

LUCIANA DE BARROS CARVALHO BELTRÃO

**EFEITO DA MELATONINA EXÓGENA SOBRE OS ASPECTOS
REPRODUTIVOS EM CARNEIROS DESLANADOS NO AGRESTE
MERIDIONAL DO ESTADO DE PERNAMBUCO.**

GARANHUNS

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES**

LUCIANA DE BARROS CARVALHO BELTRÃO

**EFEITO DA MELATONINA EXÓGENA SOBRE OS ASPECTOS
REPRODUTIVOS EM CARNEIROS DESLANADOS NO AGRESTE
MERIDIONAL DO ESTADO DE PERNAMBUCO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

GARANHUNS

2013

Ficha Catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Setorial UFRPE/UAG

B453e

Beltrão, Luciana de Barros Carvalho

Efeito da melatonina exógena sobre os aspectos reprodutivos em carneiros deslanados no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco/ Luciana de Barros Carvalho Beltrão.- Garanhuns, 2013

77 f.

Orientador: Gustavo Ferrer Carneiro
Dissertação (Mestrado em Sanidade e Reprodução de Ruminantes) – Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, 2013.

Inclui anexo e bibliografias

CDD: 636.0829 26

1. Reprodução – Sêmen
 2. Circunferência escrotal
 3. Melatonina – Fotoperíodo
 4. Testosterona
- I. Carneiro, Gustavo Ferrer
 - II. Título

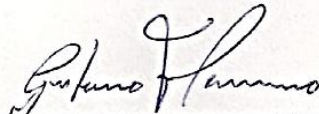
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES**

**EFEITO DA MELATONINA EXÓGENA SOBRE OS ASPECTOS
REPRODUTIVOS EM CARNEIROS DESLANADOS NO AGRESTE
MERIDIONAL DO ESTADO DE PERNAMBUCO.**

Dissertação de Mestrado elaborada e defendida por
LUCIANA DE BARROS CARVALHO BELTRÃO

Aprovada em 04/10/2013

BANCA EXAMINADORA



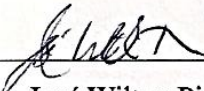
Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

Presidente da Banca - Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE



Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu

Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE



Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior

Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE



Profª. Dra. Norma Lúcia de Souza Araújo

Centro de Saúde e Tecnologia Rural/UFCG

À minha mãe, Vânia de Barros Carvalho
Beltrão, que sempre esteve ao meu lado, nas horas
mais tristes e mais felizes da minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guia e protege, por todos os caminhos. Que concedeu-me disposição e perseverança para concluir mais uma etapa.

Aos meus pais, Abelardo dos Reis Beltrão e Vânia de Barros Carvalho Beltrão, a quem devo tudo: a vida, os estudos, o meu caráter e o primoroso exemplo nos valores que norteiam os meus passos.

Mais uma vez ao meu pai, que cedeu os animais para realizar o experimento.

Ao meu orientador, professor, amigo, Dr. Gustavo Ferrer Carneiro, exemplo de compromisso com o ensino e a pesquisa. Sempre me apoiando, incentivando e ajudando como mestre e amigo.

A Christiana e Luiza, pela compreensão nas horas que Gustavo se ausentou.

Aos estagiários que foram fundamentais em meu experimento. Sem eles o mesmo não teria sido realizado: Thamires Brito, Pollyanne Raysa Fernandes de Oliveira e Breno de Barros de Santana por sua dedicação, amizade e especialmente a Breno, muito obrigada! pelas madrugadas de sono.

A Poliana Araújo Silva, minha companheira de apartamento, minha amiga, confiante que me recebeu com muito carinho, me ajudou e ensinou, com sua simplicidade e calma, a melhor maneira de conduzir as situações.

Aos professores e colegas da pós-graduação.

A Pascal Correc e Adriana Correc que fizeram o primeiro contato com o Laboratório Ceva Santé Animale e conseguiu os implantes.

Ao Dr. Stéfhane Floc'h, Chefe de Gammes Reproduction et Metabolisme, Ceva Santé Animale France, por ter cedido a melatonina para o experimento.

Ao laboratório Ceva Santé animale.

A Chesneau Didier – INRA - Institut National de La Recherche Agronomique, Nouzilly, France.

À Clínica de bovinos de Garanhuns (UFRPE), por ter permitido a estada dos animais durante o experimento.

Aos Prefeitos e Secretários de agricultura dos municípios de Cumaru e Limoeiro.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

RESUMO

Ovinos são caracterizados como animais poliéstricos estacionais, onde a atividade reprodutiva está intensificada em determinadas épocas do ano, com interdependência de uma maior ou menor exposição à luz solar ou fotoperíodo. Apesar da produção espermática de carneiros se manter por todo ano, é sabido que há uma queda da qualidade seminal durante o período de estação não reprodutiva principalmente em regiões de clima temperado onde esse efeito do fotoperíodo é pontual. Entretanto, poucos estudos têm se dedicado à influência do fotoperíodo na reprodução de ovinos em regiões de clima tropical onde a variabilidade do fotoperíodo é menor. O objetivo deste experimento foi testar a eficácia do uso de melatonina exógena na melhoria da qualidade seminal em carneiros deslanados no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco. Oito carneiros da raça Santa Inês foram divididos em 2 grupos de 4 animais, um grupo tratamento (GT), submetidos a implantes subcutâneos de melatonina exógena (Melovine®, CEVA), e um grupo controle (GC), submetidos a solução salina 1 mL (placebo) subcutâneo, foram mantidos em apriscos com luminosidade média de 11h26'h/dia, por 120 dias. Durante esse período foi avaliado o efeito da melatonina exógena na circunferência escrotal, concentração espermática e concentrações séricas de testosterona e melatonina através de coletas quinzenais no horário matutino e vespertino para estabelecer a influência nas concentrações desses hormônios, correlacionando assim, com a ação da sazonalidade. Os dados foram comparados através de análise de variância (ANOVA). Os contrastes entre médias foram avaliados através do método de Student-Newman-Keuls. Houve um aumento significativo na concentração sérica de melatonina no GT comparado ao GC, nas 3 primeiras coletas matutina e vespertina ($p < 0.05$). Nas 2 últimas coletas não foi observado diferenças. A concentração sérica de melatonina demonstrou um ritmo característico de noite/dia em ambos grupos GT e GC com diferença significativa na concentração média no GC da melatonina na manhã (3.9 pg/mL) comparado com a amostra da noite (59.56 pg/mL), entretanto, essa diferença não foi observada no GT (572.45 pg/mL vs 939.52 pg/mL). O aumento da concentração sérica de melatonina foi diretamente proporcional ao aumento da circunferência escrotal. Foi observado ainda, aumento significativo na concentração espermática no GT 45 dias após a colocação dos implantes. A concentração de testosterona sérica aumentou significativamente no GT 45 dias após a colocação dos implantes quando iniciou uma queda na concentração de melatonina. Os resultados deste trabalho demonstraram que o tratamento com melatonina exógena em carneiros deslanados em região tropical teve um efeito positivo no aumento da circunferência escrotal, no aumento da concentração espermática e no aumento da concentração sérica de testosterona sugerindo que mesmo em regiões tropicais onde não há uma diferença marcante de fotoperíodo, a melatonina participa ativamente dos processos reprodutivos.

Palavras chaves: fotoperíodo, sêmen, circunferência escrotal, testosterona.

ABSTRACT

Ovine are characterized as seasonal polyestrous animals, where reproductive activity is intensified in certain times of the year, with interdependence of a greater or lesser exposure to sunlight or photoperiod. Although sperm production of rams stay steady the whole year, it is well known that there is a drop of seminal quality during the period of non-reproductive breeding season mainly in temperate regions where such photoperiod effect is punctual. However, few studies have been devoted to the influence of photoperiod on reproduction of sheep in tropical regions where variability of photoperiod is shorter. The objective of this experiment was to test the effectiveness of exogenous melatonin on seminal quality improvement in hair sheep at Agreste Meridional Region of Pernambuco State. Eight Santa Inês hair sheep were divided into 2 groups of 4 animals, a treatment group (TG), subjected to exogenous melatonin subcutaneous implants (Melovine®, CEVA), and a control group (CG) subjected to subcutaneous application of 1 mL of saline as a placebo. Both groups were kept in barns with a mean luminosity of 11.26 hrs/day, for 120 days. During this period, it was evaluated the effect of exogenous melatonin on scrotal circumference, sperm concentration and serum concentrations of testosterone and melatonin by nightly and morning blood sample collections to establish influence in the concentrations of these hormones, correlating with the effect of seasonality. Data were compared using analysis of variance (ANOVA). The contrasts between means were evaluated through Student-Newman-Keuls test. There was a significant increase in serum concentration of melatonin in TG compared to CG, on the first 3 morning and evening collections ($p < 0.05$). No differences were observed in the 2 latest. Serum concentration of melatonin has demonstrated a night/day rhythm characteristic in both TG and CG groups with a difference in the mean concentration of CG melatonin in the morning (3.9 pg/mL) compared with the night sample (59.56 pg/mL), however, this difference was not observed in TG (572.45 pg/mL vs 939.52 pg/mL). An increased serum concentration of melatonin was directly proportional to the increase in scrotal circumference. Also, a significant increase was observed in sperm concentration in TG 45 days after the placement of implants. Serum testosterone concentration increased significantly in TG 45 days after placement of the implants when it began a decline in concentration of melatonin. The results of this study demonstrated that treatment with exogenous melatonin in hair sheep at tropical region had a positive effect on scrotal circumference, on sperm concentration and on serum testosterone concentration suggesting that even in tropical regions where there is not a marked difference in photoperiod, melatonin plays a role in the reproductive processes.

