniza el inicio y final de la actividad sexual en estos animales (Delgadillo *et al.*, 2004).

Desde los años treinta se observó que el ciclo reproductivo de las ovejas se desfasaba e invertía cuando se cambiaban de hemisferio. Este hallazgo propició la realización de numerosos estudios para evaluar los efectos del ciclo luminoso sobre la actividad reproductiva (Porras-Almeraya *et al.*, 2003b). Se ha medido la producción espermática anual en machos cabríos de la Comarca Lagunera y los resultados tuvieron un efecto significativo en cuanto se compara a la época del año sobre el volumen del eyaculado, observándose el mayor volumen en el mes de diciembre  $1.23 \pm 0.11$  ml, después de este mes se vio una disminución y en febrero se registró  $0.93 \pm 0.08$  ml, posteriormente en el mes de junio se observó un pico más elevado de  $1.44 \pm 0.07$  ml (Delgadillo *et al.*, 1999).

Otro experimento con respecto al fotoperiodo y la estacionalidad reproductiva se llevó a cabo en la misma localidad que el antes mencionado, con 11 machos de raza Alpino-Francés. En este experimento se midió la motilidad progresiva y el porcentaje de espermatozoides, la libido y el peso testicular durante un año con variaciones fotoperiódicas naturales. Los resultados del estudio demuestran que los machos cabríos Alpino-Francés muestran un patrón estacional con respecto a calidad espermática, libido y peso testicular que se extiende de enero a julio (Carrillo *et al.*, 2010).

Los machos cabríos inducidos a una intensa actividad sexual durante el periodo de reposo, al someterlos a dos meses y medio de días largos artificiales (16 h de luz/día: iluminación artificial de 6:00 a 9:00 h y de 18:00 a 22:00 h) a partir del 1 de noviembre, o a días largos artificiales constantes de noviembre a junio, al ser puestos en contacto con hembras anovulatorias inducen la actividad estral (Delgadillo *et al.*, 2003).

Los machos cabríos que son estimulados a un intenso comportamiento sexual a través de un tratamiento de días largos estimulan más del 90% de las cabras que se encuentran a la mitad del anestro estacional, mientras que los machos cabríos testigos o no tratados no estimulan a ninguna cabra a la actividad sexual (Rivas-Muñoz *et al.*, 2010).

#### **4.4.2. Tratamientos hormonales**

Existen diversos métodos para estimular el comportamiento sexual en el macho caprino como es la aplicación de GnRH, testosterona y melatonina. Los machos cabríos tratados con testosterona inducen la actividad sexual eficientemente a cabras en anestro. Por ejemplo, Croker *et al.*, (1982), reportaron que mediante el tratamiento con testosterona a machos cabríos castrados se induce a la actividad estral al 74% de las cabras en los primeros 13 días después de la introducción de los machos, mientras que en el grupo testigo expuesto a machos cabríos castrados no tratados solamente se estimuló al 17% de las cabras expuestas.

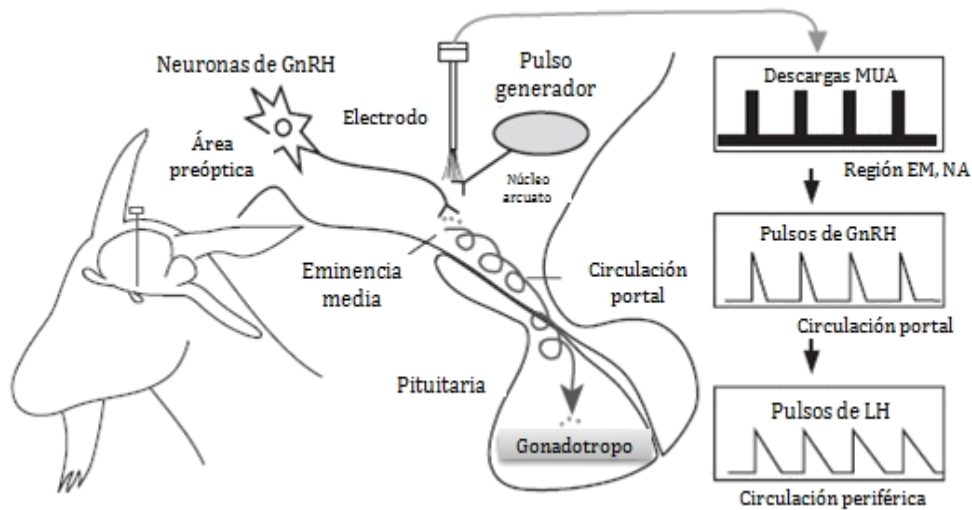
Zarazaga *et al.*, (2011), demostraron que en las latitudes mediterráneas, el tratamiento de machos con días largos artificiales y/o melatonina puede inducir un incremento de la concentración plasmática de T durante el anestro estacional y que el tratamiento de días largos artificiales solo dio lugar a un método menos efectivo para inducir la adecuada actividad sexual fuera de la estación reproductiva.

#### **4.4.3. Bioestimulación sexual**

Este término se refiere a la estimulación del sistema reproductivo de un animal por un individuo de la misma especie. El ejemplo más claro es el efecto macho en ovejas y cabras, en el cual se induce la ovulación por la introducción

de un macho sexualmente activo con cabras en anestro. En la exposición de hembras, el macho induce en pocos minutos un incremento en las frecuencias de los pulsos de la hormona LH, presentando la ovulación en los próximos 3 a 5 días (Álvarez y Zarco, 2001; Squires, 2003).

Las feromonas son señales químicas que se utilizan para las interacciones sociales, como la atracción sexual, la selección de pareja, la modulación neuroendocrina de la función reproductiva y la identificación individual entre congéneres (Kimoto y Touhara, 2005; Mogi *et al.*, 2007; Okamura *et al.*, 2010). Una variedad de las feromonas o sus efectos se han descrito en los mamíferos y se clasifican en dos grupos de acuerdo a las acciones en los receptores: la feromona liberadora (señalización), que provoca una respuesta conductual inmediata y, la feromona de imprimación, que desencadena una cadena de acontecimientos fisiológicos tales como la respuestas endocrinas (Okamura *et al.*, 2010). Por ejemplo, Okamura *et al.*, (2010), utilizando técnicas electrofisiológicas para registrar la actividad de unidad múltiple (MUA) en estrecha proximidad a las neuronas de Kp en el núcleo arqueado (ARC) en cabras de la raza Shiba, encontraron que las (descargas) de MUA se producen en intervalos regulares y repetitivas ráfagas que son invariablemente asociadas con moderados pulsos de LH que sugieren que en el núcleo arqueado las neuronas de kisspeptinas pueden ser la fuente intrínseca de los pulsos generadores de GnRH, como se muestra en la figura 9.



**Figura 9.** Representación esquemática de la asociación de descargas de la unidad de actividad múltiple (MUA) con la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) sobre los pulsos de la hormona luteinizante (LH). Una central de electrodos se implanta estereotáxicamente en el núcleo arqueado (ARC) / en la región de la eminencia media (ME), donde terminan los axones GnRH. MUA registra en una cabra consciente se procesa y se muestra en un ordenador personal en tiempo real eléctricamente (modificado de Okamura *et al.*, 2010).

Muchas especies de mamíferos utilizan señales químicas, comúnmente denominadas feromonas, para la comunicación social y sexual entre la misma especie a través del órgano vomeronasal. El neuroepitelio vomeronasal se puede dividir en dos zonas, caracterizadas por los receptores de feromonas específicas y proteínas G: la capa apical que expresa a los receptores V1R y Gai 2, y la capa basal, que expresa a los receptores V2R y Gα (Kimoto y Touhara, 2005).

La introducción de machos y hembras en estro a grupos de ovejas y cabras anéstricas provoca una respuesta ovulatoria sincronizada en los

primeros tres a cinco días siguientes (efectos macho y hembra). La señal del macho es principalmente feromonal y desencadena un incremento en la frecuencia y amplitud de los pulsos de la LH (Álvarez y Zarco, 2001; Okamura y Mori, 2005). El porcentaje de hembras que ovulan en respuesta al olor del macho es menor que cuando existe contacto físico total con el semental, esto último indica que otros sentidos están involucrados en la mediación del fenómeno pero que ninguno es indispensable (Álvarez y Zarco, 2001). La GnRH genera pulsos intermitentes que provocan su descarga en los vasos portales, regulando así la pulsatilidad de la LH. En ovejas y cabras, la feromona producida por el macho induce la ovulación fuera de la estación reproductiva en las hembras en anestro. Debido a que el evento endocrino inicial después de la recepción de la feromona en la hembra es la estimulación de la secreción pulsátil de LH, se considera que el objetivo central de la feromona es putativo por los pulsos generados por la GnRH (Chemineau, 1987; Okamura *et al.*, 2010).



## Artículo I

### **Seminal characteristics, libido and serum testosterone concentrations in mixed-breed goat bucks receiving testosterone during the non-breeding period.**

#### **Abstract**

A total of 12 sexually mature mixed-breed goat bucks were used in this experiment to study the effects of testosterone application (T; 25 mg I.M. every 3 days during 3 weeks) during the period of sexual inactivity (end of March, 26°N) on libido, odor, Sertoli cell number, seminal characteristics and serum testosterone levels. The experimental design was completely random with two groups with sixbucks in each group. Reaction time was shorter ( $P<0.05$ ) in T bucks ( $96 \pm 45$  sec) than in control bucks ( $258 \pm 44$  sec). Testosterone treatment increased semen volume ( $1.2 \pm 0.5$  vs.  $0.3 \pm 0.03$  ml for T and control bucks, respectively) and total sperm cells/ejaculate ( $1.32 \pm 0.7$  vs.  $0.33 \pm 0.02 \times 10^9$  for T and control bucks, respectively). Buck's odor (scale 1-5) was more intense ( $P<0.05$ ) in T bucks ( $1.8 \pm 0.1$ ) than control bucks ( $0.6 \pm 0.2$ ). Serum testosterone levels were threefold higher in T bucks (8 ng/mL) compared to control bucks (2 ng/mL) after 3 weeks of exogenous testosterone treatment. It was concluded that testosterone application to sexually inactive goat bucks provoke an increase in serum testosterone which in turn induces an intense sexual behavior and the improvement of semen quality.

**Key words:** Sexual behavior; Testosterone; Semen quality.

#### **1. Introduction**

Mixed-breed goat bucks at 25°N are mildly photosensitive with respect to reproduction (Mellado *et al.*, 2014). At this latitude goats present sexual activity for the most part of

the year, but during April and May goats present anestrus (De Santiago-Miramontes *et al.*, 2011). As a consequence, very few kids are likely to be born from mid August through mid September making it difficult for goat producers to provide a constant supply of goat milk and meat throughout the year.

Goat farmers under extensive conditions in the arid zones of northern Mexico seeking to breed does out of season for a year-round supply of milk and meat commonly use the buck effect. In order for this practice to be effective in spring, goat bucks must be sexually active, and this can be brought about through artificial lighting (Pellicer-Rubio 2007) or application of testosterone to bucks not in rut previous to the breeding period (Luna-Orozco *et al.*, 2012).

The first alternative to induce bucks into sexual activity in spring is costly, cumbersome and unworkable in practice for goat producers under range conditions. Thus, the application of testosterone to sexually inactive buck is a simpler and effective method to bring bucks into sexual activity, which in turn stimulates the doe flock to become sexually active with fertile estrus due to their “shallow” anestrus in spring (Veliz *et al.*, 2009; Rivas-Muñoz *et al.*, 2010). Testosterone-treated bucks and long-day-treated bucks are equally effective in synchronizing estrus in anovulatory goats and resulted in similar levels of fertility, despite the fact that libido in testosterone-treated bucks is lower than that attained by light-treated bucks (Luna-Orozco *et al.*, 2012). Additionally, semen quality of bucks is strongly influenced by season independently of the feeding level (Zarazaga *et al.*, 2009). It is unknown the effect of exogenous testosterone on semen quality and testicular germinal epithelium in sexually inactive bucks. Therefore, the aim of this study was to assess the effect of testosterone application to sexually inactive goat

bucks on semen characteristics, sexual drive, germinal epithelium and plasma testosterone levels.

## **2. Material and methods**

### ***2.1. Study site***

The present study was carried out in a commercial goat farm under extensive conditions in northern Mexico (26° 23'N Latitude, 104° 47' W Longitude). Average annual precipitation at the study area is 230 mm and altitude is 1124 m. The highest ambient temperature is 41°C in May and June and the lowest -3°C in December and January. Relative humidity ranges between 26.14% and 60.59%

and day length from 13 h, 41 min during summer solstice (June) and 10 h, 19 min in the winter solstice (December). This arid region is dominated by the shrubs creosote bush (*Larreatridentata*), Fourwing saltbush (*Atriplexcanescens*) and mesquite (*Prosopisglandulosa*). Goats were grazed on rangeland most of the times, and occasionally on crop residues, mainly corn, sorghum and cotton.

