

AMINOÁCIDOS NEUROEXCITADORES, FUNCION OVARICA Y PATRON DE SECRECION DE LA HORMONA LUTEINIZANTE EN CABRAS BAJO FOTOPERIODOS CRECIENTES

C.A. Meza Herrera¹, J.I. López Medrano¹, R.M. Rincón Delgado²,
R. Bañuelos Valenzuela², C.F. Aréchiga Flores², J.M. Flores Nájera³

¹Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas
² Universidad Autónoma de Zacatecas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
³ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

RESUMEN. Se evaluó el efecto de la suplementación de aminoácidos excitadores sobre actividad ovárica total (AOT) de cabras adultas bajo fotoperíodos crecientes, considerando los componentes folículos totales (FT, $< > 5$ mm) y cuerpos lúteos totales (CLT), así como patrón de secreción de la hormona luteinizante (LH) considerando la pulsatilidad (PULSE), amplitud (AMPLI) e intervalo inter-pulso (INTERPU). La investigación se desarrolló en la Unidad de Investigación Caprina Sur, URUZA-UACH, localizada entre los 25° LN y 103° LO, a 1117 msnm, durante febrero a mayo del 2003. Las cabras (n=20) fueron aleatoriamente distribuidas en dos grupos experimentales: 1). Aminoácidos Excitadores (AAE, n=10; PV=43.85±3.2 kg, con 7 mg de glutamato /kg⁻¹ PV, i.v.) y 2). Control (CONT, n=10; PV=44.75±3.04 kg), recibiendo una dieta base de heno de alfalfa (14% PC; 1.14 Mcal kg⁻¹ ENm) y maíz rolo (11.2% PC), con agua, sombra y sales minerales a libre acceso. Una vez sincronizadas estrualmente y hacia la fase folicular media, se realizó un muestreo intensivo de sangre (6 h x 15 min.) para evaluar los niveles séricos de LH. Durante la fase lútea tardía (d 19) se realizó el estudio ultrasonográfico de la actividad ovárica, considerando número de FT, AOT (CLT+FT). Los promedios para FT, AOT y LH fueron 2.35, 4.15 y 1.24 ng mL⁻¹ sin diferir (P>0.10) entre tratamientos. Sin embargo, las cabras suplementadas, paralelo a un incremento en CLT (P=0.07), mostraron mayor (P=0.05) PULSE, y reducción (P=0.004) en INTERPU. La suplementación de glutamato en cabras adultas 7/8 Alpino-Saanen x Criollo, bajo fotoperíodo creciente, afectó positivamente CLT y CLT+FA así como el patrón de secreción de LH.

Palabras clave: Cabras, glutamato, actividad ovárica, hormona luteinizante.

SUMMARY. The effect of excitatory amino acid supplementation was evaluated upon total ovarian activity (AOT) in adult goats under increased photoperiods, considering its components total follicles (FT, $< > 5$ mm) and total corpus luteum (CLT) number, as well as the pattern of secretion of luteinizing hormone (LH) considering pulse (PULSE), amplitude (AMPLI) and interval inter-pulse (INTERPU), was evaluated. This research was conducted at the Southern Goat Research Unit, URUZA-UACH, located between the 25° LN and 103° LO, at 1,117 m.a.s.l, from February to May 2003. Goats (n=20) were randomly assigned to one of two experimental groups, 1). Excitatory amino acids (AAE; n=10, BW=43.85±3.2 kg, with 7 mg glutamate/kg⁻¹ PV, i.v.), and 2). Control (CONT. n=12, BW=44.75±3.04 kg), receiving a basal diet of alfalfa hay (14% PC; 1.14 Mcal kg⁻¹ ENm) and rolled corn (11.2% PC), as well as free access to water, mineral salts and shade. Once estrually synchronized and towards the middle follicular phase, an intensive sampling of blood (6 h x 15 min) was performed to evaluate LH serum concentrations. During the late luteal phase (d 19) a transrectal ultrasonographic scanning was performed to evaluate FT, AOT (CLT+FT). The averages for FT, AOT-1 y LH were 2.35, 4.15 y 1.24 ng mL⁻¹ without differences (P>0.10), between treatments. However, supplemented goats parallel to an increment in CLT (P=0.07), depicted the highest (P=0.05) PULSE, as well as a reduction (P=0.004) in INTERPU. Glutamate supplementation in adult goats 7/8 Alpino-Saanen x Criollo, under increased photoperiods, positively affected CLT y CLT+FA as well as the secretion pattern of LH.