Key words: photoperiod, semen, scrotal circumference, testosterone.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	11
2.1	Geral	11
2.2	Específicos	11
3	REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1	Sazonalidade	12
3.2	Localização geográfica e fatores ambientais	15
3.3	Perímetro escrotal	16
3.4	Efeito do fotoperíodo no perímetro escrotal	17
3.5	Efeito da nutrição no perímetro escrotal	18
3.6	Melatonina	19
3.7	Testosterona	24
	REFERÊNCIAS	29
	ARTIGO CIENTÍFICO	39
	APÊNDICES	56
	APÊNDICE A - TABELA 1- Média mensal dos horários do nascer do sol, ocaso do sol e quantidade de hora/luz no período de junho à setembro de 2012, no município de Garanhuns-PE.	57
	APÊNDICE B - TABELA 2 – Média mensal dos índices pluviométrico, temperatura média máxima, temperatura média mínima, umidade relativa do ar, no período de junho à setembro de 2012 do município de Garanhuns- PE.	57
	ANEXOS	58
	ANEXO A - Aprisco onde os animais estavam alocados durante o experimento	59
	ANEXO B - Animais do experimento	59
	ANEXO C - Pistola desmontada	60
	ANEXO D - Caixa Melovine[®], dois cartuchos e duas agulhas	60
	ANEXO E - Abertura do cartucho	61
	ANEXO F - Pistola montada	61
	ANEXO G - Pellet de melatonina	62
	ANEXO H - Pellet de melatonina	62

ANEXO I - Tricotomia da região do implante	63
ANEXO J - Antissepsia da região do implante	63
ANEXO K - Aplicação subcutânea na base da orelha	64
ANEXO L - Região após implantação dos pellets	64
ANEXO M - Aplicação do placebo	65
ANEXO N - Região após aplicação do placebo	65

1 INTRODUÇÃO

No Brasil a ovinocultura representa uma fonte produtivamente rentável e que oferece possibilidades para pequenos, médios e grandes produtores, contribuindo para o crescimento econômico da localidade em que estão inseridas. Desta forma, vem ocupando lugar de destaque pela avaliação do seu crescimento nacional por regiões (BODEN; KENNAWAY, 2006).

O efetivo brasileiro de ovinos é de 17.662,201 milhões de cabeças (IBGE, 2011). Mesmo sendo um negócio economicamente rentável, a produção/oferta de carne ovina ainda não atende o mercado interno, dessa forma o Brasil continua importando carne ovina, isso justifica a importância do agronegócio da ovinocultura como estratégia para o desenvolvimento rural (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2008). Dessa forma, a ovinocultura passa a ser um elemento importante dos sistemas de produção da pecuária brasileira com 56,7% do rebanho na região Nordeste. Este efetivo tem como finalidade a produção de carne e leite, com raças deslanadas (IBGE, 2010).

A produção de carne ovina no mundo tem levado os produtores a buscarem novas biotecnologias, com o intuito de melhorar a genética e padrões de reprodução e aumentar a produtividade e lucratividade (VASCONCELOS; VIEIRA, 2003; OLIVEIRA, 2004 apud OLIVEIRA; SANTOS; CAVALCANTI, 2012). Para tanto, vários métodos tem sido empregados para controlar e aumentar a fertilidade do rebanho, tentando atingir equilíbrio entre a produção e o consumo (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A raça Santa Inês vem obtendo grande importância na ovinocultura moderna, utilizada como raça pura ou para cruzamentos industriais (OLIVEIRA; LIMA, 1994). Em tais sistemas de produção, a eficiência reprodutiva é o principal fator limitante da lucratividade (MATOS et al., 1992).

A cadeia produtiva da caprino-ovinocultura tem grande importância socioeconômica para o Estado de Pernambuco e um potencial pouco aproveitado ou subestimado, tanto pelos produtores quanto pelos institutos de fomento e geração de renda e trabalho (SIMPLÍCIO; SIMPLÍCIO, 2006).

A atividade reprodutiva do macho ovino pode ser influenciada por fatores climáticos e nutricionais. Na região Nordeste do Brasil, a disponibilidade de forragens na pastagem nativa tanto na época seca quanto na chuvosa e as altas temperaturas ambientais, na época

seca, são indicadas como os principais fatores relacionados às variações na qualidade do sêmen durante o ano. No entanto, diversos estudos têm demonstrado que as raças deslanadas são bem adaptadas à região, sofrendo pouca influência dos fatores climáticos sobre a produção espermática (MAIA; MEDEIROS; LIMA, 2011).

Fatores como raça, idade (BELIBASAKI; KOUIMTZIS, 2000; SNOWDER; STELLFLUG; VAN VLECK, 2002) e estacionalidade (ROSA; JUNIPER; BRYANT, 2000a), além dos fatores hormonais e sociais podem agir como geradores de interferências positivas ou negativas para a fertilidade dos animais de ambos os sexos (DICKSON; SANFORD, 2005; STELLFLUG; LEWIS, 2007).

A relação entre a luminosidade e o sistema gerador de pulsos de LH em ovinos, é bem estudada. Os sinais luminosos são captados pelos fotorreceptores dos olhos, transmitidos pelo sistema nervoso monossináptico ao hipotálamo e depois para a glândula pineal, que converte de sinal nervoso a sinal hormonal, com característica de um ritmo circadiano de secreção de melatonina (SÁ, 2002). A duração da secreção de melatonina é diretamente proporcional ao comprimento da noite, período que ocorre a sua produção, pois na presença da luz, a secreção de melatonina é inibida. Portanto, existe um ciclo circadiano de liberação que normalmente coincide com o ciclo luz-obscuridade.

A melatonina exógena é comercializada na forma de pellet de 18mg recoberto por fina camada de polímeros, que permite uma liberação constante durante 70 dias após sua introdução no tecido subcutâneo do animal, mimetizando uma condição de ausência de luminosidade ambiente, mesmo em condições de fotoperíodo longo de primavera (STAPLES et al., 1992). Entretanto, é de nosso conhecimento que não há na literatura avaliação do efeito da melatonina exógena em carneiros nas regiões tropicais onde a influência do fotoperíodo é menos atuante.

A investigação dos efeitos da utilização da melatonina exógena na qualidade seminal de ovinos criados na Mesorregião do Agreste Pernambucano possibilitará compreensão dos mecanismos envolvidos e seus efeitos no fotoperíodo em carneiros deslanados e, possivelmente, o estabelecimento desse hormônio como estímulo hormonal, fortalecendo assim a cadeia produtiva desta região. No Nordeste do Brasil, a variabilidade de fotoperíodo é mínima em virtude da proximidade da Linha do Equador e há poucas informações sobre a influência da sazonalidade nessas regiões. O conhecimento das variações sazonais na reprodução de pequenos ruminantes nessas regiões pode representar um avanço científico, favorecendo ou não a utilização de melatonina exógena.

Do nosso conhecimento não existem estudos sobre o uso de implante de melatonina em carneiros nas regiões tropicais, o que justifica sobremaneira nosso experimento.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

Avaliar o efeito da melatonina exógena (Melovine[®], CEVA) na qualidade seminal dos reprodutores da raça Santa Inês no Estado de Pernambuco, observando a influência do fotoperíodo, em região tropical.

2.2 Específico:

1. Avaliar o efeito da melatonina exógena (Melovine[®], CEVA) na circunferência escrotal de carneiros deslanados durante o período do experimento em região tropical. (no período de junho a setembro de 2012).
2. Avaliar o efeito da melatonina (Melovine[®], CEVA) na concentração sérica da testosterona.
3. Avaliar o efeito da melatonina (Melovine[®], CEVA) na concentração espermática de reprodutores da raça Santa Inês.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Sazonalidade

Quanto à sazonalidade, o seu principal marcador para os organismos é a mudança no fotoperíodo, que pode ser reprodutível e previsível devido às mudanças de estação durante o ano (VANECEK, 1998; GOLDMAN, 1999). A partir do solstício de inverno, cessa o estímulo dos dias curtos e, conseqüentemente, da melatonina, no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Carneiros de lã grossa, originários de regiões próximas do pólo, mostram-se mais sensíveis ao fotoperíodo que as raças de lã fina, originárias das faixas equatoriais. Por se tratar de característica herdável, raças oriundas do cruzamento das de lã grossa x lã fina mostram comportamento intermediário (SÁ, 2002). Com base no fotoperíodo, os animais foram classificados em: a) animais de dias longos, no qual se incluem os equinos, cuja atividade sexual se manifesta após o solstício de inverno, ou seja, quando os dias crescem; b) animais de dias curtos, no qual são inseridos os ovinos e caprinos, cuja atividade sexual se manifesta após o solstício de verão, ou seja, quando os dias decrescem (SÁ, 2002; FRANDSON; WILKE; FAILS, 2011).

A escolha da época para a realização da estação de reprodução deve ser baseada nas condições climáticas da região, capacidade de reprodução do macho e da fêmea e na disponibilidade de alimento durante os períodos de nascimento das crias e de lactação (SELAIVE-VILLARROEL, 1989).

A sazonalidade reprodutiva é uma característica adaptativa que se desenvolveu ao longo de milhões de anos. Essencialmente, ela procura ajustar os momentos em que as necessidades energéticas dos animais são máximas (fase final do desenvolvimento fetal e fase inicial da lactação e do desenvolvimento pós-natal) ao período do ano em que as condições climáticas e as disponibilidades de alimentos são particularmente vantajosas (VALENTIM; CORREIA; AZEVEDO, 2006).

Os ovinos, originários das regiões temperadas ou frias do globo terrestre, apresentam uma atividade reprodutora sazonal que é, fundamentalmente, ditada pelo ciclo anual de variação do período diário de luz (fotoperíodo). São denominados reprodutores de

“dias curtos”, uma vez que as cobrições têm lugar, maioritariamente, nos meses de verão-outono (fotoperíodo decrescente) (VALENTIM; CORREIA; AZEVEDO, 2006).

A sazonalidade depende de vários outros fatores ambientais – temperatura, umidade relativa do ar, pluviosidade. – de fatores ligados ao animal – patrimônio genético, idade, sexo, condição corporal. – e de fatores de manejo – alimentação, estado sanitário, interações sociais. – que, dependendo da situação, podem mesmo sobrepor-se ao fotoperíodo (VALENTIM; CORREIA; AZEVEDO, 2006).

Nos ovinos, a sazonalidade reprodutiva continua a ser alvo de intensos estudos pois, para além da sua natureza fisiológica não ser totalmente conhecida, porque é condicionada por múltiplos fatores endógenos e exógenos, afeta significativamente a gestão e a rentabilidade das explorações ovinas (VALENTIM; CORREIA; AZEVEDO, 2006).

No Brasil devido a sua extensa área territorial, em algumas regiões como o Sul e o Norte, os animais sofrem influência ao fotoperíodo. Mas de uma maneira geral os animais adaptados às condições brasileiras com o passar do tempo perdem estas características, e geralmente apresentam cio o ano todo, apenas limitado quando há carências nutricionais e sanitárias (GRANADOS; DIAS; SALES, 2006).