### ***2.2. Buck management***

Twelve sexually experienced mixed-breed 2-4 years-old bucks of proven fertility were used from March 15 to April 10, 2011. These animals were housed in a ruffed cement floor pen (6 × 6) with free access to water and a mineral mix. Twice daily, bucks were offered alfalfa hay (crude protein content: 171 g/kg DM and energy content: 8.1 MJ ME/kg DM) ad libitum consumption. Additionally bucks were offered 200 g of

concentrate per day (140 g/kg DM and energy content of 10.1 MJ ME/kg DM). This diet satisfied the nutritional requirements of mature phase of goat bucks according to NRC (1994) recommendations.

Bucks were randomly allotted into two groups (six bucks per group): intramuscular injection of 25 mg testosterone (Testosterone 50, Lab Brovel, DF, Mexico) every third day during three weeks. The second group received saline injections every third day for three weeks and served as control.

### ***2.3. Semen collection and sexual drive***

Semen was collected twice during the last week of the trial using a restrained doe treated with 2 mg de estradiol cypionate (ECP®, Lab. Pharmacia & Upjohn, Mexico) for mounting by the bucks. A standard ovine artificial vagina at a temperature of 42 °C was used to collect the semen from all bucks

An artificial vagina (41°C) into a pre-warmed tube at 30°C and was maintained at this temperature until processed. A. Tubes with the freshly collected semen were immediately transported to the laboratory and immersed in a water bath at 38° C. The ejaculate volume (mL) was determined to the nearest 0.1 mL using a glass graduated conical tube. Sperm concentration was determined using 0.025 mL of semen diluted with 0.5 mL of a fixative solution, containing 7% formaldehyde and 0.85% NaCl mixed in a 1:1 (vol/vol)

ratio. The diluted semen was placed on a hemocytometer with the sperm counted in 5 squares of each of 2 chambers, and the concentration of sperm cells was calculated.

Forward progressive motility was scored from 1 to 5, with a score of 5 denoting the greatest forward progressive movement and a score of 1 denoting no motility. This determination was made with a microscope equipped with a heated platform adjusted to 37°C and with phase contrast optics (400x). The total number of sperm cells was determined by multiplying sperm concentration per ml by the volume of the ejaculate. Viable sperm were evaluated by eosin/nigrosin stain exclusion. A drop of stain was mixed with a drop of pure semen and extended on the slide which was observed at a magnification of 1000 x. Two hundred spermatozoa were counted, and the unstained spermatozoa were determined as viable sperm cells.

The scrotal circumference was measured with a tape at the broadest part of the scrotum, with the animal being restrained in a lateral recumbent position. On the day of semen collection, animals were weighed and body condition score (BCS, using score system 0–5; Hossamo 1984) was recorded.

#### ***2.4. Behavioral observations***

While the bucks were exposed to their respective estrogenized doe (15 min.) sexual behavior was measured in terms of reaction time in seconds and was estimated from the time the doe was placed inside the buck's pen up to the point when the buck started to

mount the doe with the penis erected. Approaches, mount attempts in which both forelegs of the buck were raised off the ground but not placed steadily on the doe; and mounts in which rams secured both forelegs on the rump of the doe together with pelvic thrusting movements were recorded.

### ***2.5. Testicular biopsy***

Bucks in both groups were subjected to a testicular biopsy using 21-gauge butterfly needles attached to a 20 ml plastic syringe, which served as aspiration device. The butterfly needle was passed through the scrotal skin, into the parenchyma of the testis. Five different entries were made in each testicle. Before retrieving the needle a small artery forceps was used to clamp the butterfly's microtubing. The needle was then flushed with Earle's balanced salt solution (EBSS) (Gibco BRL, Life Technologies), with heparin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) into one well of a 4-well plate (Nunc, Copenhagen, Denmark). After centrifugation at 300 g for 10 min cell suspensions were examined under a microscope (Labo America, inc, USA) at x 200 and x 400 magnification to detect the presence of any spermatozoa and germinal tissue.

### ***2.6. Blood sample and testosterone determination***

To measure changes in testosterone levels during the study period, jugular blood (5 ml) was collected weekly from each buck by venipuncture during four weeks. After blood samples were allowed to clot, serum was separated by centrifugation at 5000 g for 10

minutes and stored at -20 °C until further analysis. Concentrations of serum testosterone were measured by radioimmunoassay using a commercial assay kit provided by (Siemens, México, D.F).The sensitivity of this assay was 0.4 ng/mL of serum.

### ***2.7. Odor and sexual behavior determination***

After four week of testosterone treatment both groups of bucks were exposed to estrogenized doe during 15 minutes in order to record sexual behavior. These behaviors were reaction time, approaches, mounts without ejaculations and mounts and ejaculations upon intromission. Male odor and BCS were determined according to Walkden-Brown *et al.*,(1993, 1997).

### ***2.8. Statistical analysis***

The procedure MIXED of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA) was used to investigate the effects on ejaculate volume, sperm concentration, percentage of viable spermatozoa in the ejaculate and total spermatozoa per ejaculate with following the statistical model:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

where,

$\mu$  = Overall mean common to all observations

$T_i$  = Effect of group on the ejaculate characteristics

$E_{ij}$  = Error term

Behavioral data such as mounts and ejaculations as well as the odor data were analyzed with the Wilcoxon signed rank test (SAS, 1996); for comparative purposes these data are presented as means  $\pm$  SD. Serum testosterone levels were analyzed using a split-plot in time with group as the mainplot and time as the subplot factor. This statistical procedure was performed using the Proc Mixed Procedure of SAS. Results were considered statistically significant at  $P < 0.05$ ,

### **3. Results and discussion**

The mean reaction time was 162 seconds longer ( $P < 0.05$ ) in the control bucks compared to T bucks (Table 1). The reaction time found in T bucks ( $96.3 \pm 45.0$  sec) was very close than values observed by Chemineau (1986), who reported an average of 98 s for Creole meat bucks. These results indicate that the application of testosterone to sexual inactive bucks provokes clearly defined sexual activity, which suggests that exogenous testosterone in the non-breeding season stimulates cerebral structures mediating male sexual drive.

Semen characteristics of goat bucks collected 3 weeks after the testosterone treatment is presented in Table 2. Group differences ( $P < 0.05$ ) were observed for volume of ejaculate, but no treatment differences ( $P > 0.05$ ) were found for sperm cell concentration per mL, sperm motility and live sperm cells. The lack of differences in these semen traits between traits could be due to the fact that no correlation has been observed between seminal testosterone levels and sperm characteristics (De Oliveira-Souza *et al.*, 2011). On the other hand, testosterone application seemed to stimulate accessory glands so that volume of ejaculated increased sixfold in T bucks compared to control bucks. Other researchers



(Sanford *et al.*, 1977; Kishk 2008) also have observed an increased volume of ejaculates in rams with maximal levels of serum testosterone.

T bucks had a higher sperm count per ejaculate than control bucks. The average volume and percent motility were generally close to the estimates reported in the literature for bucks of comparable age and genotype (Mellado *et al.*, 2012). On the other hand values for sperm cells/mL and total number of spermatozoa per ejaculate observed in the present study are much lower than those reported by Roca *et al.*, (1992) with Murciano-Granadina, Barkawi *et al.*, (2006) with Zaraibi and Talebi *et al.*, (2009) and Farshad *et al.*, (2012) with Markhoz goat bucks.

Figure 1 summarizes various sexual behaviors of bucks during the exposure period to estrogenized does. T bucks were more sexually responsive than control bucks, which was reflected in a higher ( $P < 0.01$ ) approachings with investigatory sniffs, mounts without intromission but with erected penis and mounts with ejaculations. The effectiveness of exogenous testosterone to elicit sexual arousal in sexually inactive bucks was also observed by Luna-Orozco *et al.* (2012) with mixed-breed bucks at this latitude.

No effect of treatment on Sertoli cells numbers in testicular biopsy samples was observed (Table 2). This was expected because these cells become fixed and unmodifiable around puberty, although data recent data have challenged this view (Tarulli *et al.*, 2012). On the other hand treatment affected the number of sperm cells in testicular biopsies, with higher numbers in control bucks compared to T bucks. These results were unexpected and it is believed that this difference may be due to sampling errors (selection, preparation or technique) or processing of sample tissue.

Progressive increase in the profile of serum testosterone occurred in bucks as the testosterone application period progressed (Fig. 2). Concentration of T increased nearly threefold three weeks after the beginning of testosterone application. This marked increases in mean serum levels of testosterone apparently triggered the increase of volatile odors in T bucks (Fig. 2). It has been well established that the male goat odors: 6-trans nonenal (Smith *et al.*, 1984) a pheromone responsible for the male effect is produced in the sebaceous gland under the control of testosterone (Iwata *et al.*, 2000).

#### **4. Conclusions**

The study reaffirmed that the application of testosterone to sexually inactive mature mixed-breed bucks at 26°N elicited a marked sexual arousal and increased total sperm cells per ejaculation. The practical implications are that during the nonbreeding season, testosterone-treated bucks could be used to stimulate the sexual activity of anestrous does and to fecundate these animals in spring.

## References

- Barkawi AHE, Elsayed H, Ashour G, Shehata E. 2006. Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. *Small Rumin Res* 66:209-213.
- Chemineau P. 1986. Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. II. Male mating behaviour, testis diameter, ejaculate characteristics and fertility. *Reprod Nutr Devel* 26:453-460.
- De Oliveira-Souza L.W, Andrade AFC, Carvalho-Celeghini EC, Negrão JA, Paes de Arruda R. 2011. Correlation between sperm characteristics and testosterone in bovine seminal plasma by direct radioimmunoassay. *R Bras Zootec* 40:2721-2724.
- De Santiago-Miramontes MA, Luna-Orozco JR, Meza-Herrera CA, Rivas-Muñoz R, Carrillo E, Véliz-Deras FG, Mellado M. 2011. The effect of flushing and stimulus of estrogenized does on reproductive performance of anovulatory-range goats. *Trop Anim Health Prod* 43:1595-1600.
- Farshad A, Yousef A, Moghaddam, A, Khalili B. 2012. Seasonal changes in serum testosterone, LDH concentration and semen characteristics in Markhoz goats. *Asian-Aust J Anim Sci* 25:189-193.
- 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. *BiolReprod* 62:806-810.
- Kishk WH. 2008. Interrelationship between ram plasma testosterone level and some semen characteristics. *Slovak J Anim Sci* 41:67-71.
- Luna-Orozco JR, Guillen-Muñoz JM, De Santiago-Miramontes MA, García JE, Rodríguez-Martínez R, Meza-Herrera CA, Mellado M, Véliz FG 2012. Influence of sexually inactive bucks subjected to long photoperiod or testosterone on the induction of estrus in anovulatory goats. *Trop Anim Health Prod* 44:71-75.
- Mellado J, Veliz FG, De Santiago-Miramontes MA, Meza-Herrera CA, Mellado M. 2014. Buck-induced estrus in grazing goats during increasing photoperiod and under cold stress at 25° N. *Vet Med Zoot* (in press).
- Mellado M, Meza-Herrera CA, Arévalo JR, García JE, Veliz FG. 2012. Effect of dietary energy intake and somatotropin administration after weaning on growth rate and semen characteristics of Granadina goat bucks. *Turk. J VetAnim Sci* 36:338-345.
- Pellicer-Rubio MT, Leboeuf B, Bernelas D, Forgerit Y, Pougard 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. *Anim Reprod Sci* 98:241-258.
- Rivas-Muñoz R, Carrillo E, Rodríguez-Martínez R, Leyva C, Mellado M, Véliz FG. 2010. Effect of body condition score of does and use of bucks subjected to added artificial light on estrus response of Alpine goats. *Trop Anim Health Prod* 42:1285-1289.
- Roca J, Martínez E, Vázquez JM, Coy P. 1992. Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. *Anim Reprod Sci* 9: 255-262.

- Smith PW, Parks OW, Schwartz DP. 1984. Characterization of male goat odors: 6-trans nonenal. *J Dairy Sci* 67:794-801.
- Tarulli GA, Stanton PG, Meachem SJ. 2012. Is the Adult Sertoli Cell Terminally Differentiated?. *Biol Reprod* 87:1-11.
- Véliz FG, Meza-Herrera CA, De Santiago-Miramontes MA, Arellano-Rodriguez G, Leyva C, Rivas-Muñoz R, Mellado M. 2009. Effect of parity and progesterone priming on induction of reproductive function in Saanen goats by buck exposure. *Livest Sci* 125:261–265.
- 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 Rumin Res* 26:239–252.
- Zarazaga LA, Guzman JL, Dominguez C, Perez MC, Prieto R. 2009. Effects of season and feeding level on reproductive activity and semen quality in Payoya buck goats. *Theriogenology* 71:1316–1325.