Key words: Goats, glutamate, ovarian activity, luteinizing hormone.

INTRODUCCIÓN

La estacionalidad reproductiva representa una adaptación natural que da ventajas importantes para la

sobrevivencia y desarrollo de las crías, sobre todo cuando los partos coinciden con un buen clima y una buena disponibilidad de forraje. Sin embargo el empadre estacional es también un obstáculo importante para un

manejo más sencillo de los ovinos y caprinos, cuando se considera el mercado y los requerimientos económicos (Germán, 2005). En explotaciones productoras de carne es muy importante desarrollar técnicas que induzcan a las hembras a concebir en los momentos precisos del año, frecuentemente fuera de la estación de empadre (Germán, 2005; López *et al.*, 2005).

En los sistemas extensivos más tradicionales, la tendencia reproductiva de estas especies es la de un parto al año; sin embargo, a medida que los sistemas tienden a una mayor intensificación, las prácticas de manejo intentan asociarse con tecnologías de control de la reproducción que permitan alcanzar tres partos en dos años (López *et al.*, 2005). La actividad ovárica en animales domésticos es afectada por el nivel de nutrición en varias etapas y (o) procesos del ciclo reproductivo. En efecto, mientras que una restricción de nutrientes reduce la tasa de crecimiento y retrasa el inicio de la pubertad (Foster, 1994; Sakurai *et al.*, 2004), se ha reportado anestro nutricional no solo en rumiantes (Richards *et al.*, 1991) sino también en monogástricos (Armstrong y Britt, 1987). De acuerdo a Rubio *et al.* (1997), ciertos componentes específicos de la dieta y/o productos metabólicos pueden afectar la función del eje hipotálamo-hipófisis-ovario al incidir en el patrón de secreción de gonadotropinas y en la consecuente respuesta ovárica.

En el mismo sentido, mediadores del estado metabólico y la función reproductiva como la insulina, el eje somatotrópico (GH-IGF's) y la Leptina pueden ser nutricionalmente modificados mediante una suplementación estratégica de corto plazo (Kane *et al.*, 2004). Por lo tanto, ciertos eventos reproductivos pueden ser alterados mediante la suplementación de ciertos compuestos, energéticos o proteicos, en rutas neuroendocrinas dependientes de hormonas metabólicas o de los niveles circulantes de gonadotropinas.

El objetivo fue evaluar el efecto de la suplementación de aminoácidos excitadores sobre la actividad ovárica total, medida como folículos totales y cuerpos lúteos totales en cabras adultas expuestas a fotoperíodo natural creciente. Así como evaluar el efecto de la suplementación de aminoácidos excitadores sobre el patrón de secreción de la hormona luteinizante (LH).

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización del área experimental. El estudio se realizó en la Unidad de Investigación Caprina Sur, de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo. La unidad se localiza

en el municipio de Tlahualilo, Durango, entre las coordenadas UTM 639935 E y 2864331 N (Universal Transversa Mercator), las cuales corresponden a las coordenadas geográficas 25° 53' 31.99" LN y 103° 36' 11.23" LO, a una altura de 1,117 msnm. El clima se clasifica como semidesértico extremo (García, 1981). La temperatura media anual es de 22.3°C, de abril a octubre la temperatura media mensual es superior a 20°C, y de noviembre a marzo, con rangos mensuales entre 13.6°C y 19.4°C. La precipitación promedio anual es de 217.1 mm (Santos, 1973). Durante junio ocurren las temperaturas más altas con más de 40°C y el mes más frío es en enero con temperatura mínima de 4°C (Santos, 1973; García, 1981).

Formación de grupos y diseño experimental. Las cabras (n=20) fueron aleatoriamente distribuidas en dos grupos con peso vivo y condición corporal homogéneos. A cada grupo se le asignó en forma aleatoria uno de los tratamientos: 1) Con suplementación de Aminoácidos excitadores (AAE, n=10, PV=43.85±3.2 Kg.), y 2) Control, sin suplementación (CONT, n=10; PV=44.75±3.04 Kg.). Las cabras del grupo AAE recibieron una infusión endovenosa, a razón de 7 mg kg⁻¹ PV de L-glutamina (C₅H₁₀N₂O₃, Merck, Germany), cada lunes y viernes del periodo del experimento, el cual incluyó del 24 de febrero al 9 de mayo, del 2003, con un total de 20 aplicaciones por cabra. Las cabras del grupo control recibieron una aplicación de agua destilada estéril por vía endovenosa de 2.5 ml, al mismo tiempo que les fue administrado el tratamiento al grupo AAE.