No caso dos ovinos, oriundos geneticamente da África e países do Hemisfério Sul (Santa Inês, Dorper), não é clara a influência da estacionalidade, mas percebe-se uma maior concentração de partos em determinado período do ano, porém alguns estudos devem ser realizados, para diferenciar a influência nutricional e/ou fatores reprodutivos. No caso de ovinos oriundo do Hemisfério Norte (Laucune, Bergamácia), ainda preservam a característica da estacionalidade reprodutiva (GRANADOS; DIAS; SALES, 2006).

Caprinos e ovinos são conhecidos como animais de dias curtos, ou seja, seu período de atividade sexual ocorre durante os dias de menor intensidade de luminosidade (8 horas/luz), com inibição da atividade reprodutiva durante os dias longos (16 horas/luz). Essa característica foi herdada de raças de locais de clima temperado, onde o fotoperíodo é bem caracterizado durante o ano (ABELLA, 1986), o que torna possível a utilização de iluminação artificial para o manejo reprodutivo dessas espécies (CHEMINEAU et al., 1992). O tamanho da estação reprodutiva varia inversamente com a latitude, aumentando enquanto a latitude diminui. Em pequenos ruminantes, altas latitudes causam marcada estacionalidade (ABELLA, 1986; MIES FILHO, 1987; LEBOEUF; RESTALL; SALAMON, 2000).

Modificações estacionais na atividade reprodutiva são menos marcantes nos carneiros quando mantidos mais próximos da zona equatorial. Isto ocorre porque, nestas áreas, as flutuações do fotoperíodo são menos pronunciadas (SOUZA et al., 2007); no entanto, Bicudo (1999) verificou, em carneiros da raça Ideal-Polwarth criados no estado de São Paulo-Brasil, onde o clima é tropical, menores concentrações plasmáticas de testosterona e androstenediona no inverno.

Já em clima temperado, Rosa, Juniper e Bryant, (2000a) verificaram que os carneiros sofreram flutuações sazonais na atividade endócrina, no comportamento sexual e na gametogênese, bem como na massa e no volume testicular. Thiéry et al. (2002) observaram que, durante a primavera, a produção de espermatozóides não é completamente suprimida, mas é quatro vezes inferior à produção durante o outono.

Na década de 50, Hafez (1952 apud ARROYO, 2011) mencionou que as ovelhas de origem equatorial apresentam uma estacionalidade reprodutiva reduzida, que são capazes de reproduzir durante todo o ano. Em estudos mais recentes, observou-se a diminuição da atividade estral nos meses de fevereiro a maio, atribuída a deficiências nutricionais e fatores ambientais como temperatura e umidade (HEREDIA et al., 1991; GONZÁLEZ-REYNA et al., 1991; GONZÁLEZ-REYNA et al., 1992 apud ARROYO, 2011).

Arroyo et al.(2007 apud ARROYO ,2011) propuseram que ovelhas Pelibuey tem três respostas ao fotoperíodo: na primeira, incluindo cerca de 40% das fêmeas e sugere que as ovelhas são sensíveis a pequenas mudanças no fotoperíodo, típico de regiões equatoriais apresenta anestro sazonal, um segundo grupo, que em rebanhos poderia chegar a 60% das fêmeas, são insensíveis às variações na amplitude do fotoperíodo equatorial e ovula durante todo o ano, e um terceiro grupo , tendo uma variação do limiar de alta resposta ao fotoperíodo, que ovulam mesmo quando exposto a alta latitude (>35°), demonstrando alta variabilidade e possível individualidade por animal.

Os carneiros das raças Merina Branca, Merina Preta e Campaniça apresentaram alguma sazonalidade reprodutiva, mas mantiveram a capacidade de produzir sêmen de boa qualidade ao longo do ano (BETTENCOURT, 1999).

3.2 Localização geográfica e fatores ambientais

Os ovinos são uma espécie poliéstrica sazonal, sendo o fotoperíodo o principal fator que influencia esta sazonalidade (HAFEZ, 1987). Assim, todas as raças ovinas originárias de latitudes médias ou altas ($>30^\circ$ segundo Lincoln, (1992) ou $>40^\circ$ de acordo com CHEMINEAU et al., 1992), onde a amplitude das variações anuais no número de horas de luz diária é grande, apresentam variações sazonais na sua atividade reprodutiva em ambos os sexos (ORTAVANT et al., 1985).

A localização geográfica tem um efeito marcante na duração da estação reprodutiva, verificando-se que animais explorados em latitudes maiores, em virtude da maior amplitude de variação do fotoperíodo, apresentam uma sazonalidade mais marcada comparativamente a animais localizados na região equatorial (HULET et al., 1974).

No estudo de diferentes raças, no que diz respeito a padrões reprodutivos sazonais, nenhum dos critérios de avaliação isolado constitui um índice de avaliação credível. No entanto, a avaliação dos vários critérios combinados, dará uma melhor estimativa das diferenças que possam existir entre raças (BETTENCOURT, 1999).

Uma grande variedade de fatores ambientais, tais como a estação do ano, o fotoperíodo e a nutrição, representam fontes de variação do libido e capacidade de serviço do carneiro (ALBERIO; COLAS, 1976). Existem também variações significativas entre raças (HULET et al., 1962; FLECHER, 1979, POULTON; ROBINSON, 1987), sendo estas diferenças mais acentuadas em animais jovens (LAND, 1970).

Apesar do aumento do fotoperíodo na primavera diminuir a produção de sêmen em carneiros, estes são produtores permanentes de sêmen ao longo do ano (COUROT, 1979). O volume do ejaculado apresenta variações sazonais durante a estação reprodutiva, aumentando de agosto para novembro, coincidindo os valores máximos de volume obtido com os valores máximos de concentração de testosterona (SANFORD; PALMER; HOWLAND, 1977). Os ejaculados de carneiros expostos a fotoperíodo crescente contêm mais células com formas anormais do que os de carneiros expostos a fotoperíodo decrescente (COLAS, 1983).

Segundo Girão e Medeiros (1987), nas regiões de clima temperado (altas latitudes), a atividade reprodutiva dos ovinos é afetada pela estação do ano, sendo o fotoperíodo o fator-chave no desencadeamento do ciclo reprodutivo. Nas regiões tropicais, onde o

fotoperíodo varia muito pouco, como é o caso do Nordeste do Brasil, a espécie ovina não apresenta estacionalidade reprodutiva, podendo se reproduzir durante todo o ano. Nesta região, o desempenho reprodutivo do carneiro é influenciado principalmente pela nutrição e pelo sistema de criação (manejo extensivo).

Os ovinos são animais de ciclo poliéstrico sazonal. Nas regiões temperadas e polares, o fotoperíodo é o principal fator regulador da sazonalidade (HAFEZ, 1987; apud BETTENCOURT, 1999). Assim, todas as raças ovinas originárias de latitudes superiores a 30° (LINCOLN, 1992) ou 40° (CHEMINEAU et al., 1992; apud BETTENCOURT, 1999), onde a amplitude de variação do fotoperíodo é elevada, apresentam variações sazonais na sua atividade reprodutiva (ORTAVANT et al., 1985; apud BETTENCOURT, 1999). A alimentação, o estado nutricional, as condições climáticas, a genética, a idade, o sexo e os fatores sociais desempenham igualmente um papel importante na regulação da atividade reprodutiva e na profundidade do anestro sazonal (SADLIER, 1969; MARTIN et al., 1990; CHEMINEAU, 1992; PÉREZ et al., 1998; MARTIN et al., 2002; apud VALENTIM, 2004).

Embora todas as espécies sejam sensíveis a alterações no fotoperíodo, a intensidade das respostas às mudanças de luz e as suas consequências variam muito de uma espécie para outra. Nas espécies de dias curtos, cuja atividade sexual está concentrada nos dias de declínio do ano, ovinos e caprinos são as mais sensíveis ao fotoperíodo, enquanto os porcos manifestam uma resposta menor às alterações da duração do dia. Entre os de dias longos como as espécies bovina e equina, estes últimos são mais sensíveis em termos de sua reprodução. Também os machos mostraram alterações quantitativas e significativas na produção de sêmen. Como também, na produção espermática diária dos carneiros da raça Ile-de-France, (DACHEUX et al., 1981). A sazonalidade tende a desaparecer nas raças mais próximas do Equador.

3.3 Perímetro Escrotal

Nos machos, a sazonalidade é expressa por meio de mudanças marcantes no perímetro escrotal e no consequente aumento da concentração de andrógenos (DELGADILLO; CHEMINEAU, 1992).

As dimensões testiculares em todas as espécies estão diretamente relacionadas com a produção espermática, uma vez que esta produção depende do número de espermatozoides produzidos por grama de tecido testicular (LOPATE; LEBLANC; KNOTTENBELT, 2003).

Em ovinos, o perímetro escrotal tem alta correlação positiva ($r = 0,86$) com aspecto, concentração e turbilhonamento do sêmen, diâmetro dos túbulos seminíferos, peso do epidídimo, peso das glândulas vesiculares, bem como com a produção espermática, capacidade de serviço, desenvolvimento sexual, comprimento e largura testiculares em ambas as estações (NUNES, 1982). Nessa espécie, o tamanho testicular influencia a produção de sêmen em carneiros (AMANN, 1970; ORTAVANT, 1959).

A maior parte das raças de caprinos e ovinos tem sua origem em países de clima temperado, causando, nesses animais, uma marcada variação sazonal reprodutiva. O decréscimo de horas/luz estimula a secreção de LH pela hipófise, via GnRH do hipotálamo, o que leva ao crescimento testicular e a consequente liberação de testosterona (DELGADILLO; CHEMINEAU, 1992).

A circunferência escrotal mostrou-se também relacionada com turbilhonamento, motilidade individual progressiva e concentração espermática, podendo ser utilizada como indicador da qualidade seminal. No entanto, a libido não apresenta associação com a circunferência escrotal em animais jovens (SOUZA et al., 2009).

Na medida em que o peso testicular é uma característica difícil de medir com precisão, em animais vivos, Knight (1977) observou que outros indicadores do tamanho testicular, tais como a circunferência escrotal, o volume escrotal e o diâmetro escrotal médio, encontram-se correlacionados significativamente quer com o número de espermatozoides nos testículos e epidídimos, quer com o peso testicular.