## Tables

**Table 1.** Reaction time and ejaculate characteristics (mean  $\pm$  SD) in mixed-breed goat bucks either subjected to testosterone treatment or left untreated during the period of sexual inactivity (March) at 26°N.

Item	Control	Testosterone
Reaction time (seconds)	257.5 $\pm$ 43.5a	96.3 $\pm$ 45.0b
Semen volumen (ml)	0.3 $\pm$ 0.03a	1.2 $\pm$ 0.5b
Sperm motility (scale 0-5)	3.0 $\pm$ 0.0a	3.7 $\pm$ 0.0a
Live sperm cells (%)	90.0 $\pm$ 8.0a	78.3 $\pm$ 7.2a
Sperm concentration ( $10^9$ /ml)	1.1 $\pm$ 0.01a	1.1 $\pm$ 0.0a
Total sperm cells/ejaculate ( $10^9$ )	0.33 $\pm$ 0.02a	1.32 $\pm$ 0.7b

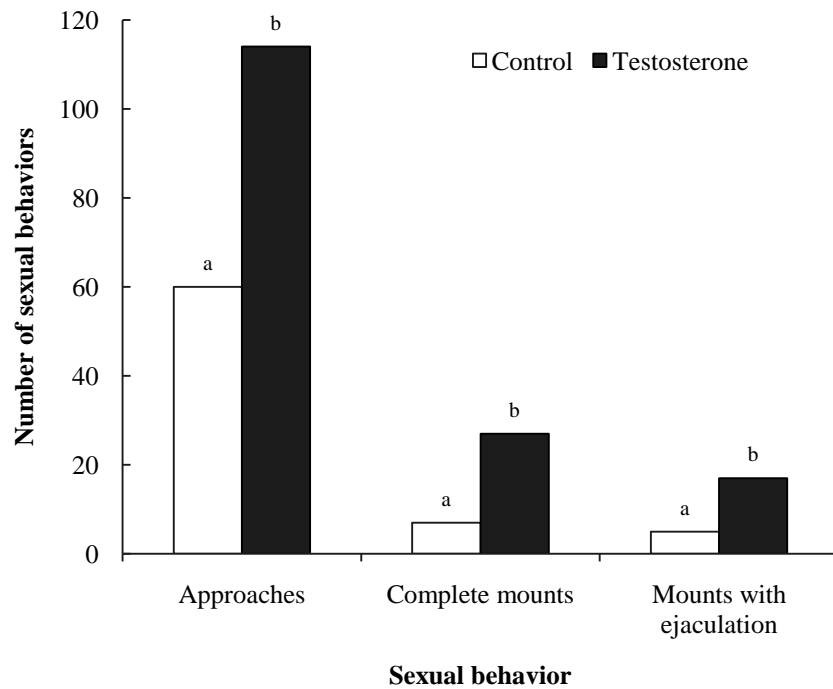
a.b Letters with different superscripts P<0.05

Table 2. Scrotal circumference, Sertoli cells and sperm cells found in testicular biopsies from mixed-breed goat bucks treated or not treated with testosterone during the period of sexual inactivity (March) at 26°N.

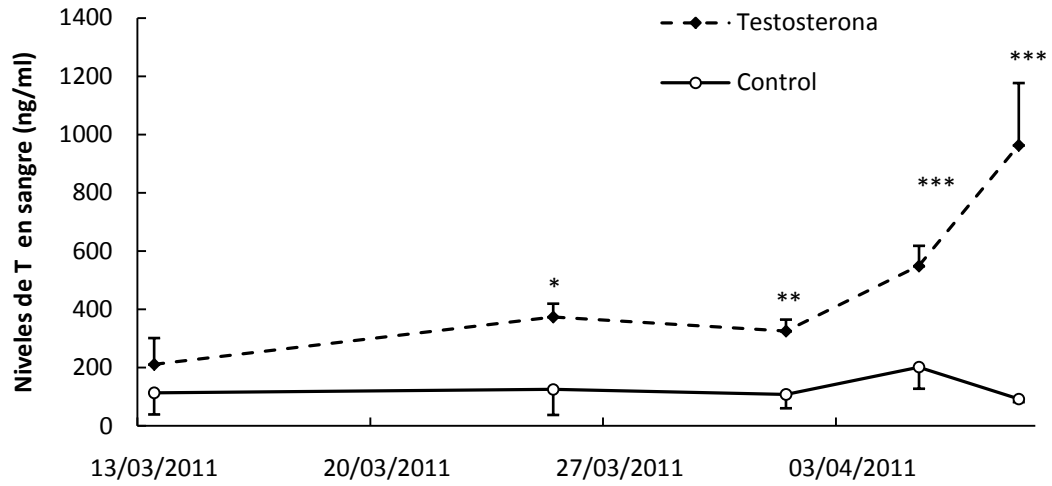
Traits	Control	Testosterone
Scrotal circumference (cm)	28.0 ± 0.8a	28.2 ± 1.3a
Sertoli cells (number per sample)	3.4 ± 0.3a	4.1 ± 1.6a
Sperm cells (number per sample)	38.6 ± 10.5a	28.5 ± 11.9b

a,b Letters with different superscripts P<0.05

## Figures



**Fig. 1.** Sexual behavior components of sexually inactive mixed-breed bucks subjected to testosterone treatment or not treated (control) during three weeks in March at 26°N. Number of behavioral events during 1 h in 2 events. <sup>a,b</sup> Letters with different superscripts  $P < 0.05$ .



**Fig. 2.** Plasma testosterone concentrations of sexually inactive mixed-breed bucks subjected to testosterone treatment or not treated (control) during three weeks in March at 26°N. Values are means  $\pm$ SD \*P < 0.05, \*\*P < 0.01



## Artículo II

### Effect of testosterone administration and different male-to-female ratios upon the male sexual behavior and the out-of-season reproductive response of anestrus goats

**Abstract.** This study evaluated the possible effect of testosterone administration and the male-to-female ratio with respect to the male sexual behavior during the resting season and the out-of-season reproductive performance of anestrus goats exposed to the male effect under subtropical conditions (26° N). In the experiment-1, bucks (n=8) received two treatments: 1). Testosterone-treated bucks (**TTB**; n=4; 25 mg, i.m., testosterone, every 3-d x 3-w), and 2). Non-testosterone treated bucks (**NTTB**; n=4; i.m. injection of saline every 3-d x 3-w). Thereafter, two sexual behavior tests were performed: *appetitive sexual behavior (ASB)* and *consummatory sexual behavior (CSB)* by exposing each group of males to a set of adult female goats (1-h x 2-d). In the experiment-2, multiparous anoestrus crossbred goats (n=60) were randomly assigned to one of four treatments with different male-to-female ratios (**MFR**): 1). High MFR goats [**HMFR**; n=20, 1:10 ratio], 2). Low MFR [**LMFR**; n=10, 1:5 ratio] each group was exposed to two **NTTB**, 3). High MFR goats [**HMFR+T**; n=20, 1:10 ratio], and 4). Low MFR [**LMFR+T**; n=10, 1:5 ratio] each group was exposed to two **TTB**. While the **TTB** displayed higher **ASB** (p<0.01; 91.9% vs 8.1 %), the **NTTB** did not express any **CSB** (p>0.05; 100% vs 0%). This last was also true regarding **MFR**; sexual behavior was absent in the **NTTB**, irrespectively of the male-to-female load. Certainly, the **HMFR+T** depicted a higher **ASB** (p<0.01; 65% vs 35%) than the **LMFR+T**, without differences in the **CSB** between **HMFR+T** and **LMFR+T** (p>0.05; 41.7% vs 58.3%, accordingly). Besides, when exposed to the anestrus females, **TTB** induced estrus response (86.6%) and pregnancy rate (83.3%) while **NTTB** did not. Interestingly, no differences were observed between **HMFR+T** and **LMFR+T** for either estrus response (85% vs 90%, respectively) or pregnancy rate (85% vs 80%, respectively). Hence, testosterone administration was effective to induce sexual behavior in bucks during the male resting season. In addition, regardless of mating

load (1:5 or 1:10), these bucks were able to induce estrus behavior in anestrus females, yet a high load elicited a higher rate of ASB. Therefore, this strategy could be effective to induce sexual behavior during the out-of-season, particularly under marginal production systems.

**Key Words:** Goats; female anestrus season; males resting season; testosterone administration; male effect, sexual and reproductive outcomes.

## 1. Introduction

In Northern Mexico, in the Comarca Lagunera 26°N, mixed-breed goats with a high proportion of dairy genes are considered seasonal breeders with female and male goats displaying a period of reproductive inactivity independently of food availability (Delgadillo *et al.*, 2001). Besides, sexual behavior of male goats depends upon testosterone production, which decreases during spring and summer (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2011). Also in females goats, it was previously observed that the "female effect" positively affects not only the appetitive and consummatory sexual behavior but also testosterone concentrations (Carrillo *et al.*, 2014). Such studies pointed out the paramount influence that both socio-sexual and photoperiodic cues exert upon testosterone release, even under subtropical conditions.

In the Comarca Lagunera, the buck's breeding season lasts from May to December (Delgadillo *et al.*, 1999), whereas dams exhibit sexual activity from September to February-March (Duarte *et al.*, 2008; Rivera-Lozano *et al.*, 2011). Therefore, bucks depicting a complete sexual behavior may not be available for breeding at the beginning of the year, a crucial period for goat producers. The last is particularly true under rain fed-pastoralist systems, where kidding during summer is highly desirable, since at this time the rainy season begins. Interestingly, does at this latitude depict a "non-profound anestrous", making possible to breed them out-of-season, as long as sexually active bucks are exposed to these anestrous goats (Rivas-Muñoz *et al.*, 2007; Veliz *et al.*, 2009; Luna-Orozco *et al.*, 2011).

Several technologies have been developed to bring sexual inactive bucks into full sexual activity during the non-breeding season. One of the most effective and studied methods is the use of lighting regimes, where 'long day photoperiods' stimulate sexual activity in bucks exposed to 16 h-light/8 h-dark, during 2-3 months (Pellicer-Rubio *et al.*, 2007). In bucks, this artificial lighting regime generates increased levels of LH and consequently higher testosterone secretion, which in turn influences the production of pheromones (Okamura *et al.*, 2010) while a complete sexual activity in bucks is observed, with full libido, abundant production of pheromones, increased scrotal circumference and higher semen quality (Delgadillo *et al.*, 1992, 2004).

Yet, the use of this procedure is questionable since controlled lighting requires the availability of a light proof barn to house the bucks. In addition, the building of such infrastructure and the lighting costs added to a complicated and time-consuming herd management is beyond the economic and physical possibilities of most goat-keepers under marginal-range conditions systems. Luna Orozco *et al.* (2011) reported that testosterone administration to sexually inactive bucks could be successfully used to provoke sexual arousal in these animals during the non-breeding season, leading most anestrous goats to become sexually active during the out-of-season period.

However, while testosterone-treated bucks have displayed a lower sexual drive compared to light-treated bucks (Luna Orozco *et al.*, 2011), a delay in the doe response to estrus induction varies according to the male-to-female ratio (Carrillo *et al.*, 2007). Based on such findings, this study aimed to determine if testosterone

administration to non-sexually active mixed-breed bucks can render them sexual activity during the spring-natural anestrous season (26°N). Additionally, we aimed to determine if a potential increased sex drive and sexual motivation can be displayed by the testosterone-treated bucks towards the anoestrous does, triggering ovulation and pregnancies, when bucks and does are subjected to different mating loads.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Environmental conditions, animal management and experimental design.*

The experiment was conducted from March to April in a semi-desert area of northern Mexico (Comarca Lagunera, 26° 23' N, 104° 47' W; altitude 1,140 m) dominated by a microphyll desert scrub. Mean annual temperature is 27°C and average annual precipitation is 230 mm, with 70% falling from June to October. Historically, this communal pasture has been heavily stocked and continuously grazed mainly by large herds of goats and cows, with sheep in lesser extent. Therefore, goats grazed on a deteriorated rangeland showing a low forage production potential.