Alimentación de los animales. En el mes de enero bajo condiciones naturales de fotoperíodo, las cabras encastadas hacia Saneen y Alpina, fueron sometidas a un periodo de acondicionamiento durante tres semanas para homogenizar tanto el peso vivo (PV) como la condición corporal (CC), recibiendo una dieta basada en heno de alfalfa (14%, PC) y maíz roloado (11.2%, PC). Los grupos experimentales fueron alimentados dos veces al día, por la mañana (0800) y por la tarde (1800); siguiendo tal esquema de alimentación durante el desarrollo del experimento.

Preparación de la solución buffer. Se pesaron 4 g de L-glutamina en polvo (C₅H₁₀N₂O₃, Merck, Germany) en una balanza analítica y se disolvieron en 50 ml de solución de agua destilada estéril. Posteriormente, la solución fue ajustada a un pH neutro (7.0) con HCL 0.1 N. Todo el proceso de preparación y manejo de la solución se realizó en un ambiente estéril. La solución final contenía 80 mg de L-glutamina mL⁻¹.

Sincronización de estros. Las cabras fueron estrualmente sincronizadas por medio de implantes de

esponjas intravaginales impregnadas de progesterona (P4) (Intervet internacional, Francia), que haría las veces de un cuerpo lúteo. La esponja fue insertada en la cabra por medio de un aplicador de esponjas vaginales Chronogest (Intervet Internacional B.V Boxmeer-Holland). Nueve días posteriores a la colocación de la esponja se aplicó Cloprostenol (Prosolvín C^{MR}, Intervet Internacional B.V Boxmeer-Holland), el cual es un análogo sintético de la PGF2 α a razón de 1 mL animal⁻¹ (0.075 mg mL⁻¹ cabra⁻¹).

Lo anterior con el fin de provocar la regresión de cualquier cuerpo lúteo que se encontrara presente en cualquiera de las cabras y promover una disminución en las concentraciones de P4. De esta forma se desencadena el inicio de una fase folicular, con el consiguiente aumento en la concentración de E2 y LH y la consecuente ovulación. Las esponjas fueron retiradas dos días después de la aplicación de Cloprostenol, debiendo ocurrir a las 48 h la presencia del estro.

Muestreo sanguíneo intensivo. En forma aleatoria fueron seleccionadas cinco cabras por tratamiento para realizar un muestreo sanguíneo intensivo. Las muestras sanguíneas fueron colectadas de cada cabra mediante venopunción de la yugular, utilizando agujas estériles de 0.8 x 38 mm (Precision GlideTM Becton y Dickson, NJ, USA) y tubos colectores estériles Vacutainer de 10 ml (Corvac, Sherwood Medical, Std. Louis, MO) por un periodo de 6 horas a intervalos de 15 minutos.

Una vez en el laboratorio, las muestras se dejaron reposar por 30 minutos a temperatura ambiente hasta observarse la formación de coágulo. Las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 15 minutos. Cada muestra de suero con su réplica fue colectada y almacenada en microtubos de polipropileno MCT-150C (Axygen^{MR} Scientific, Inc., Union City, CA, USA) de 1.5 mL y almacenados a una temperatura de -20° C. en total se colectaron 25 muestra por cabra, 125 por tratamiento y un total de 250 muestras de suero originales.

Cuantificación de la hormona luteinizante. Dado que la hormona luteinizante (LH) muestra un patrón de secreción pulsátil las muestras colectadas a intervalos de 15 minutos durante el muestreo intensivo fueron evaluadas mediante radioinmunoanálisis (RIA), según los procedimientos señalados por Hoefler y Hallford (1987), obteniendo un coeficiente de variación (CV) intra-en ensayo del 16% y un límite de detección de 0.2 ng mL⁻¹. El patrón de secreción de LH consideró los componentes pulsatilidad (PULSE), amplitud (AMPLI) e intervalo entre pulsos (INTER), los cuales fueron

determinados mediante el programa PULSAR (Merriam, 1987); los parámetros G y Baxter fueron usados para la detección de pulsos. Los análisis hormonales fueron realizados en el laboratorio de endocrinología del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Estatal de Nuevo México, EUA

Análisis ultrasonográfico de la actividad ovárica.