3.4 Efeito do fotoperíodo no perímetro escrotal

O efeito do fotoperíodo no grau de desenvolvimento testicular tem sido demonstrado por (DYRMUNDSSON; SIGTRYGGSSON; THORSTEINSSON, 1981; DERYCKE; BISTER; PAQUAY, 1988). No entanto, até determinada idade (cinco meses

em borregos Ile-de-France), o desenvolvimento testicular não é influenciado pelo fotoperíodo de acordo com Alberio e Colas, (1976). A estação de nascimento influencia significativamente o desenvolvimento testicular do borrego em crescimento (COUROT; REVIERS; PELLETIER, 1975; LAND; DRURY; FORDYCE, 1979).

Em carneiros adultos, o peso testicular varia ao longo do ano, com valores mínimos e máximos, respectivamente na primavera e final do verão, tendo-se registrado diferenças da ordem dos 200g em fevereiro-março para valores superiores a 350g em julho, em carneiros Ile-de-France (PELLETIER, 1970). O diâmetro escrotal apresenta variações de acordo com a estação do ano, observando-se valores superiores na época de outono comparativamente à época de primavera (DYRMUNDSSON; SIGTRYGGSSON; THORSTEINSSON, 1981). Resultados semelhantes foram obtidos em carneiros das raças Merino e Romney (BREMNER, 1984), em carneiros Rambouillet, (TULLEY; BURFENING, 1983) e em carneiros Saloios (SILVA, 1991).

3.5 Efeito da nutrição no perímetro escrotal

O efeito de diferentes níveis nutricionais na reprodução de carneiros adultos da raça Merina Australiana foi estudado por Oldham et al. (1978). De acordo com estes autores, um aumento do nível alimentar conduz a um aumento do volume testicular (67%) e do peso vivo (32%). Mais do que 50% das diferenças observadas no volume testicular foram devidas a alterações nos níveis de azoto da dieta, o que demonstra claramente a influência de componente de origem proteica no crescimento e regressão testicular de carneiros adultos. As variações sazonais que se observam no tamanho testicular em carneiros adultos, são independentes do peso vivo dos animais (DYRMUNDSSON; SIGTRYGGSSON; THORSTEINSSON, 1981).

O tamanho dos testículos e a produção espermática de carneiros adultos são influenciados pelo plano nutricional (MARTIN; WALKDENBROWN, 1995). Maurya et al. (2010) observaram efeito da nutrição, avaliada por meio do escore de condição corporal (ECC: 2,5; 3,0 e 4,0) no comportamento sexual, medidas testiculares, concentração de testosterona e parâmetros seminais de carneiros, no semiárido indiano. Os carneiros com um escore de condição corporal moderado (3,0) tiveram melhor desempenho na maioria

dos parâmetros estudados do que os animais com ECC baixo (2,5) ou alto (4,0). Fourie et al. (2004) observaram efeito significativo do manejo nutricional (pasto x intensivo) sobre as medidas testiculares (circunferência, peso, gordura escrotal) de carneiros Dorper em favor dos animais manejados intensivamente; acompanhado porém, de redução na qualidade do sêmen. No grupo sob manejo intensivo, houve diminuição na motilidade, no movimento de massa e na concentração espermática. O percentual de espermatozoides vivos e normais foi numericamente maior nos animais sob manejo extensivo.

Em resumo, deve-se dar atenção especial à nutrição dos reprodutores. Para assegurar ao máximo sua eficiência reprodutiva, os animais devem ser mantidos com um escore de condição corporal moderado (3,0), uma vez que tanto a subnutrição quanto o excesso de energia na dieta têm efeitos deletérios sobre a qualidade do sêmen (MARTIN; WALKDENBROWN, 1995).

3.6 Melatonina

A melatonina é um hormônio de ocorrência natural em todos os mamíferos, sintetizado e secretado exclusivamente durante a noite pela glândula pineal a partir do triptofano e da serotonina, permite a interpretação do ciclo luz-escuridão para a regulação fisiológica do corpo, em relação à sazonalidade e ciclo circadiano (HAFEZ; HAFEZ, 2004). O animal percebe o fotoperíodo através da concentração sistêmica deste hormônio, portanto, tem sido estudado o fornecimento de melatonina isoladamente ou associado a programas de luz através das injeções, ingestão ou implantes, sendo este último o que tem apresentado melhores resultados (RIBEIRO, 1997).

A melatonina liberada pela glândula pineal age no hipotálamo estimulando o ciclo reprodutivo e, como é estimulada nos períodos de menor duração da luminosidade, em regiões de clima temperado, o ciclo reprodutivo se inicia durante o outono e o inverno. Entretanto, o mecanismo de ação completo deste hormônio ainda não está totalmente esclarecido (AZEVEDO et al., 2008). Rosa, Juniper e Bryant(2000b) notaram que em carneiros adultos, previamente selecionados, que foram tratados com hormônio melatonina apresentaram maiores concentrações de testosterona induziram maior taxa de ovulação nas fêmeas, através do efeito macho.

A fotopercepção da luz pelo olho desencadeia uma sequência de eventos que culminam com a estimulação da adeno-hipófise e, conseqüentemente, a produção e liberação de gonadotrofinas (MIES FILHO, 1984). A luz é percebida por fotorreceptores localizados nos olhos e relacionados com um nervo monossináptico ao núcleo supraquiasmático do hipotálamo. Após a recepção no sistema circadiano (controlador da função reprodutiva), a mensagem do fotoperíodo é transmitida através do gânglio superior da glândula pineal. A pineal converte este estímulo neural em sinal hormonal que toma a forma do ritmo circadiano de secreção de melatonina. A duração da secreção elevada de melatonina, que é diretamente proporcional à duração da noite, é interpretada como indutiva ou supressiva. Sinais indutivos de melatonina estimulam o ciclo hormonal reprodutivo e sinais supressivos o inibem (KARSCH, 1984), transmitindo informações relativas ao ciclo luz-escurecimento para a regulação fisiológica do animal, refletindo-se em um efeito sobre a secreção de GnRH, demonstrado em estacionalidade ou ciclicidade estral (TRALDI, 2006). Existem ainda os fotorreceptores extra-retinais, que mantêm os estímulos para o ciclo reprodutivo mesmo em caso de animais cegos (MIES FILHO, 1984).

A informação luminosa, depois de captada pela retina, é transmitida, via nervosa, por etapas, até à glândula pineal, condicionando a secreção de melatonina. Este hormônio é produzido segundo um ritmo endógeno diário, definido pelos núcleos supraquiasmáticos, sincronizado pelo fotoperíodo diário e suprimido pela ação da luz. Ainda que a melatonina possa atuar a vários níveis do eixo reprodutivo, a sua ação principal, produz-se a nível do sistema nervoso central e relaciona-se com a modificação da frequência de liberação de GnRH/LH e da atividade das gônadas. Esta ação da melatonina é conseguida através de dois mecanismos complementares: modulação direta da secreção de GnRH (esteroide-independente) e alteração da sensibilidade do eixo hipotálamo-hipofisário face à retroalimentação negativa exercida pelos esteroides gonadais (esteroide-dependente) (VALENTIM; CORREIA; AZEVEDO, 2006).

Segundo Valentim, Correia e Azevedo (2006), nos carneiros, o anestro sazonal traduz-se numa redução, relativamente pouco acentuada, da secreção de GnRH/LH, uma vez que a retroalimentação negativa exercida pelos esteróides sexuais sobre a frequência de secreção de GnRH/LH é menos eficaz nos animais desta espécie.

Nos ovinos, a atividade reprodutora sazonal pode ser manipulada através da aplicação de tratamentos luminosos ou da administração de melatonina exógena. Quando esses animais são submetidos a um regime luminoso de “dias curtos” ou se lhes administra

melatonina exógena, a fim de mimetizar os perfis de secreção da melatonina nos “dias curtos”, eleva-se a secreção de GnRH/LH e, conseqüentemente, estimula-se à atividade reprodutiva. A administração de melatonina exógena a animais em anestro sazonal possibilita a obtenção de resultados reprodutivos semelhantes aos que ocorrem, naturalmente, em plena estação reprodutiva. Ao contrário, quando os ovinos são sujeitos a um regime luminoso de “dias longos” reduz-se à secreção de GnRH/LH e, conseqüentemente, deprime-se esta mesma atividade (VALENTIM; CORREIA; AZEVEDO, 2006).

Esta melatonina exógena pode ser fácil e comodamente administrada, através da colocação de implantes subcutâneos deste hormônio, na base posterior das orelhas. Contudo, os resultados reprodutivos obtidos por diferentes investigadores são, por vezes, aparentemente contraditórios, devido a diferenças relacionadas com o animal (patrimônio genético, idade, condição corporal.)(VALENTIM; CORREIA; AZEVEDO, 2006).

Por outro lado, é desaconselhado o uso de implantes subcutâneos de melatonina em animais impúberes (CEVA Santé Animale). Pelo contrário, a colocação destes implantes em animais púberes favorece as taxas de fertilidade.

Cada implante subcutâneo de melatonina, com dimensões 2x4 mm, contém 18 mg de melatonina, é 100% biodegradável e não é necessário retirá-lo, não necessita de intervalo de segurança quer da carne ou do leite, libera progressivamente, melatonina por um período de 3-4 meses (CEVA Santé animale).

A utilização de implantes subcutâneos de melatonina, ainda que não seja propriamente barata ($\approx 10\text{€}/\text{implante}$), sempre é economicamente mais vantajosa (VALENTIM; CORREIA; AZEVEDO, 2006).

Segundo Valentim (2006) em estudo realizado na região de Vila Real, Portugal onde se testou dois tratamentos – luz e melatonina, a colocação de três implantes subcutâneos nos machos por animal independente do peso (61-80 Kg), não alterou significativamente os níveis plasmáticos de testosterona, tamanho testicular, produção seminal e comportamento sexual. Nos carneiros, o aumento do sinal melatonina traduz-se, sucessivamente, numa elevação significativa dos níveis circulantes de LH, no prazo de 2-4 semanas, de testosterona, no prazo de 3-8 semanas e do tamanho dos testículos, no prazo de 2-8 semanas. Conseqüentemente, elevam-se a produção seminal e o comportamento sexual apresentados pelos carneiros.

Sob condições de campo, a ressensibilização do sistema neuroendócrino dos ovinos face ao sinal “dias curtos” tem passado pela sujeição dos animais ao fotoperíodo naturalmente crescente, no período de inverno/primavera (VALENTIM; CORREIA; AZEVEDO, 2006).