*a). First experimental phase:* This phase of the study considered the evaluation of the sexual status and induction of sexual behavior in male goats. A total of eight sexually experienced mixed breed adult bucks of proven fertility and similar genetic background with a high level of dairy breeds were used. Mean live weight and body condition score (grading scale 0-5; Santucci and Maestrini 1985) of bucks were  $49 \pm 2$  kg and  $2.5 \pm 0.5$  units, respectively. Sexual motivation of bucks was at a low ebb, with a noticeable “goat female odor”, therefore were identified as

sexually inactive. Early on in March, bucks were placed in a ruffed dirt pen (10 x 10 m) with free access to water, a mineral-salt mixture and alfalfa hay (17% CP, 1.95 Mcal ME). In addition, each buck received daily 200 g of a commercial concentrate (14% CP and 1.7 Mcal ME). Bucks were randomly allotted into two groups (n=4, per group). Each group was placed in pens 100 m apart from each other. Before and during this first phase of the experimental period, both groups of bucks were kept under conditions of natural day length (26°N); this adaptation period considered 20 days. Thereafter, bucks were exposed to two treatments: 1). Testosterone-treated bucks (**TTB**; n=4) which received 25 mg, i.m., testosterone 50, every 3-d x 3-w (Lab Brovel, DF, Mexico), and 2). Non-testosterone treated bucks (**NTTB**; n=4), which received an i.m. injection of saline every 3-d x 3-w. After a 3-week treatment period, a behavioral sexual test was performed to both experimental groups in order to evaluate both *appetitive sexual behavior* as well as a *consummatory sexual behavior* by exposing each group to a set of adult female goats (1-h x 2-d); response variables within experimental groups were registered and will be pointed-out in the next section. A schematic representation of the main activities carried-out across time between experimental groups during this first experimental phase is depicted in Fig. 1. All the experimental procedures were carried-out in accordance to the Guide for Care and Use of Agricultural Animals of the Agrarian Autonomous University Antonio Narro.

*b). Second experimental phase.* This second phase of the experimental study was performed in order to evaluate the possible influence of the "male effect" using both male groups (TTB and NTTB) and exposing them to anovulatory adult goats,

yet considering two different male-to-female ratio. The response variables included in this second experimental phase considered both, the sexual behavior of males as well as the sexual behavior and reproductive outcomes of the anestrus goats.

Healthy multiparous anoestrous crossbred goats (n=60) with a mixture of dairy breeds of known fertility from a commercial goat herd were used in this study. Previous to this second phase of the study, goats grazed on an open range driven by a herdsman, 7-h daily (1100 to 1800 h); goats were maintained in isolation from the sight, sound and smell of bucks prior to the trial. Goats had given birth in September of the previous year and were hand-milked once daily throughout the study. After balancing for weight and body condition score, does were randomly assigned to one of four treatments with different male-to-female ratios (**MFR**): 1). High MFR goats [**HMFR**; n=20, 1:10 ratio], 2). Low MFR [**LMFR**; n=10, 1:5 ratio] each group was exposed to two **NTTB**, as well as 3). High MFR goats [**HMFR+T**; n=20, 1:10 ratio], and 4). Low MFR [**LMFR+T**; n=10, 1:5 ratio] each group was exposed to two **TTB**.

Goats remained in roofed pens (10 x 6 m) whose sides were covered with canvas in order to avoid visual contact among goats. Before exposure to bucks, all does received a single i.m. injection of 20 mg progesterone (Fort Dodge®, DF, Mexico) in order to reduce the occurrence of short luteal cycles. On March 27, experimental groups were introduced into one of four pens. After a 16-d mating period, all goats were returned to the herd and were again managed under rangeland-extensive conditions. Grazing was carried-out from 1100 h to 1800 h and then were penned

from 1800 h to 1100 h of the next day, with no extra food supplementation throughout the experimental period. Goats spent the night in unroofed corrals and had access to water only once a day. Therefore, the treatment design considered a 2 x 2 factorial arrangement of treatments, with two levels of testosterone (Treated and Untreated males) and two levels of mating loads (High, 1:10, Low, 1:5). A schematic representation of the main activities carried-out across time between experimental treatments during this first experimental phase is depicted in Fig. 2.

## 2.2. *Measurements and recordings*

Each animal was individually identified. Both the ***appetitive sexual behavior test (ASB)*** and the ***consummatory sexual behavior test (CSB)*** were assessed by exposing the males from both experimental groups to anoestrus-anovulatory goats (Carrillo *et al.*, 2014). The behavioral components of the ASB test considered to the response variables: flehmen, investigatory anogenital sniffing and lateral approaches, while the CSB test considered to: attempted mounts and mounts with ejaculation (Carrillo *et al.*, 2014). These observations were made during 1 h (0800-0900 h) by two experienced technicians during two days. In addition, male daily walking activity was objectively measured by using digital pedometers (JS-206B, Gimbel Mexicana Company).

During the second phase of the study, a different set of sexual-reproductive variables were considered regarding the male groups, including attempted mounts, complete mounts and mounts with ejaculation which were recorded permanently throughout the second phase of the experimental period. Data were registered 24-h



daily with a closed-circuit TV system (DVR four channels H.264 CCTV). Filming started as soon as bucks were introduced to the does' pens. Regarding the reproductive variables collected to evaluate the sexual-reproductive performance of the anovulatory females exposed to the male effect, these considered: interval to the onset of tail wagging (h), interval to estrus onset (h), estrus response (%), pregnancy rate (%), kidding rate (%), fetal losses (%) and prolificacy (n). Pregnancy was detected 45 days post-joining by transrectal real time ultrasound imaging (HS-2000, Honda Electronics CO, LTD.) using a 7.5 MHz transducer with does in standing position.

Therefore, in the first phase, the main effects of two testosterone levels upon sexually inactive males and exposed to adult, sexual-experienced female goats upon their appetitive and consumatory sexual behavior were evaluated (Figure 1). Thereafter, in the second phase, the main effects of two levels of testosterone (Treated and untreated males) and two levels of mating loads (High, 1:10, Low, 1:5) upon the male sexual behavior (attempted mounts, completed mounts, mounts with ejaculation and number of buck steps) as well as upon the female goat's sexual and reproductive behavior (interval to the onset of tail wagging, interval to the onset of estrus, estrus response, pregnancy rate, kidding rate, fetal losses and prolificacy) as well as their interactions, were evaluated (Figure 2).

### *2.3. Statistical analyses*

Data concerning the number of days to first estrus occurrence and tail weaving as well as to detect hourly differences regarding the number of mount intents, full mounts and mounts with ejaculation were evaluated by a 2 x 2 factorial analysis of

variance throughout the PROC MIXED of SAS. Data regarding estrus response and pregnancy rate were analyzed by categorical procedures using the GENMOD procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) with the logit link function. The only effect included in the model was treatment with each animal considered a single experimental unit. If significant differences were found among treatments, the LSMEAN/DIFF procedure of SAS was used to separate the means.

Male sexual behaviors during the first two days of teasing were analyzed by categorical procedures using the chi-square test thru the PROC FREQ of SAS. PROC UNIVARIATE of SAS was used to determine whether or not the prolificacy data were normal. Since data distribution for this variable was not normal, the Wilcoxon Rank Sum test, was used to analyze such information throughout the PROC NPAR1WAY of SAS. Correlation analyses were conducted by the Pearson's Product Moment Test to determine the relationship between ambient temperature, humidity and the temperature-humidity index (THI) with respect to buck sexual behavior, by using the PROC CORR of SAS. All analyses were considered to be statistically significant at  $P < 0.05$ . Since there were no Testosterone level x Male-to-Female ratio level interactions ( $P > 0.08$ ) for any of the measured variables, only main effect least-square means are presented for both main effects levels: **HMFR**, 1:10 ratio; **LMFR**, 1:5 ratio; **HMFR+T**, 1:10 ratio and **LMFR+T**, 1:5 ratio.

### **3. Results**

#### *3.1 Sexual behavior of bucks.*

The sexual behavior depicted by the experimental groups TTB, NTTB, LMFR and HMFR is presented in Table 1. Regarding the ASB shown by the NTTB and TTB groups was 8.1% vs 91.9% respectively. Noticeable, while the NTTB-group did not express any CSB (attempted mounts, complete mounts), this group also displayed decreased ( $P<0.01$ ) sexual conducts (i.e. flehmen, investigatory ano-genital sniffing, and approaches). On the other hand, the TTB group displayed not only a higher ASB but also an augmented CSB, as evidenced by the expression of all sexual behaviors registered when compared to the NTTB group ( $P<0.01$ ). The HMFR depicted a higher ( $P<0.05$ ; 65% vs 35%) ASB than the LMFR, without differences when considering the CSB ( $P>0.05$ ).

The sexual behavior of bucks with LMFR or HMFR in relation to the temperature-humidity index during a 24-h period, is shown in Figure 3. Overall, clear-cut differences in CSB were not established between bucks exposed to does neither at LMFR nor HMFR during a 24-h period. Interestingly, for both group of bucks, two peaks of attempted mounts were clearly detected at 0800 and 1700 h. Yet, both groups of bucks depicted complete mounts throughout the day. Hitherto, the highest number of mounts with ejaculation was observed at 1400 h. In addition, bucks from the HMFR group presented two peaks of mounts with ejaculation at 1400 and 2000 h.

Regarding the CSB of the TTB, NTTB, HMFR and LMFR groups (day and night), Table 2 concentrates information observed during a period of 24 h x 5 d. Regardless of mating load, that is either HMFR or LMFR, the CSB was higher (59.77% vs. 40.23%;  $P<0.05$ ) during the day hours as compared to night hours.

Also, in relation to the male-to-female ratio, LMFR bucks demonstrated an increased CSB during the day hours regarding the night hours ( $P<0.01$ ; 65.72% vs. 34.28%, respectively). Interestingly, the HMFR bucks depicted no differences in CSB between the day or night hours (55.74% vs 44.26%, respectively).

Information regarding the effect of male-to-female ratio upon walking activity of the TTB-group, is depicted in Figure 4. The LMFR-bucks displayed an increased number of steps ( $P<0.05$ ) than the HMFR-bucks during the first day of mating. Such behavior suggests that goats in the LMFR group depicted a sooner onset of estrus and therefore bucks engaged in sexual-related activities since the first day of contact with does. Thereafter, however, the HMFR-bucks depicted a greater ( $P<0.05$ ) walking activity on days 3 and 4 than the LMFR-group. Again, the higher number of goats showing estrus in the HMFR group after the second day of joining, provoked a greater walking activity of bucks.

### *3.2 Reproductive performance of does.*

As mentioned, none of the goats exposed to NTTB-group were detected in estrus during the experimental breeding period. On the other hand, estrus response was over 85% during the 16-d mating period in those dams exposed to the TTB-group. Yet, no differences were observed between goats under LMFR or HMFR (Table 1). Tail wagging of does started about 20 h before the onset of estrus behavior, with no-difference between goats under either LMFR or HMFR (Table 3).

Cumulative percentage of goats exhibiting estrus when subjected to either LMFR or HMFR as well as TTB or NTTB is shown in Figure 5. Interval from the male introduction to the onset of estrus was shorter ( $P<0.01$ ) in goats from the LMFR-

group than the HMFR-group during the first 24 h of buck stimulation. Nonetheless, 60 h post-joining, the same proportion ( $P>0.05$ ) of goats under the two mating loads depicted estrus. Regarding pregnancy rate, this variable showed an interesting value with respect to the TTB-group (83.3%). However, pregnancy rate decreased (42.5%) when considering the MFR experimental groups, with no differences between goats subjected to either LMFR or HMFR (Table 3). Despite of these very interesting results, very low kidding rates were observed in the goats exposed to the induced-sex drive bucks (Table 3). Certainly, high fetal losses were observed in these goats, as a result of a decreased nutrition level mainly during the last third of pregnancy.

#### **4. Discussion**

One objective of this study was to test the hypothesis that the administration of testosterone to sexually inactive bucks would render these animals fully sexually active, and the increase in both the circulating testosterone levels and the libido of bucks would result in an enhancement of the stimulation received by the anoestrous does, inducing in turn, ovulation. Results of our study indicate that the high levels of sexual performance depicted by the TTB, triggered ovulation in a high number of teased does. Therefore, the hypothesis stated at the start of our study was accepted.

While the ASB was higher in the TTB, the NTTB-group was never able to express CSB and displayed decreased ASB (flehmen, investigatory anogenital sniffing, approaches). On the other hand, the TTB group displayed not only a higher ASB but

also an augmented CSB, as evidenced by the expression of all sexual behaviors registered when compared to the NTTB group ( $P < 0.01$ ). Such lack of sexual response depicted by the mixed-breed bucks with predominance of dairy breeds during spring at this latitude when exposed to anovulatory dams is in line with other reports (Carrillo *et al.*, 2011; Luna-Orozco *et al.*, 2011).

Certainly, and despite the fact that does were acyclic, testosterone administration to bucks substantially improved their sexual activity, measured as the total time spent exerting ASB as well as when considering the frequency of the ASB components. Such behaviors are in line with previous reports at different latitude (Ungerfeld *et al.*, 2006). Goats in this study were not ovulating, yet, as a result of the buck's stimulus, on day two of teasing some does showed estrus, and possibly many more were close to ovulate; such events could be provoked by the sexually active bucks. While only the TTB-group demonstrated CSB, no differences were observed between the LMFR and HMFR groups.