El día 17 posterior a la ovulación, ya en fase lútea tardía, la actividad ovárica total fue determinada mediante un análisis ultrasonográfico de las estructuras ováricas. Previo al análisis, las cabras fueron colocadas en una mesa de recumbencia dorsal y sujetadas a la mesa por las extremidades anteriores y posteriores. Se utilizó un equipo Toshiba (Medical Systems, Ltd, Crawley, UK) con un transductor lineal de 7.5 Mhz para uso veterinario. Se aplicó gel obstétrico al transductor, el cual se coloca dentro de un preservativo de látex estéril aplicando nuevamente gel fuera del mismo para que actuara como lubricante y facilitara su inserción transrectal.

El transductor fue introducido por el recto del animal, avanzando hasta la línea medial del recto, el rastreador se dirige hacia la parte ventral del animal hasta que la vejiga y el útero sean identificados (Griffin y Ginther, 1992; Dickie *et al.*, 1999). Una vez localizadas ambas estructuras, una serie de rotaciones bilaterales fueron realizadas, mientras que el transductor se movía en dirección caudal hasta que ambos ovarios fueron localizados.

Todas las evaluaciones ultrasonográficas fueron realizadas por un experto en imagen, quien desconocía cualquier información previa de la cabra o del tratamiento. El número y tipos de estructuras identificados en ambos ovarios, es decir folículos mayores y menores a cinco milímetros, folículos totales, así como total de cuerpos lúteos presentes en las estructuras ováricas fueron registradas y fotografiadas.

Análisis estadísticos. Los pesos corporales, condición corporal, así como la actividad ovárica total, considerando el número de folículos totales y cuerpos lúteos totales, fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) dentro de un diseño completamente al azar con dos tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento (Snedecor y Cochran, 1967). Las concentraciones séricas de LH mediante un ANOVA con un diseño completamente al azar, con un arreglo de parcelas divididas para muestras repetidas en el tiempo (Gill y Hafs, 1971). El efecto de tratamiento fue incluido en la parcela mayor utilizando el término de cabra dentro de tratamiento para calcular el error. El tiempo de muestreo y la interacción del tratamiento por tiempo fueron incluidos en la parcela menor, utilizando el cuadrado

medio residual para probar sus diferencias. En el evento de un efecto significativo, la separación de medias considero el procedimiento PDIFF, para probar sus diferencias mediante el procedimiento LSMEANS del procedimiento GLM (PROC GLM) del SAS (Littell *et al.*, 1991).

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro 1, se concentran las medias para las variables peso vivo, condición corporal, folículos totales, cuerpos lúteos totales, actividad ovárica total, niveles séricos de LH, así como el patrón de secreción de LH de las cabras en estudio. No existieron diferencias ($P > 0.05$) entre tratamientos respecto al PV, CC, FT, AOT así como en la concentración sérica y la AMPLI de LH. Si embargo las variables CLT, LH-PULSE y LH-INTER difirieron entre grupos experimentales a favor del grupo AAE (Cuadro 1).

Estienne *et al.* (1998), reportaron que el tratamiento con NMA (10 mg) Kg^{-1} PV incremento la frecuencia pulsátil de LH en cerdas en fase lútea por un 125%, mientras que se observo una disminución en la concentración de LH por un 33% en cerdas ovariectomizadas. En el

mismo sentido, no encontró efecto sobre las características de secreción de LH por NMA en fase folicular. Esto pudo ser debido a que en esta fase las cerdas pueden ser menos sensibles o completamente insensibles a NMA a pesar de la habilidad del compuesto para estimular GnRH y elevar la secreción de LH.

Viguie *et al.* (1995), reportaron que la inyección de NMDA causa un agudo incremento en la secreción de LH por una sostenida y prolongada elevación en los niveles plasmáticos de LH. Esta respuesta fue dependiente de la dosis, con niveles medios del pico de LH a 1.0, 2.0, y 2.8 ng/ml por dosis de 1, 2, y 5 mg/kg PV, respectivamente. Después de la inyección de la dosis mas alta (5 mg/kg PV), la secreción de LH fue mantenida a niveles basales por mas de 2 h.