A eficácia da exposição ao sinal “dias longos”, com o intuito de ressensibilizar o sistema neuroendócrino face aos efeitos indutores dos “dias curtos” ou da melatonina exógena, depende do período do ano em que esta é realizada. Nas ovelhas Galway, a exposição a um regime luminoso de “dias longos”, feita entre o equinócio de outono e o solstício de inverno, não produz qualquer efeito, uma vez que o eixo neuroendócrino destes animais lhe é absolutamente insensível. Ao que tudo indica, a aplicação deste tratamento luminoso deve ser feita próximo do solstício de Inverno e deve ter uma duração mínima de 30-60 dias, variável em função do animal (VALENTIM; CORREIA; AZEVEDO, 2006).

Os ovinos possuem um sistema neurofisiológico capaz de transformar o sinal luminoso em sinal hormonal através da sintetização da melatonina e detecta as variações anuais e a duração do fotoperíodo (WILLIAMS; HELLIWELL,1993; MCMILLEN; HOUGHTON; YOUNG, 1995; ARENDT, 1998; MALPAUX et al., 2002).

A melatonina é liberada para a circulação periférica apenas durante a noite, funcionando como indicador da duração do fotoperíodo (ARENDRT, 1986). Assim, durante o período de luz as concentrações sanguíneas de melatonina não são detectáveis, aumentando rapidamente com a fase escura e mantendo-se elevadas até ao final da noite (ARENDRT, 1986). A alteração do fotoperíodo modifica a amplitude e duração do sinal de melatonina e altera a fase circadiana coincidente (BARTNESS; GOLDMAN, 1998). Existem duas hipóteses tendo em conta os parâmetros críticos do sinal de melatonina. Watson, Whitmyre e Stetson (1983) indicam a existência de um ritmo circadiano inato de sensibilidade, o qual é regulado por um ciclo de luz/obscuridade respondendo às alterações do fotoperíodo quando o sinal de melatonina coincide com o período sensível.

Alternativamente, Autores como Carter e Goldman (1983) e Wayne, Malpaux e Karsch (1988), apoiam a hipótese de que a resposta de um animal ao fotoperíodo está dependente da duração da exposição a um sinal contínuo de melatonina, independentemente de este ocorrer durante o dia ou noite. Assim, ovelhas pinealectomizadas respondem a infusões de melatonina independentemente do momento da sua administração, ao longo de um período de 24 horas.

O mecanismo de ação da melatonina, de modo a mediar os diversos efeitos do fotoperíodo, permanece por clarificar em múltiplos aspectos. Assim, a melatonina poderá atuar diretamente na pituitária anterior ou em outros locais do cérebro, influenciando indiretamente a atividade da glândula pituitária. Lincoln (1992) apresenta dois modelos para explicar os mecanismos de ação da melatonina. A primeira hipótese indica que o efeito principal da melatonina é ao nível da via neurológica dopaminérgica e/ou opióide na região médiobasal do hipotálamo (RASMUSSEN, 1991; LINCOLN; MAEDA, 1992). Estas células influenciam a atividade dos neurônios neurosecretores do hipotálamo, os quais apresentam terminações nervosas na eminência mediana. A secreção para o sistema sanguíneo porta hipotálamo-hipofisário permite a regulação de diferentes tipos celulares da adenohipófise. Existe evidência do efeito inibitório do sistema dopaminérgico na libertação de GnRH/LH, podendo desempenhar um papel importante na supressão da atividade reprodutiva durante o anestro sazonal, atuando ao nível da região médio basal do hipotálamo (MEYER; GOODMAN, 1986). A segunda hipótese indica, como local principal da atuação da melatonina, a “pars tuberalis” da glândula pituitária (MORGAN; WILLIAMS, 1989). A “pars tuberalis”, em resposta à melatonina, produz um fator desconhecido que afeta a função secretora da parte anterior da glândula pituitária. Este fator, por sua vez, pode atuar na eminência mediana ou em outros locais do cérebro, de modo a influenciar o controle hipotalâmico da glândula pituitária, ou pode atuar diretamente nas células da glândula pituitária (MORGAN; WILLIAMS, 1989).

O aumento noturno da melatonina vai mediar o efeito “inibidor” dos dias longos, bem como o efeito “indutor” dos dias curtos (KARSCH et al., 1984). Assim, durante os dias curtos, a melatonina induz o pulso gerador de LH a ser mais resistente ao efeito inibidor do estradiol, enquanto que, o efeito supressor da melatonina, durante os dias longos, diminui o pulso gerador de LH sensibilizado-o à ação inibidora do estradiol.

Assim, endocrinologicamente, o anestro sazonal pode ser caracterizado como um período durante o qual o eixo hipotalâmico-hipofisário fica altamente sensível aos efeitos de retroalimentação negativa do estradiol, mantendo-se baixos os níveis de secreção tônica de LH bem como os níveis séricos de progesterona. (KARSCH et al., 1980 ; HARESIGN et al., 1985; O’CALLAGHAN; ROCHE; KARSCH, 1987).

Fitzgerald e Stellflug (1991), estudando o efeito endógeno da melatonina na fertilidade e na concentração de hormônios reprodutivos, verificaram que a fertilidade dos carneiros tratados com melatonina (91%) foi similar àqueles do outono (93%) e superior

aos animais controles na primavera (62%), sugerindo que seu efeito na secreção de Testosterona é acentuado, mostrando que o fotoperíodo possui um papel fundamental na atividade reprodutiva do carneiro.

Romão (2002) avaliando o efeito da melatonina em características reprodutivas de carneiros das raças Merina Preta e Campaniça em Portugal, após o inverno e no início da primavera, durante treze semanas, avaliou-se em todos os carneiros o perímetro testicular e características seminais (volume, concentração, motilidade individual, coloração vital e anomalias espermáticas). Não foram encontradas diferenças significativas entre animais tratados e não-tratados e entre as duas raças. Notaram-se diferenças significativas ($p < 0,001$) entre algumas semanas no perímetro testicular, concentração, motilidade individual e coloração vital. Na avaliação do sêmen a correlação positiva encontrada entre a motilidade individual e a coloração vital foi a mais elevada ($r = 0,64$; $p < 0,001$).

A adequada aplicação de tratamentos luminosos é pouco exequível numa exploração ovina comum e é particularmente cara, pois implica a utilização de instalações apropriadas, cuja construção e manutenção são bastante onerosas (VALENTIM; CORREIA; AZEVEDO, 2006).

3.7 Testosterona

A espermatogênese ocorre nos testículos, de modo permanente e contínuo, a partir da puberdade, quando os níveis hormonais de FSH e LH elevam-se e ocorre o amadurecimento do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonádico, sob o controle fisiológico do sistema neuroendócrino, sofrendo influência direta da termorregulação escroto-testicular (SANTOS; SIMPLÍCIO, 2000; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A puberdade é definida no macho como a época em que atinge a capacidade de fertilizar uma fêmea. Ocorre entre seis a sete meses nos ovinos. Essa idade é afetada por fatores como níveis de testosterona e gonadotrofinas circulantes, raça, nível nutricional e meio ambiente. Nessa fase, os testículos passam a responder de forma mais eficiente aos estímulos das gonadotrofinas, hormônio do crescimento e prolactina, induzindo a esteroidogênese. O principal estímulo endócrino da espermatogênese é o andrógeno (GONZÁLEZ, 2002).

A regulação da espermatogênese envolve mecanismos parácrinos e endócrinos, onde a estimulação endócrina dá-se pela liberação do FSH e LH, além da ação da testosterona produzida pelas células de Leydig. Altas concentrações de testosterona são necessárias para a espermatogênese, em especial no processo de meiose (ABELLA, 1986; HAFEZ; HAFEZ, 2004). Durante a estação reprodutiva, ocorrem pulsos de GnRH, juntamente com LH, que se apresentam com alta frequência e baixa amplitude e um aumento das concentrações séricas de testosterona; já na estação não reprodutiva os pulsos do LH acontecem com baixa frequência e alta amplitude com diminuição da testosterona variando seus valores entre as estações de transição (RHIM; KUEHL; JACKSON, 1993).

As alterações do fotoperíodo durante o ano em espécies sazonais, determinam flutuações na secreção de LH e andrógenos, causando mudanças no funcionamento do testículo (ABELLA, 1986; ALEU, 1992).

Lincoln, Peet e Cunningham (1977) observaram que ocorre um ritmo circadiano nas concentrações plasmáticas de FSH, LH e testosterona, com um aumento nessas concentrações durante as primeiras horas de escuridão, que parecia estar correlacionado com o ciclo de animais sazonais. Há indicação de variação estacional nas concentrações séricas de prolactina, testosterona, androstenediona, LH, FSH. A testosterona e seus derivados possuem um efeito supressivo sobre LH e FSH em carneiros, porém seus efeitos dependem da condição do animal, criptorquídico ou inteiro (MUDUULI et al., 1979).

Ovinos criados no hemisfério norte, demonstram variações estacionais nas concentrações de FSH, inibina e testosterona, com valores mínimos na primavera (março/maio), e máximos no outono (setembro/outubro). (LINCOLN; LINCOLN; McNEILLY, 1990; ELOY; SANTA ROSA, 1994).

Os hormônios são responsáveis pelo controle de todo o organismo. Os eventos reprodutivos são controlados pelos hormônios que derivam de áreas do hipotálamo, da hipófise e das gônadas sexuais. O hipotálamo secreta o fator liberador de gonadotrofina, que atua na hipófise anterior promovendo a liberação do hormônio luteinizante. Este, por sua vez, atua nas células de Leydig, presentes nos testículos, as quais são responsáveis pela produção de testosterona (CUNNINGHAM, 1999), hormônio sexual masculino responsável pela manifestação das características sexuais secundárias, pelo comportamento sexual (FOURIE et al., 2005) e pelas características de carcaça (WELLINGTON; HOGUE; FOOTE, 2003).

Brown et al. (1994) relataram que a restrição aos hormônios sexuais em machos reduz seu desenvolvimento e inibe quase que completamente a libido. Parthasarathy et al., (2002) constataram, por meio de imunização contra o GnRH, que há diminuição temporária nos níveis plasmáticos de testosterona e que isto leva a uma diminuição na expressão do comportamento de monta e no número de ejaculações. Foi demonstrado, por outro lado, que a concentração de LH e a de testosterona estão aumentadas quando os machos são colocados junto às fêmeas em estro (GONZALEZ et al., 1991; UNGERFELD; SILVA, 2004).