Overall, clear-cut differences in CSB were not established between bucks exposed to LMFR or HMFR does in a 24 h period. Interestingly, for both group of bucks, two peaks of attempted mounts were clearly detected at 0800 and 1700 h. Besides, both groups of bucks depicting complete mounts were registered throughout the day. Yet, the highest number of mounts with ejaculation was observed at 1400 h. Bucks from the HMFR group presented two peaks of mounts with ejaculation at 1400 and 2000 h. These results agree with those reported by Mellado *et al.* (2000) under range conditions, where the maximum amount of services occurred between 1200 and 1400 h, and a second marked peak between 1800 and 2000 h. This sexual

behavior is possibly generated by the high THI found at this latitude (26°N), which was higher to the THI considered for heat stress (>70 units). Nonetheless, despite such stressful heat environmental conditions, complete mounts and mounts with ejaculation occurred within these hours. However, no correlations ( $P>0.05$ ) were observed for temperature, relative humidity and THI with respect to the CSB.

Regardless of mating load, the CSB was higher during the day hours as compared to night hours. In addition, our findings confirm that, irrespectively of the mating load, bucks artificially induced to sexual activity during the reproductive resting season were able to perform sexual activity practically throughout all day. Mellado (2010) also observed uninterrupted copulations of bucks all day round, a scenario that suggest that bucks exhibit a desire to mate at any time of the day while were able to locate and mate does in estrus even during the dark hours. The uninterrupted copulation activity of bucks coupled with the self-imposed decreased feed intake during the mating period generated a drastic loss of body mass in bucks during the breeding season, a trend in line with previous reports (Mellado *et al.*, 2010). These findings emphasize the importance to keep good body energy reserves for bucks under extensive systems, particularly during the dry season. Also, in relation to the male-to-female ratio, the LMFR group demonstrated an increased CSB during the day hours regarding the night hours ( $P<0.01$ ), with no differences in CSB between the day or night hours in the HMFR.

The LMFR-bucks displayed an increased number of steps than the HMFR-bucks during the first day of mating. Such behavior suggests that goats in the LMFR group depicted a sooner estrus onset and therefore bucks engaged sexual-related

activities since the first day of contact with does. Thereafter, however, the HMFR-bucks depicted a greater ( $P < 0.05$ ) walking activity on days 3 and 4 than the LMFR-group. Such behavior suggest that the higher number of goats showing estrus in the HMFR group after the second day of joining provoked a greater walking activity of bucks.

As mentioned, none of the goats exposed to NTTB were detected in estrus during the experimental breeding period. This is in line with previous studies at this latitude where anoestrous goats did not depict any sexual response when exposed to bucks (Carrillo *et al.*, 2011; Luna-Orozco *et al.*, 2011). On the other hand, estrus response was over 85% during the 16-d mating period in those dams exposed to the TTB-group, with no difference between goats under LMFR or HMFR (Table 3). This response agrees with previous findings of our group at this latitude when anoestrous goats were exposed to sexually active bucks during spring (Veliz *et al.*, 2006a; Rivas-Muñoz *et al.*, 2007).

Tail wagging of does started about 20 h before the onset of estrus behavior, with no-difference between LMFR or HMFR (Table 3). This observation is relevant because constant tail wagging from side to side in goats has been long considered an unmistakable sign of estrus (Llewelyn *et al.*, 1993; Katz, 2007). These data indicate that the onset of estrus in goats could be many hours away from the occurrence of vigorous tail wagging in these animals.

Regarding the cumulative percentage of goats exhibiting estrus when subjected to either LMFR or HMFR, a shorter interval from male introduction to the onset of estrus was observed in the LMFR-goats during the first 24 h of buck stimulation.



After 60 h post-joining, the same proportion of goats under the two mating loads depicted estrus. These results suggest that with fewer goats to stimulate, buck sexual activity should provide a greater stimulus, with less diluted audio-visual signals and possibly higher levels of pheromones are conveyed to does, which may stimulate an earlier LH secretion and a more rapid occurrence of estrus.

The 80-85 pregnancy rate observed in the present study with well-fed range goats are in line to the values reported by de Santiago-Miramontes *et al.* (2011) and Luna-Orozco *et al.* (2012) with similar genotypes of goats under extensive conditions. Interestingly, bucks in the same study area depict the lowest testicular weight, testosterone plasma concentrations, number of spermatozoa per ejaculate, progressive sperm motility, percentage of live spermatozoa and ejaculation latency (Delgadillo *et al.*, 1999). Therefore, this study undoubtedly demonstrates that the diminished semen quality of bucks in spring does not impede the fertilizing capacity of buck's semen, once treated with exogenous testosterone. These data suggest that explicit sexual cues from sexually active bucks facilitated the release of some does from the inhibitory feedback of their endocrine system during the traditional non-breeding season at this latitude.

Despite of these very interesting findings, very low kidding rates were observed in the goats exposed to the testosterone treated bucks. Certainly, high fetal losses were observed in these goats, as a result of a decreased nutrition level mainly during the last third of pregnancy. On this respect, as soon as the mating period concluded, two weeks later all goats returned to the rangeland, in a period when the **productivity** of this rangeland reached **its lowest level in** herbage production

and nutrient availability. Nutritional requirements of pregnant goats are magnified, resulting in a greater nutrient drain from maternal resources towards the gravid uterus, promoting an accelerated depletion of body energy reserves (Liesegang *et al.*, 2007; Cleal *et al.*, 2007).

The temporary pen feeding of goats probably increased ovulation rate (De Santiago-Miramontes 2008; Fitz-Rodriguez *et al.* 2009), a physiological scenario that possibly exacerbated nutrient demands during the 2/3 and 3/3 of pregnancy, which apparently trigger abortions. This reproductive problem has been previously addressed by De Santiago-Miramontes *et al.* (2011), who highlighted that shortcomings of food supplementation around the mating period in range goats, generated very low reproductive outcomes when dams faced an **inadequate nutrition level towards the last third of pregnancy. Certainly**, abortion is the single largest cause of economic loss to goat farmers in the arid zones of northern Mexico (Mellado *et al.*, 2004). Regarding prolificacy, it was not sensitive to buck-to-doe ratio effect; yet, a higher number in experimental units may generate different outcomes.

Exposing of anestrus goats to testosterone treated buck, irrespective of mating load, was able to successfully invoke neurophysiological pathways to activate ovarian function and to promote a uterine milieu prone to the establishment of pregnancy during the anoestrus season. Nonetheless, the high rate of abortions observed in the study highlights the need to align the last third of gestation to the onset of the grazing season in order to increase reproductive outcomes (Urrutia-Morales *et al.*, 2012).

## **5. Conclusions**

Testosterone administration to sexually inactive mixed dairy-breed bucks quickly elicited a high sex drive with a full repertoire of sexual behaviors. These bucks increased the amount of sexual activity directed towards anoestrous does, triggering the onset of ovarian activity regardless of different mating load. Yet, a high male-to-female ratio elicited a higher rate of appetitive sexual behavior. Therefore, this reproductive strategy could be used to induce sexual behavior during the out of season breeding. Nonetheless, to increase global reproductive and productive outcomes, such reproductive strategy must be paralleled by a proper maternal nutritional supplementation strategy of dams towards the last third of pregnancy, particularly under rain-feed, marginal production systems.

## **Acknowledgments**

The authors are grateful to Mr. Paulo Cervera for providing the animals and facilities used in this study. Thanks are also given to graduate students from the Agriculture Production Graduate Program of the Autonomous Agrarian University Antonio Narro, Laguna Unit, for their technical assistance during the study.

## References

- Carrillo, E., Véliz, F.G., Flores, J.A., Delgadillo, J.A., 2007. A diminution in the male/female ratio does not reduce the ability of sexually active male goats to induce estrus activity in anovulatory female goats. *Tec. Pec. Méx.* 45, 319-328.
- Carrillo, E., Tejada, L.M., Meza-Herrera, C.A., Arellano-Rodríguez, G., Garcia, J.E., De Santiago-Miramontes, M.A., Mellado, M., Véliz, F.G., 2011. Response of sexually inactive French Alpine bucks to the stimulus of goats in oestrus. *Liv. Sci.* 141, 202-206.
- Carrillo, E., Meza-Herrera, C.A., Olan-Sanchez, A., Robles-Trillo, P., Leyva, C., Luna-Orozco, J.R., Rodriguez-Martinez, R., Veliz-Deras, F.G. 2014. The "female effect" positively affects the appetitive and consummatory sexual behavior and testosterone concentrations of Alpine male goats under subtropical conditions. *Czech J. Anim. Sci.* 59, 337-343.
- Cleal, J.K., Poore, K.R., Newman, J.P., Noakes, D.E., Hanson, M.A., Green, L.R., 2007. The effect of maternal undernutrition in early gestation on gestation length and fetal and postnatal growth in sheep. *Pediatric Res.* 62, 422-427.
- De Santiago-Miramontes, M.A., Rivas-Muñoz, R., Muñoz-Gutiérrez, M., Malpoux, B., Scaramuzzi, R.J., Delgadillo, J.A., 2008. The ovulation rate in anoestrous female goats managed under grazing conditions and exposed to the male effect is increased by nutritional supplementation. *Anim. Reprod. Sci.* 105, 409-416.
- De Santiago-Miramontes, M.A., Luna-Orozco, J.M., Meza-Herrera, C.A., Rivas-Muñoz, R., Carrillo, E., Véliz-Deras, F.G., Mellado, M., 2011. The effect of flushing and stimulus of estrogenized does on reproductive performance of anovulatory-range goats. *Trop. Anim. Health Prod.* 43, 1595-1600.
- 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 buck. *Small Rumin. Res.* 9, 47-59.
- Delgadillo, J.A., Canedo, G.A., Chemineau, P., Guillaume, D., Malpoux, 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, J.A., Fitz-Rodríguez, G., Duarte, G., Véliz, F. G., Carrillo, E., Flores, J.A., Malpoux, B., 2004. Management of photoperiod to control caprine reproduction in the subtropics. *Reprod., Fertil. Dev.* 16, 471-478.
- Delgadillo, J.A., Cortez, M.E., Duarte, G., Chemineau, P., Malpoux, B., 2004. Evidence that the photoperiod controls the annual changes in testosterone secretion, testicular and body weight in subtropical male goats. *Reprod. Nutr. Dev.* 44, 183-93.

- Duarte, G., Flores, J.A., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., 2008. Reproductive seasonality in female goats adapted to a subtropical environment persists independently of food availability. *Dom. Anim. Endocrinol.* 35, 362-370.
- Fitz-Rodriguez, G., De Santiago-Miramontes, M.A., Scaramuzzi, R.J., Malpoux, B., 2009. Nutritional supplementation improves ovulation and pregnancy rates in female goats managed under natural grazing conditions and exposed to the male effect. *Anim. Reprod. Sci.* 116, 85-94.
- Gonzalez-Bulnes, A., Meza-Herrera, C.A., Rekik, M., Ben Salem, J., Kridli, R.T. 2011. Limiting factors and strategies for improving reproductive outputs of small ruminants reared in semi-arid environments. In: Degenovine, K.M. (Ed), *Semi-arid Environments: Agriculture, Water Supply and Vegetation*. Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 41-62.
- Katz, L.S., 2007. Sexual behavior of domesticated ruminants. *Horm. Behav.* 52, 56-63.
- Liesegang, A., Risteli, J., Wanner, M., 2007. Bone metabolism of milk goats and sheep during second pregnancy and lactation in comparison to first lactation. *J. Anim. Phys. Anim. Nutr.* 91, 217-225.
- Llewelyn, C.A., Perrie, J., Luckins, A.G, Munro, C.D., 1999. Estrus in the British white goat: Timing of plasma luteinizing hormone surge and changes in behavioral and vaginal traits in relationship to onset of oestrus. *J. Brit. Vet.* 49, 171-182.
- Mellado, M., Cardenas, C., Ruiz, C.F., 2000. Mating behavior of bucks and does in goat operations under range conditions. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 67, 89-96.
- Mellado, M., Valdez, R., Lara, L.L., García, J.E., 2004. Risk factors for conception abortion and kidding rates of goats under extensive conditions. *Small Rum. Res.* 55, 191-198.
- Pellicer-Rubio, M.T., Leboeuf, B., Bernelas, D., Forgerit, Y., Pougard, J.L., Bonné, J.L., 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. *Anim. Reprod. Sci.* 98, 241-258.
- Rivas-Muñoz, R., Fitz-Rodríguez, G., Poindron, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., 2007. Stimulation of estrous behavior in grazing female goats by continuous or discontinuous exposure to males. *J. Anim. Sci.* 85, 1257-1263.
- Rivera-Lozano, M.T., Diaz-Gomez, M.O., Urrutia-Morales, J., Vera-Ávila, H., Gamez-Vázquez, H., Villagomez-Amezcu, Manjarrez, E., Arechiga-Flores C., Escobar Medina F. J., 2011. Seasonal variation in ovulatory activity of Nubian, Alpine and Nubian × Criollo does under tropical photoperiod (22° N). *Trop. Subtrop. Agroecosystems.* 14, 973-980.
- Santucci, P.M., Maestrini, O., 1985. Body conditions of dairy goats in extensive systems of production: method of estimation. *Ann. Zootech.* 34, 473-474.