De acuerdo a Estienne *et al.* (1998), el NMA pudo haber estimulado la secreción de GnRH del hipotálamo, sin incrementos en la liberación de LH debido a un efecto inhibitorio de estradiol sobre la glándula pituitaria. El estradiol actuando sobre la glándula pituitaria bloquea la actividad de los AAE para elevar la secreción de LH por la retroalimentación negativa que ejerce. Sin

Cuadro 1. Medias de mínimos cuadrados para peso vivo (PV, kg), condición corporal (CC, unidades), folículos totales (FT, unidades), cuerpos lúteos totales (CLT), actividad ovárica total (AOT, FT+CLT), concentración sérica de LH (ng mL^{-1}), pulsatilidad (PULSE), amplitud (AMPLI), e intervalo interpulso (INTER), durante la fase folicular media en cabras adultas suplementadas con aminoácidos excitadores (AAE), y no suplementadas (CC), durante marzo y abril en la Comarca Lagunera (26° LN).

Variables	AAE	CC	NSO ¹	EE ²
PV	43.8 ^a	44.7 ^a	0.50	0.99
CC	3.3 ^a	3.4 ^a	0.19	0.03
FT	2.4 ^a	2.3 ^a	0.79	0.26
CLT	2.1 ^a	1.5 ^b	0.06	0.31
AOT	4.5 ^a	3.8 ^a	0.19	0.36
LH	1.16 ^a	1.33 ^a	0.23	0.09
PULSE	9.0 ^a	8.0 ^b	0.05	0.31
AMPLI	0.9 ^a	1.2 ^a	0.31	0.18
INTER	41.3 ^a	49.1 ^b	0.04	1.38

embargo, Sesti y Britt (1992) encontraron que en cerdas lactando pre-tratadas con benzoato de estradiol, el NMA evoco un incrementó del 69% en la concentración media de LH durante 1 h posterior su administración. En el mismo sentido, el AUC fue mayor durante el periodo post-NMA que durante el periodo pre-NMA.

El efecto de NMA sobre la liberación de gonadotropinas depende también de la dosis en que sea administrado. Sesti y Britt (1992) reportaron que en cerdas lactando que recibieron una administración IV de NMA en dosis de 1.5 y 3.0 mg kg⁻¹ PV, la concentración media de LH en suero no vario, en cambio, cerdas en las mismas condiciones mostraron un incremento en LH del 114% durante 1 h luego de recibir 5.0 mg kg⁻¹ PV IV. Tanaka *et al.* (2002) en cabras Shiba demostraron un efecto de privación nutricional sobre el patrón de secreción de LH, sugiriendo la existencia de peso corporal critico que deprimió la actividad endocrina en respuesta una insuficiencia metabólica.

CONCLUSIONES

Los promedios para FT, AOT y LH fueron 2.35, 4.15 y 1.24 ng mL⁻¹ sin diferir entre tratamientos.

Las cabras suplementadas con glutamato, paralelo a un incremento en CLT, mostraron una mayor LH-PULSE y una reducción en LH-INTER.

La suplementación de glutamato en cabras adultas 7/8 Alpino-Saanan x Criollo, bajo un fotoperíodo creciente, afectó positivamente el comportamiento reproductivo, en una ruta dependiente de gonadotropinas, con incrementos en CLT, así como el patrón de secreción de LH, aumentando la pulsatilidad y reduciendo el periodo interpulso.