Dickson e Sanford (2005) avaliando o comportamento sexual e os níveis plasmáticos de testosterona em diferentes raças de ovinos, observaram que a frequência de montas teve correlação alta (0,55 a 0,78) com a concentração da testosterona.

Em clima temperado, a concentração de testosterona no macho pode ser influenciada pela estação do ano (KESKIN; KEÇECI, 2001). Nos Estados Unidos, machos da raça Finn e Dorset apresentaram aumento na secreção de testosterona cerca de dois meses após o solstício de inverno (EL-ALANY; FOOTE; HARE, 2001). Segundo Keskin e Keçeci (2001), o eixo hipotalâmico-hipofisário em carneiros adultos é estimulado com temperaturas ambientais mais baixas.

Animais Corriedale e Merino, mantidos em clima subtropical, apresentaram menores concentrações plasmáticas de testosterona no final do outono e valores mais elevados na metade do verão e início do outono (PÉREZ-CLARIGET; FORSBERG; RODRIGUEZ- MARTINEZ, 1998).

Rodrigues (2004) verificou consistência testicular e sobre as características seminais, que não causa efeito sobre os níveis de testosterona plasmática. Freitas e Nunes (1992) observaram que nas estações seca e chuvosa os machos não apresentaram diferenças significativas na motilidade espermática entre as duas estações (94,6 e 96,4%, respectivamente).

A nível hipofisário existem três hormônios com importância no controle do processo reprodutivo do macho: o LH, FSH e a prolactina. Contrariamente o FSH, LH e a prolactina são secretados de modo pulsátil (LAPWOOD, 1986). A testosterona, sintetizada a nível testicular, sob influência do LH, é também secretada de modo pulsátil verificando-se um pico aproximadamente 30 minutos após um pico de LH (LAPWOOD, 1986). A testosterona inibe a liberação de LH por um mecanismo de retroalimentação negativa, ocorrendo este processo por alterações da liberação hipotalâmica de GnRH (PELLETIER,

1970) e por alterações na resposta hipofisária ao GnRH endógena (PELLETIER, 1974). As flutuações de FSH são moderadas e independentes da ocorrência de pulsos de LH (SANFORD et al., 1976).

O controle da função testicular é exercido pelo LH e FSH que interagem entre si a vários níveis, sendo os seus principais locais de atuação as células de Leydig e as células de Sertoli, respectivamente, (LIPSETT, 1976). Assim, o LH estimula a produção de androgênios, principalmente a testosterona pelas células de Leydig, e a FSH atua nos túbulos seminíferos estimulando a espermatogênese (KRETSER, 1982). Já a prolactina está diretamente implicada no desenvolvimento testicular dos carneiros (RAVAULT; COUROT, 1975; RAVAUULT, 1976), podendo atuar também como hormônio permissivo em sinergia com o LH e testosterona (LAPWOOD, 1986). A testosterona estimula a espermatogênese nos túbulos seminíferos, controla o desenvolvimento e função dos órgãos reprodutivos e o comportamento sexual secundário (CHRISTENSEN, 1975). É ainda responsável pelo aparecimento de características sexuais secundárias e interage com o LH e FSH no controle do início e manutenção da espermatogênese (HAFEZ, 1987; CHRISTENSEN, 1975; COUROT; REVIERS, PELLETIER, 1975).

A frequência de pulsos de LH e testosterona aumenta durante o outono, quando a duração dos dias diminui (PELLETIER et al., 1982). Sandford; Palmer; Howland(1977), num estudo realizado durante a estação reprodutiva, observaram que quando a duração do período de luz diária diminui, de 14:30 para 9:30 horas, aumenta a frequência de pulsos de LH e diminui a sua amplitude, verificando-se concomitantemente um aumento da frequência e amplitude dos pulsos de testosterona.

A correlação elevada ($r = 0.95$) que se verifica entre o aumento da frequência de picos de LH e o aumento das concentrações médias de testosterona, sugere que, no início da estação reprodutiva, o aumento da concentração média de testosterona deve-se ao aumento da frequência de pulsos de LH. À medida que progride a estação reprodutiva este efeito é potencializado. Em Ovinos, verifica-se que pulsos de LH de amplitude sucessivamente mais baixos induzem maiores elevações na concentração sérica de testosterona, devendo-se esta variação possivelmente ao aumento da sensibilidade testicular à ação do LH (SANFORD; PALMER; HOWLAND, 1977). Sarlos et al. (1996) encontraram diferenças significativas nas concentrações médias de testosterona entre o outono (16,53 ng/mL) e a primavera (5,28 ng/mL) em ovinos.

De acordo com alguns autores, as alterações sazonais na secreção de LH e testosterona são influenciadas pela raça (SCHANBACHER; LUNSTRA, 1976), idade (WILLIAMS; RUTTLE; EZAZ, 1976) e pela exposição prolongada do carneiro a ovelhas em estro (ILLIUS; HAYNES; LAMMING, 1976). Independentemente dos carneiros estarem ou não em período de cobrição, os níveis sanguíneos de testosterona diminuem do meio do inverno à primavera (KATONGOLE; NAFTOLIN; SHORT, 1974). No entanto, em carneiros Finnish Landrace, um período de cobrição no final da estação reprodutiva pode conduzir ao aumento temporário dos níveis de FSH (SANFORD et al., 1974), LH e testosterona (SANFORD et al., 1974; SANFORD et al., 1976). Outros autores descrevem ainda que as concentrações sanguíneas de testosterona podem ser afetadas negativamente por aumentos significativos de temperatura (GOMES; BUTLER; JOHNSON, 1971).

A testosterona está diretamente envolvida em vários processos reprodutivos e apresenta flutuações de uma estação para a outra (GOMES; JOYCE, 1975; SANFORD et al., 1976; SCHANBACHER; LUNSTRA, 1976). Ainda não se sabe, porém, se a baixa atividade no verão seria resultante dos baixos níveis desse hormônio ou de uma combinação de fatores ambientais e fisiológicos.

Quando à avaliação da atividade sexual e dos níveis de LH e de testosterona, em carneiros das raças Finnish Landrace e Suffolk, Schanbacher e Lunstra (1976) encontraram baixa concentração de LH sanguíneo no mês de maio (0,54ng/mL) e alta concentração em julho (2,0ng/mL), quando o fotoperíodo começava a diminuir.

Boland et al. (1985), trabalhando com a raça Suffolk na Austrália, também observaram maior concentração de Testosterona no mês de agosto (16ng/mL), coincidindo com a época de cobertura.

Gomes, Butle e Johnson (1971) encontraram baixa concentração de testosterona (1,9pg/100mL de sangue), quando submeteram ovinos à temperatura de 32°C em comparação aos controles (8,2pg/100mL de sangue), e justificam que isso se deu em função da queda da taxa de fluxo sanguíneo na veia espermática, o que pode não ter ocorrido com os carneiros da raça Hampshire Down, bem como nas demais raças, haja vista que as mesmas não responderam à variação da estação do ano, na concentração de testosterona.

Contudo, em ovinos são comprovadas as diferenças genótípicas com relação às secreções andrógenas em relação às concentrações de testosterona nas raças Bergamácia e Corriedale, frente à Hampshire Down. (PELLETIER et al, 1982).

REFERÊNCIAS

- ABELLA, D. H. F. **Princípios de fisiologia reprodutiva ovina**. Montevideo: Hemisfério Sur, 1986.
- ALBERIO, R.; COLAS, G. Influence of photoperiodism on sexual development of the young Ile-de-France ram. Proc. In: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 8., 1976, **Anais...** Cracow, p. 26-29, 1976.
- ALEU, J.R. Variaciones estacionales de la congelabilidad del semen caprino. In: Jornadas Internacionales de reproducción animal y inseminación artificial, 6., 1992, **Anais...** Salamanca. p.235-246, 1992.
- AMANN, R. P. Sperm production rates. In: JOHNSON, W.R. GOMES; VAN-DEMARK, N. L. (Editors) **The Testis**, New York: Academic Press, v. 2, p.433-488, 1970.
- ARENDET, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **Reviews of Reproduction**. v.3, p.13-22, 1998.
- ARENDET, J. Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammal. **Reviews of Reproductive Biology**, v. 8, p. 266-320, 1986.
- ARROYO, J. Estacionalidade Reprodutiva de la ovelha en México. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v.14, p.829-845, 2011.
- AZEVEDO, D. M. M. R.; et al. Comportamento sexual de ovinos e caprinos machos: uma revisão. **PUBVET**, v.2, n. 6, 2008. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=130> Acesso em: 15 jan 2011.
- BARTNESS, T. J.; GOLDMAN, B. D. Peak duration of serum melatonin and short day responses in adult Siberian hamsters. **Am. J. Physiol.**, v. 255, p.R812-R822, 1998.
- BELIBASAKI, S.; KOUIMTZIS, S. Sexual activity and body and testis growth in prepubertal ram lambs of Friesland, Chios, Karagouniki and Serres dairy sheep in Greece. **Small Rumin Res**, v.37, p.109-113, 2000.
- BETTENCOURT, E. M. V. C. **Caracterização de parâmetros reprodutivos nas raças Ovinas Merina Branca, Merina Preta e Campaniça**. 1999. 126f. Dissertação (Mestrado em veterinária) – Universidade Técnica de Lisboa/Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 1999.
- BICUDO, S. D. **Estudo da estacionalidade reprodutiva em carneiros Ideal: níveis séricos de testosterona, androstenediona, triiodotironina, tiroxina; biometria testicular; avaliação das características do sêmen e de parâmetros indicativos de adaptação ao clima**. 1999. 107f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- BODEN, M. J.; KENNAWAY, D.J. Circadian rhythms and reproduction. **Reproduction**, v. 132, p. 379-392, 2006.

BOLAND, M.P.; et al. The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentrations in rams. **Anim. Reprod.Sci.**,v.9,p.241-252, 1985.

BREMNER, W. J. A study of the reproductive performance of mature Romney and Merino rams throughout the year. In: BREMNER, W. J. **Reproduction in Sheep**, Austrália: Camb. Univ. Press., p. 16-19, 1984.

BROWN, B. W.; et al. Immunization of sheep against GnRH early in life: Effects on reproductive function and hormones in rams. **J. Reprod Fertil**, v.101,p.15-21, 1994.

CARTER, B. D.; GOLDMAN, B.D. Antigonadal effects of timed melatonin infusion in pinealectomised male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*). Duration is the critical parameter. **Endocrinology**,v. 124, p. 2135-2143,1983.