- Ungerfeld, R., Ramos, M.A., Möller, R., 2006. Role of the vomeronasal organ on ram's courtship and mating behaviour, and on mate choice among oestrous ewes. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 99, 248–252.
- Urrutia-Morales, J., Meza-Herrera, C.A, Tello-Varela, L., Diaz-Gomez, M.O., Beltran-Lopez, S., 2012. Effect of nutritional supplementation upon pregnancy rates of goats under semiarid rangelands and exposed to the male effect. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 1473-1477.
- Veliz, F.G., Meza-Herrera, C.A., De Santiago-Miramontes, M.A., Arellano-Rodriguez, G., Leyva, C., Rivas-Muñoz, R., Mellado, M., 2009. Effect of parity and progesterone priming on induction of reproductive function in Saanen goats by buck exposure. *Livest. Sci.* 125, 261–265.
- Veliz, F.G., Poindron, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., 2006. Positive correlation between the liveweight of anestrus goats and their response to the male effect with sexually active bucks. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 657-661.
- Okamura, H., Murata, K., Sakamoto, K., Wakabayashi, Y., Ohkura, S., Takeuchi, Y., Mori, Y., 2010. Male Effect Pheromone Tickles the Gonadotrophin-Releasing Hormone Pulse Generator. *J. Neuroendocrinol.* 22, 825–832.

## Tables

**Table 1.** Distribution of appetitive and consummatory sexual behaviors of mixed dairy-breed testosterone treated (TTB) and non-testosterone treated bucks (NTTB) exposed to divergent low (LMFR) and high (HMFR) male-to-female ratio exposed to anovulatory mixed dairy-breed female goats (1 h x 2 d) to perform an appetitive sexual behavior test (ASB) and a consummatory sexual behavior test (CSB) during the traditional male reproductive resting season (Spring) at 26° N.

	<b>Testosterone</b>			<b>M:F Ratio</b>			<i>S.E</i>
	<b>TTB</b>	<b>NTTB</b>	<i>OSL<sup>a</sup></i>	<b>LMFR</b>	<b>HMFR</b>	<i>SL<sup>a</sup></i>	
<b>Bucks (n)</b>	4	4		4	4		
<b><i>Appetitive sexual behavior (%)</i></b>	<b>91.9</b>	<b>8.1</b>	<b>0.000</b>	<b>35.0</b>	<b>65.0</b>	<b>000</b>	<b>13.8</b>
Flehmen (n)	31	1	0.000	14	18	0.156	4.45
Ano-genital Sniff (n)	170	22	0.000	66	126	0.002	25.41
Approaches (n)	59	0	0.000	19	40	0.049	9.53
<b><i>Consummatory sexual behavior (%)</i></b>	<b>100.0</b>	<b>0</b>	<b>0.000</b>	<b>58.3</b>	<b>41.7</b>	<b>0.236</b>	<b>14.8</b>
Attempted mounts (n)	11	0	0.006	6	5	0.274	1.60
Complete Mounts (n)	1	0	0.414	1	0	0.414	0.25

<sup>a</sup> Observed significance level

**Table 2.** Sexual behavior of testosterone (TTB) and non-testosterone treated (NTTB) bucks at a high (HMFR) or low (LMFR) male-to-female ratio on a 24-h experimental period according to day or night during the traditional male reproductive resting season and female anestrous season (Spring) at 26°N.

	Testosterone						M:F ratio						S.E
	Day			Night			Day			Night			
	TTB	NTTB	OSL <sup>a</sup>	TTB	NTTB	OSL <sup>a</sup>	LMFR	HMFR	OSL <sup>a</sup>	LMFR	HMFR	OSL <sup>a</sup>	
Attempted mounts (n)	121	0	0.000	82	0	0.000	69	52	0.273	27	55	0.026	7.48
Complete mounts (n)	241	0	0.000	155	0	0.000	96	145	0.025	51	104	0.002	1.9
Mounts with ejaculation (n)	57	0	0.000	45	0	0.000	21	36	0.156	19	26	0.459	0.95

<sup>a</sup> Observed significance level



**Table 3.** Sexual behavior and reproductive outcomes mixed dairy-breed goats exposed to either testosterone (TTB) and non-testosterone treated (NTTB) bucks at a high (HMFR) or low (LMFR) male-to-female ratio during the traditional male reproductive resting season and female anestrus season (Spring) at 26°N.

	Testosterone			Male Male-to-Female F Ratio			S.E
	TTB	NTTB	OSL <sup>a</sup>	LMFR	HMFR	OSL <sup>a</sup>	
<b>Females (n)</b>	30	30		20	40		
Interval to onset of tail wagging (h)	50.9	0	0.001	46.9	54.9	0.576	4.10
Interval to onset of estrus (h)	70.1	0	0.001	66.1	74.2	0.629	6.42
Estrus response (n)	26/30	0/30	0.001	9/20	17/40	0.014	7.99
Pregnancy rate (n) <sup>b</sup>	25/30	0/30	0.001	8/20	17/40	0.196	7.99
Kidding rate (n) <sup>c</sup>	8/30	0/30	0.001	2/20	6/40	0.431	2.42
Fetal losses (n)	17/25	0/25	0.001	6/8	11/17	0.002	4.25
Prolificacy (n)	1.9	0/30	0.001	2.0	1.8	0.582	0.07

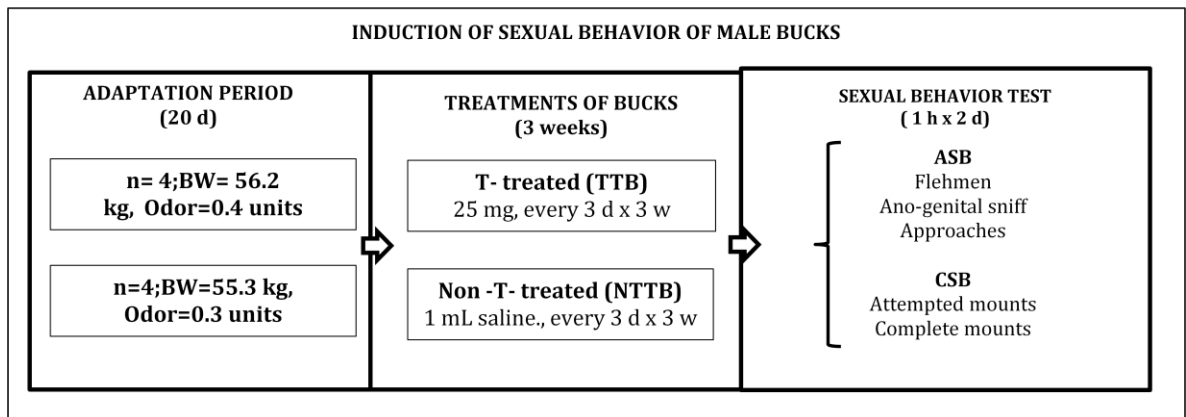
<sup>a</sup> Observed significance level

<sup>b</sup> Pregnancy rate detected by ultrasound at around 45 days of pregnancy

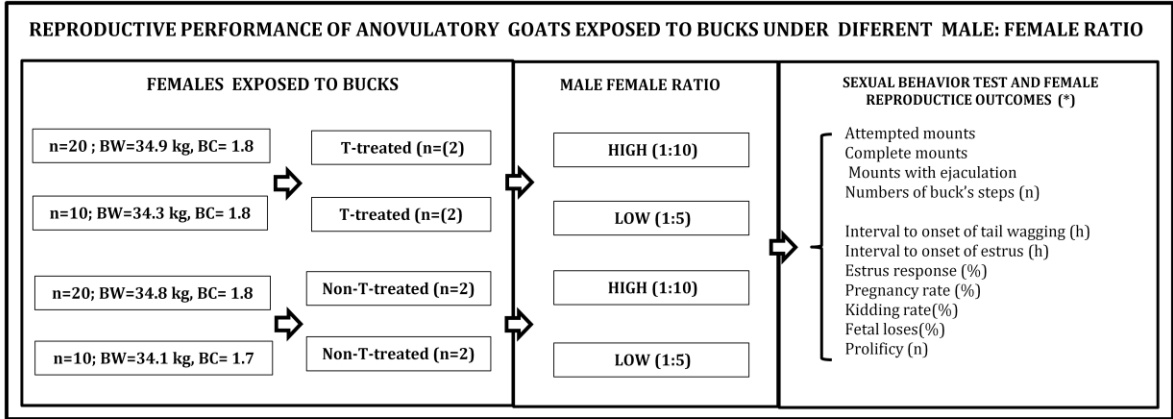
<sup>c</sup> Kidding rate including all does served during the mating period

## Figures

**Figure 1.** Experimental design for induction of sexual behavior of mixed dairy-breed bucks: Testosterone-treated bucks (TTB, n=4) and Non-Testosterone-treated bucks (NTTB, n=4) exposed to anovulatory mixed dairy-breed female goats (1 h x 2 d) to perform an appetitive sexual behavior test (ASB) and a consummatory sexual behavior test (CSB) during the traditional male reproductive resting season (Spring) at 26°N.

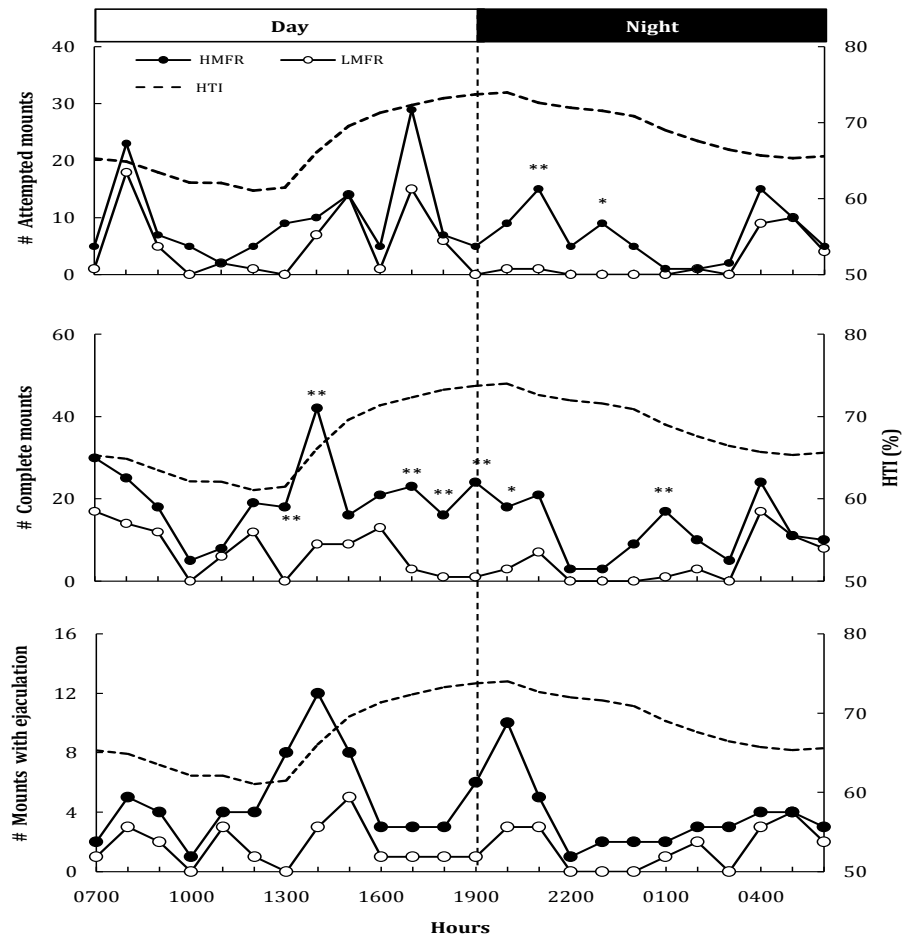


**Figure 2.** Experimental design to evaluate sexual behavior of mixed dairy-breeds bucks (n=8) receiving two levels of exogenous testosterone (TTB and NTTB) and with either high (HMFR) or low (LMFR) male-to-female ratios while to mixed dairy-breed anovulatory adult goats (n=60) depicting their main sexual and reproductive outcomes during the traditional male reproductive resting season and the female anestrus season (Spring) at 26°N.