LITERATURA CITADA

- Armstrong, J.D. and J.H. Britt. 1987. Nutritionally-induced anestrous in gilts: metabolic and endocrine changes associated with cessation and resumption of estrus cycles. *J. Anim. Sci.* 65:508-523.
- Dickie, A.M., C. Paterson, L.M. Anderson, and J.S. Boyd. 1999. Determination of corpora lutea numbers in Booroola-Texel ewes using transrectal ultrasound. *Theriogenology.* 51:1209-1224.
- Estienne, M.J., W.F. Hurlock and C.R. Barb. 1998. Serum Concentrations of Luteinizing Hormone, Growth Hormone, and Cortisol in Gilts Treated with N-Methyl-D-Aspartate During the Estrous Cycle or After Ovariectomy. *J. Anim. Sci.* 76:2162-2168.
- Foster, D.L. 1994. Puberty in sheep. In: Knobil, E. & Neill, J.D. (eds). *The physiology of reproduction.* 2nd ed. Volume II. Raven Press, New York, USA. pp. 411-492.
- Garcia, E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Copen para adaptarlo a las condiciones de I republica Mexicana. Instituto de Geografía. UNAM. México 252 p.
- German A., C.G. 2005. Efectos Sociales y Sexuales en la Reproducción de Pequeños Ruminates. Memorias IV Curso Internacional de Reproducción en Rumiantes. Colegio de Postgraduados. p. 42.
- Gill, J.L., and H.D. Hafs. 1971. Analysis of repeated measurements in animals. *J. Anim. Sci.* 33:331-336.
- Griffin, J.K. and O.J. Ginther. 1992. Research applications of ultrasonic imagines in reproductive biology. *J. Anim. Sci.* 70:953-972.
- Hoefler, W.C. and D.M. Hallford. 1987. Influence of suckling status and type of birth on serum hormones profiles and return to estrous in early post-partum spring lambing ewes. *Theriogenology* 27:887.
- Kane, K.K., D.E. Hawkins, G.D. Pulsipher, D.J. Denniston, C.R. Krehbiel, M.G. Thomas, M.K. Peterson, D.M. Hallford, M.D. Remmenga, A.J. Roberts, and D.H. Keisler. 2004. Effect of increasing levels of undegradable intake protein on metabolic and endocrine factors in estrous cycling beef heifers. *J. Anim. Sci.* 82:283-291.
- Litell, C.R., J.R. Freund and C. Phillip. 1991. SAS® System for Linear Models, Third Edition, Cary, NC: SAS Institute Inc., 329 pp.
- López S., A. A. Gonzalez de Bulnes, M.A. Santiago, L.A. Veiga, D.A. Toledano y I. Contreras. 2005. Manejo Reproductivo en Pequeños Rumiantes. Memorias IV Curso Internacional de Reproducción en Rumiantes. Colegio de Postgraduados. Pag. 84.
- Merriam, C.R. 1987. Methods of characterizing episodic secretion. In: Crowley, WF, Hofler, J. (editors). *The episodic secretion of hormones.* pp. 465-470.
- Richards, M.W., R.P. Weetemann and H.M. Schoenemann. 1991. Nutritional anestrous in beef cows: body weight change, body condition, luteinizing hormone in serum and ovarian activity. *J. Anim. Sci.* 67:1520-1526.
- Rubio, J.M., D.M. Hallford, and D.E. Hawkins. 1997. Effect of glucose administration during the estrous cycle on serum hormone profiles, mRNA for steroidogenic enzymes and breeding performance of ewes. *J. Anim. Sci.* 75:775-780.
- Santos V., S. De los 1973. Climatología general de la Región Lagunera. Boletín Agrícola Lagunero. 1973. SARH. México.
- Sakurai, K., S. Ohkura, Matsuyama, K. Katoh, Y. Obara and H. Okamura. 2004. Body growth and plasma concentrations of metabolites and metabolic hormones during the pubertal period in female Shiba goats. *J. Reprod. Dev.* 50:197-205.
- Sesti, L.A.C. and J.H. Britt. 1992. Elicitation of Release of Luteinizing Hormone by N-Methyl-D-Aspartic Acid During Three Paradigms of Suppressed Secretion of Luteinizing Hormone in the Female Pig. *Domest. Anim. Endocrinol.* 9(2):105-114.
- Snedector, G.W. and W.G. Cochran. 1967. *Statistical Methods.* 6th Ed. The Iowa State Univ. Press, Ames.

- Tanaka, T., N. Akaboshi, Y. Inoue, H. Kamomae and H. Kaneda. 2002. Fasted-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone is related to body energy status in ovariectomized goats. *Anim. Reprod. Sci.* 72:185-196.
- Viguie, C., A. Caraty, A. Locatelli and B. Malpoux. 1995. Regulation of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) Secretion by Melatonin in the Ewe. II. Changes in N-Methyl-D,L-aspartic acid-induced LHRH Release during the Stimulation of Luteinizing Hormone Secretion by Melatonin. *Biol. Rep* 52, 1156-1161.