CEVA SANTÉ ANIMALE. **Na gestão da reprodução o tempo, é o seu melhor aliado.** Folheto.

CEVA SANTÉ ANIMALE. **Como preparar os machos para a condição óptima de reprodução.** Folheto.

CHEMINEAU, P.; et al. Control of sheep and goat reproduction : use of light and melatonin. **Anim. Reprod.Sci.**, v. 30, p.157-184, 1992.

CHRISTENSEN, A.K. Handbook of Physiology. Male Reproductive System. **American Physiological Society**, Washington, v.5,p.453-465,1975.

COLAS, G. Factors affecting the quality of ram semen. In: COLAS, G. **Sheep Production**, London: Butterworths,1983, p.453-465.

COUROT, M. Semen quality and quantity in the ram. In: THOMES, G. J.; ROBERTSON, D. E.; LIGHFOOT, R. J. **Sheep Breeding**, London: Butterworths, 1979, p.495-504.

COUROT, M.; REVIERS, M.M.; PELLETIER, J. Variation in pituitary and blood LH during puberty in the male lamb. Relation to time of birth. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.**, v.15,p.509-516,1975.

CUNNINGHAM ,J.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro:Guanabara, 1999.

DACHEUX, J. L.; et al. Seasonal variations in rete testis fluid secretion and sperm production in different breeds of ram. **J. Reprod Fert.** v.61, p. 363-371,1981.

DELGADILLO, J.A.; CHEMINEAU, P. Abolition of the seasonal release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. **Journal Reproduction Fertility**, v.94, p.45-55, 1992.

DERYCKE, G.; BISTER, J. L.; PAQUAY, R. Contribution to comparative study of season variations of sexual activity of rams from different breeds. World Congress on Sheep and Beef Cattle, 1988. 3., **Anais...** Paris, 1988. p.644-666.

DICKSON, K.A.; SANFORD, L.M. Breed diversity in FSH, LH and testosterone regulation of testicular function and in libido of young adult rams on the southeastern Canadian prairies. **Small Rumin Res**, 2005.

DYRMUNDSSON, O.R.; SIGTRYGGSSON, P.; THORSTEINSSON, S.S. Seasonal variation in testis size of Icelandic sheep. **J. Agric. Res. Icel.**, v. 13, p. 55-60, 1981.

EL-ALANY, M. A; FOOTE, R. H; HARE, E. Sperm output and hormone concentrations in finn and dorset rams exposed to long- and short-day lighting. **Theriogenology**. v.56, p.839-854, 2001.

ELOY, A.M.X.; SANTA ROSA, J. Seleção de reprodutores caprinos de acordo com os níveis de testosterona. **Ciência Animal**, v.4, p.3-8, 1994.

FITZGERALD, J.A.; STELLFLUG, J.N. Effects of melatonin on seasonal changes in reproduction of rams. **J. Anim. Sci.**, v. 69, p.264-275, 1991.

FLETCHER, I. C. Sexual Activity in Merino rams. In: TOMES, G. J.; ROBERTSON, D. E.; LIGHFOOT, R. J. **Sheep Breeding**. London: Butterworths, 1979. p.487-493.

FOURIE, P. J.; et al. Scrotal, testicular and semen characteristics of young Dorper rams managed under intensive and extensive conditions. **Small Rumin Res**, v.54, p.53-59, 2004.

FOURIE, P. J.; et al. Relationship between body measurements and serum testosterone levels of Dorper rams. **Small Rumin Res**, v.56, p.75-80, 2005.

FRANDSON, R.D.; WILKE, W.L.; FAILS, A.D. **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

FREITAS, V. J. F.; NUNES, J. F. Parâmetros andrológicos e seminais de carneiros deslanados criados na região litorânea do Nordeste Brasileiro em estação seca e chuvosa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.16, p.95-104, 1992.

GIRÃO, R. N.; MEDEIROS, L. P. Puberdade e maturidade sexual de machos de ovinos deslanados da raça Santa Inês. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 7, 1987, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 1987. p.30. Resumo.

GOLDMAN, B. D. The circadian timing systems and reproduction in mammals. **Steroids**, v. 64, p. 679-685, 1999.

GOMES, W. R.; JOYCE, M. C. Seasonal changes in serum testosterone in adult rams. **J. Anim. Sci.**, v.41, p.1373, 1975.

GOMES, W. R.; BUTLER, W. R.; JOHNSON, A. D. Effect of elevated ambient temperature on testes and blood levels and *in vitro* biosynthesis of testosterone in the ram. **J. of Anim. Sci.**, v.33, p.804-807, 1971.

GONZALEZ, R.; et al. Female effect in sheep. I. The effects of sexual receptivity of females and the sexual experience of rams. **Reprod Nutr Dev**, v.31, p.97-102, 1991.

GONZÁLEZ, F.H.D. **Introdução à endocrinologia reprodutiva veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2002.

GRANADOS, L. B. C.; DIAS, A. J. B.; SALES, M. P. **Aspectos Gerais da Reprodução de Carneiros e Ovinos**. Rio de Janeiro: Campos dos Goytacases, 2006.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004.

HAFEZ, E. S. E.; **Reproduction in farm animals**. 5.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987.

HARESIGN, W.; et al. Endocrine basis of seasonal anoestrus in sheep. In: HARESIGN, W.; et al. **Endocrine causes of seasonal and lactational anestrus in farm animals**. London: Butterworths, 1985, p. 201-300.

HULET, C. V.; et al. Effects of origin and environment on reproductive phenomena in Rambouillet ewes. I. Breeding season and ovulation. **J. Anim. Sci.**, v.100, p. 1210-1217, 1974.

HULET, C. V.; et al. Mating behavior of the ram in multi-sire pen. **J. Anim. Sci.**, v. 21, p. 865-869, 1962.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**, v.39, p.1-63, Rio de Janeiro, 2011.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**, v.38, p.1-65, Rio de Janeiro, 2010.

ILLIUS, A. W.; HAYNES, N. B.; LAMMING, G.E. Effects of ewe proximity on peripheral plasma testosterone levels and behavior in the ram. **J. Reprod. Fertil.**, v. 48, p.25-32, 1976.

KARSCH, F. J.; et al. Feedback basis of seasonal breeding: test of an hypothesis. **J. Reprod. Fert.**, v.58, p. 521-535, 1980.

KARSCH, F.J. Endocrine and environmental control of oestrous cyclicity in sheep. *Reproduction in sheep*. Lindsay & Pearce, **Aust. Acad. Sci.**, p.10-5, 1984.

KARSCH, F.J.; et al. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. **Rec. Prog.Horm. Res.**, v.40, p. 185-225, 1984.

KATONGOLE, C. B.; NAFTOLIN, F.; SHORT, R. V. Seasonal variations in blood luteinizing hormone and testosterone levels in rams. **J. Endocrinol.** v.60, p.101, 1974.

- KESKIN, E.; KEÇEÇI, T. Blood serum thyroid hormone levels and rumen protozoa in merino rams at different environmental temperatures. **Turk J. Vet. Sci.**, v.17,p.115-118, 2001.
- KNIGHT, T.W. Methods for indirect estimate of testis weight and spermnumbers in Merino and Romney rams. **N.Z. J. Agric. Res.**,v. 27, p. 179-187,1977.
- KRETZER, D.M. Reproduction in Mammals. In: AUSSTIN, C.R.;SHORT,R.V.ed. **The Testis**, Camb.Univ. Press.v.3,p.76-90, 1982.
- LAND, R. B. The mating behaviour and semen characteristics of Finnish Landrace and Scottish Blackface rams. **Anim. Prod.**,v.20,p.270-274, 1970.
- LAND, R. B.; DRURY, D.J.; FORDYCE, M. Season of birth and the response to hemicastration in lambs. **Anim Prod.**, v.29,p. 379-384, 1979.
- LAPWOOD, K.R. Development of the Male Reproductive Tract, Spermatogenesis and Puberty. In:MORROW, D.A.**Current Therapy in Theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders Co.,p.867-869, 1986.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination.**Animal Reproduction Science**, v.62, p.113-141, 2000.
- LINCOLN, G. A. Photoperiod-pineal-hypothalamic relay in sheep. **Anim. Reprod.Sci.**, v. 28, p.203-217, 1992.
- LINCOLN, G. A.; MAEDA, K.I. Reproductive effects of placing micro-implants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area in rams. **J.Endocrinology.**, v.132,p. 201-215,1992.
- LINCOLN, G.A.; LINCOLN, C. E.; McNEILLY, A. 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. **Journals of Reproduction and Fertility**, v.88, p.623-633, 1990.
- LINCOLN, G.A.; PEET, M.J.; CUNNINGHAM, R.A. Seasonal and circadian changes in the episodic release of FSH, LH and testosterone in rams exposed to artificial photoperiods. **Journal of Endocrinology**, v.72, p.337, 1977.
- LIPSETT, M.B. Regulation of testicular functions. **Andrologia**,v. 8,p. 43-60, 1976.
- LOPATE, C.; LEBLANC, M.; KNOTTENBELT, D.The Stallion.In: KNOTTENBELT, D. C.; LEBLANC, M.; LOPATE, C.; PASCOE, R. R. **Equine stud farm medicine and surgery**. London: Elsevier Science, 2003 p.43-112.

MAIA, M. S; MEDEIROS, I. M; LIMA, C. A. C. Características Reprodutivas de Carneiros no Nordeste do Brasil: Parâmetros Seminais. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35,n.2,p.175-179, abr./jun.2011. Disponível em: <www.emparn.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/emparn/arquivos/publicacoes/caracrep rodcarneirosne%20rb349%20%20pag175-179%202011.pdf> Acesso em: 10 jun 2012.

MALPAUX, B.; et al. Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrinemechanisms using the sheep as a model. **Reproduction Supplement**.v. 59,p.167-179, 2002.

MARTIN, G. B.; WALKDENBROWN, S. W.Nutritional influences on reproduction in mature male sheep and goat. **J Reprod Fertil Suppl**, n.49, p.437-449, 1995.

MATOS, C. A. P.; et al. Genetc analyses of scrotal circumference size and growth in Rambouillet lambs. **J. Anim. Sci.** v.70, p.43-50, 1992.

MAURYA, V. P.; et al. Effect of induced body condiction score differences on sexual behavior, scrotal measurements, semen attributes and endocrine responses in Malpura rams under hot semi-arid environment. **J Anim Physiol Anim Nutr**, v.94, p.e308-e317, 2010.