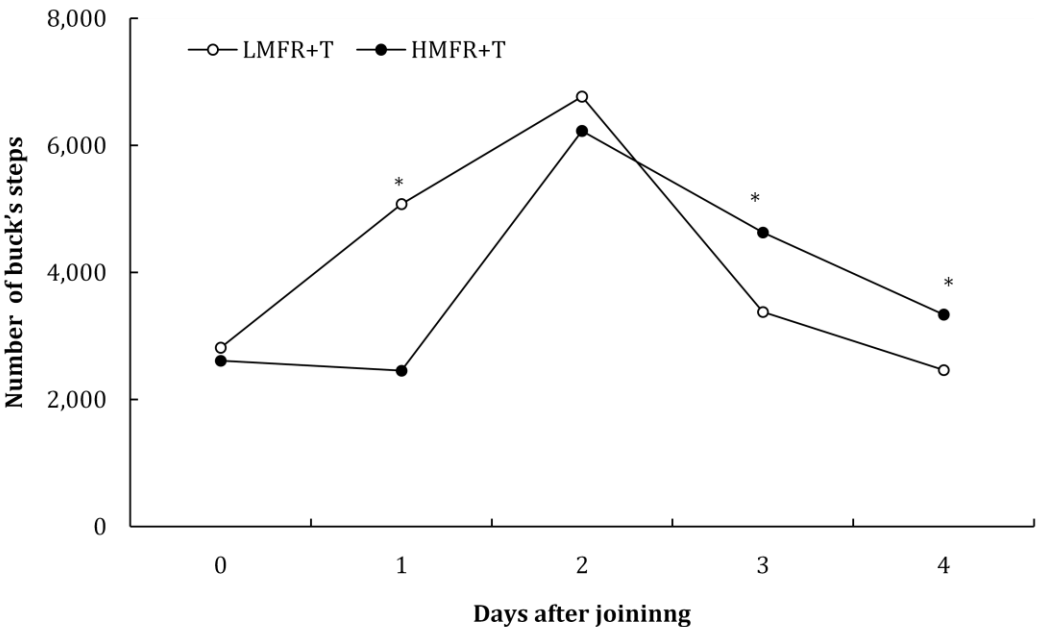


(\*) Registered with a closed-circuit tv system (DVR four channels h.264 CCTV) throughout 24 h x 5 d .

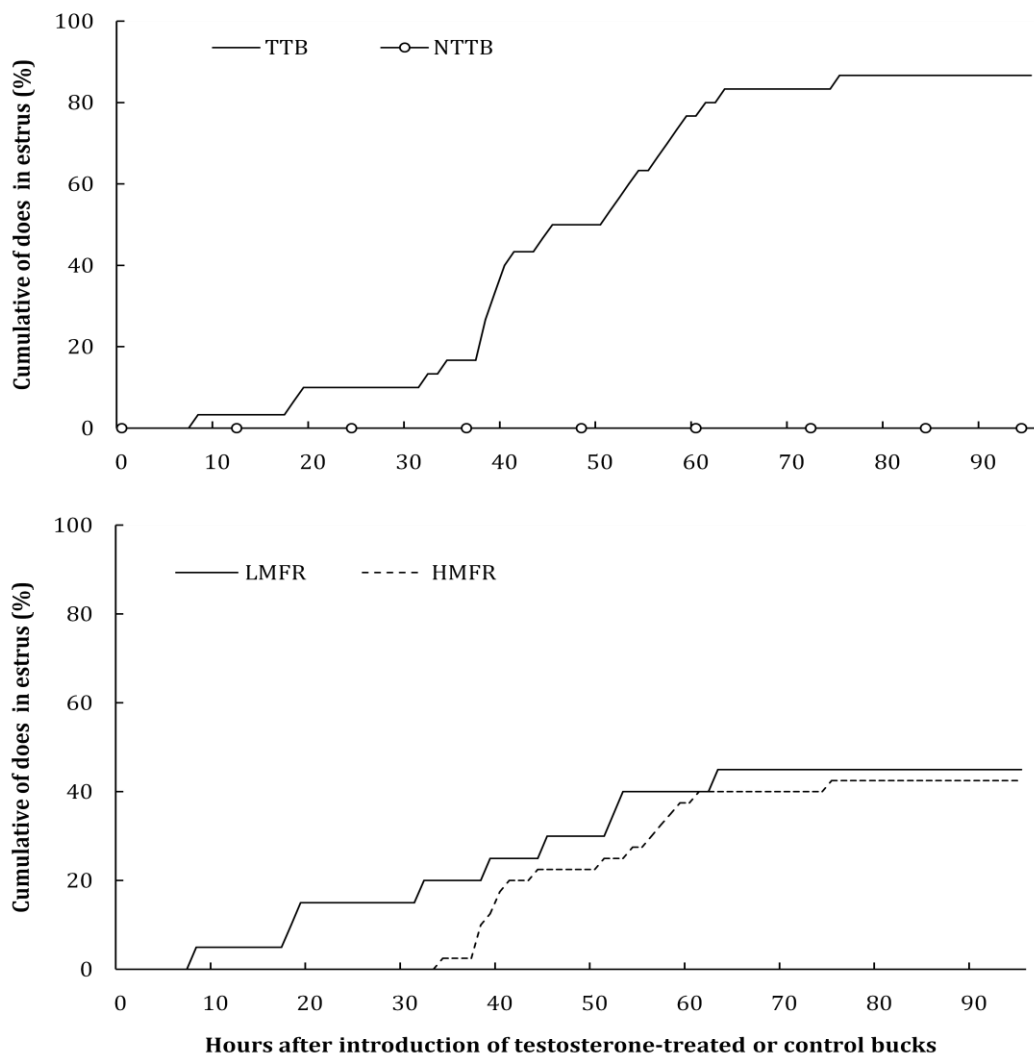
**Figure 3.** Consummatory sexual behavior considering the variables attempted mounts, completed mounts and mounts with ejaculation of mixed dairy-breed bucks (n=8) at either high (HMFR) or low (LMFR) male-to-female ratios, when exposed to mixed dairy-breed anovulatory adult goats in relation to the temperature-humidity index (THI; every hour x 24 h) and according to day or night during the traditional male reproductive resting season and female anestrus season (Spring) at 26°N. (\* p<0.05 \*\* p<0.01).



**Figure 4.** Walking activity considering the total number of steps exhibited during a 5-d experimental breeding period of the TTB-mixed dairy-breed bucks at either high (HMFR, black circles) or low (LMFR, white circles) male-to-female ratios while exposed to mixed dairy-breed anovulatory adult goats during the traditional male reproductive resting season and the female anestrus season (Spring) at 26°N. (\* p<0.05).



**Figure 5.** Cumulative percentage of goats exhibiting estrus behavior when exposed to either to mixed dairy-breed bucks receiving two levels of exogenous testosterone (TTB and NTTB) [upper panel] or when exposed to either high (HMFR) or low (LMFR) male-to-female ratios [bottom panel] during the traditional male reproductive resting season and the female anestrus season (Spring) at 26°N.



## 5. CONCLUSIONES

En conclusión, la aplicación de testosterona exógena en machos cabríos en época de reposo sexual induce su comportamiento sexual, y estos machos expuestos a diferentes proporciones macho: hembra durante las 24 h estimula el comportamiento estral de hembras anovulatorias y este comportamiento sexual de los machos no es influenciada por la temperatura, humedad e ITH, sin embargo, el comportamiento sexual de los machos durante las 24 horas es mayor durante el día que la noche, además la aplicación de testosterona exógena en machos sexualmente inactivos provoca un incremento de la testosterona sérica al mismo tiempo que induce un intenso comportamiento sexual y mejora la calidad del semen.

## 6. LITERATURA CITADA

- Álvarez, L. y L. A. Zarco. 2001. Los fenómenos de bioestimulación sexual en ovejas y cabras. *Vet Méx* 32: 117-129.
- Arrebola, F., C. C. Pérez-Marín y J. Santiago-Moreno. 2010. Limitation of seasonality in reproductive parameters of Mediterranean bucks, using photoperiod treatment. *Small Ruminant Research* 89: 31-35.
- Arroyo, J. 2011. Reproductive seasonality of sheep in Mexico. *Tropical and Subtrop Agroecosyst* 14: 829-845.
- Avdi, M., M. Driancourt y P. Chemineau. 1993. Variations saisonnières du comportement d'oestrus et de l'activité ovulatoire chez les brebis Chios et Serres en Grèce. *reproduction Nutr Dev* 33: 15-24.
- Barkawi, A. H., E. H. Elsayed, G. Ashour y E. Shehata. 2006. Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. *Small Rumin Res* 66: 209-213.
- Barrell, G. K., S. M. Moenter, A. Caraty y F. J. Karsch. 1992. Seasonal changes of gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe. *Biol Reprod* 46: 1130-1135.
- Batailler, M., A. Caraty, B. Malpoux y Y. Tillet. 2004. Neuroanatomical organization of gonadotropin-releasing hormone neurons during the oestrus cycle in the ewe. *BMC Neurosci* 5: 46.
- Benavente, M. F., M. R. Fresno y J. V. Delgado. 2007. Testicular size in Tinerfeño buck. *Tec Pec Méx* 56: 551-556.
- Bustos-Obregón, E. y L. Torres-Díaz. 2012. Seasonal Reproduction in the Male. *Int J Morphol* 30: 1266-1279.
- Caraty, A., C. Decourt, C. Briant y M. Beltramo. 2012. Kisspeptins and the reproductive axis: potential applications to manage reproduction in farm animals. *Domest Anim Endocrinol* 43: 95-102.
- Carrillo, E., C. A. Meza-Herrera y F. G. Véliz. 2010. Reproductive seasonality of young French-Alpine goat bucks adapted to subtropical conditions in Mexico. *Rev Mex Cienc Pec* 1: 169-178.
- Carrillo, E., F. G. Véliz, J. A. Flores y J. A. Delgadillo. 2007. A diminution in the male/female ratio does not reduce the ability of sexually active male goats to induce estrus activity in anovulatory female goats. *Tec Pec Méx* 45: 319-328.
- Clarke, I. J. y A. Caraty. 2013. Kisspeptin and seasonality of reproduction. *Adv Exp Med Biol* 784: 411-430.
- Clarke, I. J., J. T. Cummins, J. K. Findlay, K. J. Burman y B. W. Doughton. 1984. Effects on plasma luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone of varying the frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone pulses in ovariectomized ewes with hypothalamo-pituitary disconnection. *Neuroendocrinology* 39: 214-221.
- Crocker, K. P., L. G. Butler, M. A. Johns y S. C. McColm. 1982. Induction of ovulation and cyclic activity in anestrus ewes with testosterone treated wethers and ewes. *Theriogenology* 17: 349-354.
- Cueto, M., A. Gibbons, M. R. Lanari, H. Tadeo y R. Albeiro. 2003. Estacionalidad reproductiva en Cabras Criollas Neuquinas de Patagonia Argentina VI congreso Iberoamericano de Razas Criollas y Autóctonas. p 1-2, Recife, Brasil.
- Chemineau, P. 1987. Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrous cycles in anovulatory goats - a review. *Livestock Production Science* 17: 135-147.



- Chemineau, P. 1993. Reproduction in Native Goats of the Tropical Zones. *Rev Cient FCV-LUZ* 3: 167-172.
- Chemineau, P., G. Baril, B. Leboeuf, M. C. Maurel, F. Roy, M. Pellicer-Rubio, B. Malpaux y Y. Cognie. 1999. Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. *J Reprod Fertil Suppl* 54: 129-142.
- Chemineau, P., L. Bodin, M. Migaud, J. C. Thiery y B. Malpaux. 2010. Neuroendocrine and genetic control of seasonal reproduction in sheep and goats. *Reprod Domest Anim* 45 Suppl 3: 42-49.
- Chemineau, P., A. Daveau, F. Maurice y J. A. Delgadillo. 1992a. Seasonality of estrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod. *Small Rum Res* 8: 299-312.
- Chemineau, P., A. Daveau, J. Pelletier, B. Malpaux, F. J. Karsch y C. Viguie. 2003a. Changes in the 5-HT<sub>2A</sub> receptor system in the pre-mammillary hypothalamus of the ewe are related to regulation of LH pulsatile secretion by an endogenous circannual rhythm. *BMC Neurosci* 4: 1.
- Chemineau, P. y J. A. Delgadillo. 1993a. Neuroendocrinología de la reproducción en el caprino *Rev Cient* 3: 113-121.
- Chemineau, P. y J. A. Delgadillo. 1993b. Reproductive neuroendocrinology in goats revista Mexicana, *FCV-LUZ* 3: 112-121.
- Chemineau, P. y J. A. Delgadillo. 1993c. Reproductive neuroendocrinology in goats. *Rev Cient FCV-LUZ* 3: 112-121.
- Chemineau, P., D. Guillaume, M. Migaud, J. C. Thiery, M. T. Pellicer-Rubio y B. Malpaux. 2008. Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 2: 40-47.
- Chemineau, P., B. Malpaux, J. A. Delgadillo, Y. Guérin, J. P. Ravault, J. Thimonier y J. Pelletier. 1992b. Control of sheep and goat reproduction: Use of light and melatonin. *Animal Reproduction Science* 30: 157-184.
- Chemineau, P., H. Morrello, J. Delgadillo y B. Malpaux. 2003b. Estacionalidad reproductiva en pequeños rumiantes: mecanismos fisiológicos y técnicas para la inducción de una actividad sexual a contra-estación 3er Congreso ALEPRYCS: 1-18.
- Chemineau, P. y J. Thimonier. 1986. Methods for evaluation of reproductive and growth rate performance in local breeds of tropical sheep and goats in an experimental station *World Rev Anim Prod* 22: 27-33.
- Choe, C. Y., J. G. Kim, S. R. Cho, D. S. Son, Y. K. Kim, S. Balasubramanian, R. Sang-Yong y G.-. Jin. 2006. Influence of seasons, extenders, slow and rapid freezing on seminal characters in Korean native bucks. *Reprod Dom Anim* 41: 55-60.
- De la Isla-Herrera, G., J. R. Aké-López, A. Ayala-Burgos y A. González-Bulnes. 2010. Effect of body condition and season of the year on estrous cycle, estrous, follicular development and ovulation rate in Pelibuy ewes under tropical conditions. *Veterinaria Mexico* 41: 167-175.
- Delgadillo, J. A. 2005. Inseminación artificial en caprinos. Ed Trillas ed, México.
- Delgadillo, J. A., G. A. Canedo, P. Chemineau, D. Guillaume y B. Malpaux. 1999. Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male Creole goats in subtropical northern Mexico. *Theriogenology* 52: 727-737.
- Delgadillo, J. A., E. Carrillo, J. Moran, G. Duarte, P. Chemineau y B. Malpaux. 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., M. E. Cortez, G. Duarte, P. Chemineau y B. Malpaux. 2004. Evidence that the photoperiod controls the annual changes in testosterone secretion, testicular and body weight in subtropical male goats. *Reprod Nutr Dev* 44: 183-193.
- Delgadillo, J. A., G. Duarte Moreno, J. A. Flores Cabrera, B. Malpaux, P. Poindron Massot, J. Vielma Sifuentes y F. G. Véliz Deras. 2003a. Control de la reproducción de los caprinos del subtrópico mexicano utilizando tratamientos fotoperiódicos y efecto macho. *Veterinaria México* 34: 69-79.
- Delgadillo, J. A., J. A. Flores, F. G. Véliz, G. Duarte, J. Vielma, H. Hernandez y I. G. Fernandez. 2006. Importance of the signals provided by the buck for the success of the male effect in goats *Reprod. Nutr. Dev.* 46: 391-400.
- Delgadillo, J. A., J. A. Flores, F. G. Véliz, G. Duarte, J. Vielma, P. Poindron y B. Malpaux. 2003b. Control de la reproducción de los caprinos del subtrópico mexicano utilizando tratamientos con fotoperiodo y efecto macho. *Vet Méx* 34: 69-79.
- Delgadillo, J. A., J. A. Flores, F. G. Veliz, H. F. Hernandez, G. Duarte, J. Vielma, P. Poindron, P. Chemineau y B. Malpaux. 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.
- Delgadillo, J. A., B. Leboeuf y P. Chemineau. 1993. Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles. *Reprod Nutr Dev* 33: 609-617.
- Delgadillo, J. A. y L. I. Vélez. 2010. Stimulation of reproductive activity in anovulatory Alpine goats exposed to bucks treated only with artificially long days. *Animal* 4: 2012-2016.
- Duarte, G., M. P. Nava-Hernandez, B. Malpaux y J. A. Delgadillo. 2010. Ovulatory activity of female goats adapted to the subtropics is responsive to photoperiod. *Anim Rep Sci* 120: 65-70.
- Hötzel, M. J., G. B. Martin y C. M. Markey. 1993. Effect of nutrition on testicular function of rams immunised against GnRH. *Proceedings of the Endocrine Society of Australia* 36: 102.
- Jackson, G. L., M. Gibson y D. Kuehl. 1988. Photoperiodic Disruption of Photorefractoriness in the Ewe. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 38: 127-134.
- Kimoto, H. y K. Touhara. 2005. Induction of c-Fos Expression in Mouse Vomeronasal Neurons by Sex-specific Non-volatile Pheromone(s). *Chem Sci* 30: 146-147.
- Kitahashi, T. y I. S. Parhar. 2013. Comparative aspects of kisspeptin gene regulation. *Gen Comp Endocrinol* 181: 197-202.
- Lincoln, G. A., C. E. Lincoln y A. S. McNeilly. 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. *J Reprod Fertil* 88: 623-633.
- Luna-Orozco, J. R., J. M. Guillen-Muñoz, M. A. De Santiago-Miramontes, J. E. García, R. Rodriguez-Martinez, C. A. Meza-Herrera, M. Mellado y F. G. Veliz. 2012. Influence of sexually inactive bucks subjected to long photoperiod or testosterone on the induction of estrus in anovulatory goats. *Trop Anim Hlth Prod* 44: 71-75.
- Malpaux, B., A. Daveau, F. Maurice, V. Gayrard y J. C. Thiery. 1993. Short-day effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. *Biol Reprod* 48: 752-760.
- Malpaux, B., A. Daveau, F. Maurice, A. Locatelli y J. C. Thiery. 1994. Evidence that melatonin binding sites in the pars tuberalis do not mediate the photoperiodic actions of melatonin on LH and prolactin secretion in ewes. *J Reprod Fertil* 101: 625-632.

- Malpoux, B., M. Migaud, H. Tricoire y P. Chemineau. 2001. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms* 16: 336-347.
- Malpoux, B., S. M. Moenter, N. L. Wayne, C. J. Woodfill y F. J. Karsch. 1988. Reproductive refractoriness of the ewe to inhibitory photoperiod is not caused by alteration of the circadian secretion of melatonin. *Neuroendocrinology* 48: 264-270.
- Malpoux, B., C. Viguie, D. C. Skinner, J. C. Thiery y P. Chemineau. 1997. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Res Bull* 44: 431-438.
- Martin, G. B. y G. Banchemero. 1999. Symposium on Goat Reproduction Investigación Australiana en Reproducción de Caprinos, Colegio de Postgraduados, Programa de Ganadería, Montecillo, México.
- Martin, G. B., R. Boukhliq, S. Tjondronegoro, M. J. Hötzel y J. S. Fisher. 1992. The effects of nutrition on reproductive endocrinology. *Proceedings of the Nutrition Society of Australia* 17: 177-185.
- Mellado, M., C. Cardenas y F. Ruiz. 2000. Mating behavior of bucks and does in goat operations under range conditions. *Appl Anim Behav Sci* 67: 89-96.
- Mogi, K., K. Sakurai, T. Ichimaru, S. Ohkura, Y. Mori y H. Okamura. 2007. Structure and chemical organization of the accessory olfactory bulb in the goat. *Anat Rec (Hoboken)* 290: 301-310.
- Okamura, H. y Y. Mori. 2005. Characterization of the primer pheromone molecules responsible for the 'male effect' in ruminant species. *Chem Senses* 30 Suppl 1: i140-141.
- Okamura, H., K. Murata, K. Sakamoto, Y. Wakabayashi, S. Ohkura, Y. Takeuchi y Y. Mori. 2010. Male effect pheromone tickles the gonadotrophin-releasing hormone pulse generator. *J Neuroendocrinol* 22: 825-832.
- Polat, H., G. Dellal, I. Baritci y E. Pehlivan. 2012. Annual Change of the Testosterone Hormone in Male White Goats. *Agricultural Sciences in China* 10: 312-316.
- Porras-Almeraya, A., L. A. Zarco-Quintero y J. Valencia-Méndez. 2003a. Estacionalidad reproductiva en ovejas. *CIENCIA VETERINARIA* 9: 1-34.
- Porras-Almeraya, A., L. A. Zarco-Quintero y J. Valencia-Méndez. 2003b. Estacionalidad reproductiva en ovejas. *Cienc Vet* 9: 1-34.
- Restall, B. J. 1992. Seasonal variation in reproductive activity in Australian goats. *Anim Reprod Sci* 27: 305-318.
- Rivas-Muñoz, R., E. Carrillo, R. Rodriguez-Martinez, C. Leyva, M. Mellado y F. G. Véliz. 2010. Effect of body condition score of does and use of bucks subjected to added artificial light on estrus response of Alpine goats. *Trop Animal Hlth Prod* 42: 1285-1289.
- Rosa, H. J. D. y M. J. Bryan. 2002. The "ram effect" as a way of modifying the reproductive activity in the ewe *Small Ruminant Research* 45: 1-16.
- Rosales-Nieto, C. A., J. Urrutia-Morales, H. Gámez-Vázquez, M. O. Díaz-Gomez y B. M. Ramírez-Andrade. 2006. The influence of feeding level on the reproductive activity of Mexican native goats during the reproductive season *Técnica Pecuaria en México* 44: 399-406.
- Santiago-Moreno, J., A. Gomez-Brunet, A. Gonzalez-Bulnes, A. Toledano-Diaz, B. Malpoux y A. Lopez-Sebastian. 2005a. Differences in reproductive pattern between wild and domestic rams are not associated with inter-specific annual variations in plasma prolactin and melatonin concentrations. *Domest Anim Endocrinol* 28: 416-429.
- Santiago-Moreno, J., A. Toledano-Díaz, C. Castavo, M. A. Coloma, M. C. Estesos, M. T. Prieto, J. A. Delgadillo y A. López-Sebastian. 2005b. Photoperiod and melatonin treatments for controlling sperm parameters, testicular and accessory sex glands size in male Iberian ibex: A model for captive mountain ruminants. *139: 45-52.*

- Signoret, J. P., W. J. Fulkerson y D. R. Lindsay. 1982. Effectiveness of testosterone-treated wethers and ewes as teasers. *Applied Animal Ethology* 9: 37-45.
- Squires, E. J. 2003. *Applied Animal Endocrinology*. CABI Publishing is a division of CAB International, Cambridge, MA 02139 USA.
- Thiery, J. C., D. Lomet, S. Bougoin y B. Malpoux. 2009. Turnover rate of cerebrospinal fluid in female sheep: changes related to different light-dark cycles. *Cerebrospinal Fluid Res* 6: 9.
- Thiery, J. C., D. Lomet, M. Schumacher, P. Liere, H. Tricoire, A. Locatelli, P. Delagrangue y B. Malpoux. 2006. Concentrations of estradiol in ewe cerebrospinal fluid are modulated by photoperiod through pineal-dependent mechanisms. *J Pineal Res* 41: 306-312.
- Thimonier, J. 1981. Control of seasonal reproduction in sheep and goats by light and hormones. *J Reprod Fertil Suppl* 30: 33-45.
- Tilbrook, A. J., D. M. de Kretser y I. J. Clarke. 1993. Human recombinant inhibin A and testosterone act directly at the pituitary to suppress plasma concentrations of FSH in castrated rams. *J Endocrinol* 138: 181-189.
- Tilbrook, A. J., D. M. de Kretser y I. J. Clarke. 1999. Seasonal changes in the negative feedback regulation of the secretion of the gonadotrophins by testosterone and inhibin in rams. *J Endocrinol* 160: 155-167.
- Tricoire, H., A. Locatelli, P. Chemineau y B. Malpoux. 2002. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology* 143: 84-90.
- Tricoire, H., M. Moller, P. Chemineau y B. Malpoux. 2003. Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reprod Suppl* 61: 311-321.
- Ungerfeld, R. y D. Fila. 2011. Testicular Fluid Content Evaluated by Ultrasound Image Computer-Assisted Analysis Increases with Small-Dose Multiple GnRH Injections in Rams. *Reprod Dom Anim* 46: 720-723.
- Véliz, F. G., S. Moreno, G. Duarte, J. Vielma, P. Chemineau, P. Poindron, B. Malpoux y J. A. Delgadillo. 2002. Male effect in seasonally anovulatory lactating goats depends on the presence of sexually active bucks, but not estrous females. *Animal Reproduction Science* 72: 197-207.
- Veliz, F. G., P. Poindron, B. Malpoux y J. A. Delgadillo. 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. y B. J. Restall. 1996. Environmental and social factors affecting reproduction. VI Int Conf on Goats, China.
- Walkden-Brown, S. W., B. J. Restall, B. W. Norton, R. J. Scaramuzzi y G. B. Martin. 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., B. J. Restall y W. A. Taylor. 1994b. Testicular and epididymal sperm content in grazing Cashmere bucks: seasonal variation and prediction from measurements in vivo. *Reprod Fertil Dev* 6: 727-736.
- Zarazaga, L. A., M. C. Gatica, I. Celi, J. L. Guzman y B. Malpoux. 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.
- Zarazaga, L. A., M. C. Gatica, I. Celi, J. L. Guzmán y B. Malpoux. 2010. Effect of artificial long days and/or melatonin treatment on the sexual activity of Mediterranean bucks. *Small Rumin Res* 93: 110-118.