McMILLEN, J.C., HOUGHTON, D.C., YOUNG, I.R. Melatonin and the development of circadian and seasonal rhythmicity.**Journal of Reproduction and Fertility, Suppl.** v.49,p.137-146, 1995.

MEYER, S. L.; GOODMAN, R.L. Separate neural systemes mediate the steroiddependent and steroid independent suppression of tonic luteinizing hormonescretion in the anoestrous ewe. **Biol. Reprod.**,v. 35,p. 562-571, 1986.

MIES FILHO, A. Fatores climáticos na reprodução ovina. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 5,1983, Belo Horizonte. **Anais...** Campinas, Fundação Cargill, 1984, p.37-44.

MIES FILHO A. **Reprodução dos animais domésticos e Inseminação Artificial**. 6.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987.

MORGAN, P. J.; WILLIAMS, L.M. Central melatonin receptors: Implications for mode of action. **Experientia**,v. 45,p.955-956, 1989.

MUDUULI, D.S.; et al. Secretary Patterns and Circadian and Seasonal Changes in Luteinizing Hormone, Follicle Stimulating Hormone, Prolactin and Testosterone in the Male Pygmy Goat. **Journal of Animal Science**, v. 49, p. 543-553, 1979.

NUNES, J.F. **Fisiologia sexual do macho caprino**. Sobral: EMBRAPA – CNPC, 1982. 41p. (Circular Técnica, 5).

O'CALLAGHAN, D.; ROCHE, J. F.; KARSCH, F. J. Endocrine causes of seasonality in the ewe. Annual Meeting of the European Association forAnimal Production, 38., 1987. **Anais...**,Lisboa, 1987.

OLDHAM, C.M., et al. The influence of level of feed intake on sperm-producing capacity of testicular tissue in the ram. **Aust. J. Agric. Res.**, v.29,p. 173-179, 1978.

OLIVEIRA, R. P. M., OLIVEIRA, F. F. Manipulação do Ciclo Estral em Ovinos. **PUBVET**, v.2, n.7, 3 fev, 2008.

OLIVEIRA, D. M. de.; SANTOS, A. C. dos.; CAVALCANTI, J. C. Avaliação das características reprodutivas e ponderais em ovinos pré – púberes machos. **REDEVET**. v.13, 2012,n. 12, p. 1-9. Disponível em: <www.redalyc.org/articulo.oa?id=63625154003 > Acesso em: 10 jun 2012.

OLIVEIRA, A. A. P.; LIMA, V. P. M. S. Aspectos econômicos da caprino-ovinocultura tropical brasileira.In: Semana da Caprinocultura e da Ovinocultura Tropical Brasileira. Sobral,1.,1994. **Anais...** EMBRAPA-CNPC, 1994.

ORTAVANT, R.; et al. Photoperiod main proximal and distal fator of the circannual cycle of reproduction in farm animals. In: **Oxford Reviews of Reproductive Biology**,v. 7,p.305-345,1985.

ORTAVANT, R. **Reproduction in Domestic Animals**, Cole,New York: H.H. and Cupps. Academ.Press, 1959.

PARTHASARATHY, V.; et al. Passive immunization of rams (*Ovis aries*) against GnRH: effects on antibody titer, serum concentrations of testosterone, and sexual behavior. **Anim Reprod Sci**, v.71, p. 203-215, 2002.

PELLETIER, J.; et al. Seasonal variation in LH and testosterone release in rams of two breeds. **J.Reprod. Fertil.**, v.64,p. 341-346, 1982.

PELLETIER, J. Mode of action of testosterone propionate on the secretion and release of luteinizing hormone (LH) in the castrated ram. **Acta Endocrinol**, v.63,p. 290-297, 1970.

PELLETIER, J. Decrease in the pituitary response to synthetic LH-RF in castrated ram following testosterone propionate treatment. **J. Reprod. Fertil.**,v.41,p. 397-405, 1974.

PÉREZ-CLARIGET, R; FORSBERG, M; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Seasonal variation in live weight, testes size, testosterone, LH secretion, melatonin and thyroxine in Merino and Corriedale rams in a subtropical climate. **Acta Vet Scand**, v.39, p.35-47, 1998.

POULTON, A. L.; ROBINSON, T. J.The response of rams and ewes of three breeds to artificial photoperiod.**J. Reprod. Fertil.**,v.79,p.609-626, 1987.

RASMUSSEN, D.D. The interaction between mediobasalhypothalamic dopaminergic neuronal systems as a key regulator of reproduction: a Hypothesis. **J. Endocrinol. Invest.**,v.14,p. 323-352, 1991.

RAVAULT, J.P. Prolactin in the ram: seasonal variation in the concentration of blood plasma from birth until three years old. **Acta Endocrinol.**,v.83,p.720-725, 1976.

RAVAULT, J. P.; COUROT, M. Blood prolactin in the male lamb from birth to puberty. **J. Reprod Fert.**, v.42, p. 563-566, 1975.

RHIM, T. J.; KUEHL, D.; JACKSON, G.L. Seasonal changes in the relationships between secretion of Gonadotropin-Releasing Hormone, Luteinizing Hormone and Testosterone in the ram. **Biology of Reproduction**, v.48, p.197-204, 1993.

RIBEIRO, S. D. de A. **Caprinocultura: Criação Racional de Caprinos** / Silvio Doria de Almeida Ribeiro. – São Paulo: Nobel, 1997.

RODRIGUES, A. L. R. Avaliação do Testículo e da cauda do epidídimo de carneiros na pré-puberdade, na maturidade sexual, no criptorquidismo e na insulação escrotal: concentração de testosterona plasmática e tecidual, histamina, fator de necrose tumoral e óxido nítrico. 2004. 106f. Tese (Doutorado em Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, 2004.

ROMÃO, R. Efeito da melatonina em caracteres reprodutivos de carneiros das Raças Merina Preta e Campaniça. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, 2002.

ROSA, H.J.D.; JUNIPER, D.T.; BRYANT, M.J. The effect of exposure to oestrous ewes on rams' sexual behaviour, plasma testosterone concentration and ability to stimulate ovulation in seasonally anoestrous ewes. **Appl Anim Behav Sci**, v.67, p.293-305, 2000a.

ROSA, H.J.D.; JUNIPER, D.T.; BRYANT, M.J. Effects of recent sexual experience and melatonin treatment of rams on plasma testosterone concentration, sexual behavior and ability to induce ovulation in seasonally anoestrous ewes. **J Reprod Fertil**, v.120, p. 169-176, 2000b.

SANFORD, L.M.; et al. The profile of LH and testosterone secretion in the ram. **Endocrinology**, v.95, p. 627-634, 1974.

SANFORD, L.M.; et al. The profile of follicle-stimulating hormone secretion in the ram. **Endocrinology**, v. 99, p. 752-760, 1976.

SANFORD, L.M.; PALMER, W.M.; HOWLAND, B.E. Changes in the profiles of serum LH, FSH and testosterone, and in mating performance and ejaculate volume in the ram during the ovine breeding season. **J. Anim Sci.**, v.45, n.6, p. 1382-1391, 1977.

SANTOS, D.O.; SIMPLÍCIO, A.A. Parâmetros escroto-testiculares e de sêmen em caprinos adultos submetidos à insulação escrotal. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.35, n.9, p.1835-1841, 2000.

SARLOS, P.; et al. Seasonal changes of andrological characteristics in British Milk ram. **Archiv fur Tierzucht.**, v.39, p. 265-275, 1996.

SÁ, C.O. Manejo reprodutivo para intervalo entre partos de oito meses. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE OVINO CULTURA, 5., 2002, Botucatu. **Anais...** Botucatu: ASPACO, 2002, p.8-20.

SCHANBACHER, B. D.; LUNSTRA, D.D. Seasonal changes in sexual activity and serum levels of LH and testosterone in Finnish Landrace and Suffolk rams. **J. Anim. Sci.**, v.43, p.644-650, 1976.

SELAIVE-VILLARROEL, A. B. Manejo Reprodutivo dos ovinos. In: Simpósio Paulista de Ovinocultura, 1., 1989, Botucatu. **Anais...** Campinas: Fundação Cargil, 1989, p. 67-79.

SILVA, J.C.C. Variações sazonais das características dos ejaculados obtidos por electroejaculação de ovinos Saloios. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal. 2., 1991, Lisboa. **Anais...** Portugal, 1991., p. 140-157.

SIMPLÍCIO, A. A.; SIMPLÍCIO, K. M. M. G. Caprinocultura e Ovinocultura de corte: Desafios e oportunidades. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária, Brasília.** n.39, p.7-17, 2006

SNOWDER, G.D.; STELLFLUG, J.N.; VAN VLECK, L.D. Heritability and repeatability of sexual performance scores of rams. **J Anim Sci**, v.80, p.1508-1511, 2002.

SOUZA, C. E. A.; et al. Desenvolvimento testicular, idade à puberdade e características seminais em carneiros da raça santa Inês do estado do Ceará. **ARS Veterinária**, v.25, n.2, 2009. Disponível em: <www.bovinos.ufc.br/sbz 2000.pdf> Acesso em :20 ago 2012.

SOUZA, J. A. T.; et al. Biometria testicular, características seminais, libido e concentrações de testosterona em ovino da raça Santa Inês, na Microrregião de Campo Maior, PI. **Ciênc Vet Trop**, v.10, p. 21-28, 2007.

STAPLES, L. D; et al. The influence of exogenous melatonin on the seasonal patterns of ovulation and oestrus in sheep. **Anim Reprod Sci**, v. 30, p.185-223, 1992.

STELLFLUG, J.N.; LEWIS, G.S. Effect of early and late exposure to estrual ewes on ram sexual performance classifications. **Anim Reprod Sci.** v.97, p.295-302, 2007.

THIÉRY, J. C.; et al. Neuroendocrine interactions and seasonality. **Domest Anim Endocrinol**, v.23, p.87-100, 2002.

TRALDI A.S. Biotécnicas Aplicadas em Reprodução de Pequenos Ruminantes. In: Feira Internacional de Ovinos e Caprinos, 3., 2006. **Anais...** São Paulo, 2006.

TULLEY, D.; BURFENING, P.J. Libido and scrotal circumference of rams as affected by season of the year and altered photoperiod. **Theriogenology**, v. 20, p.435-448, 1983.

UNGERFELD, R.; SILVA, L. Ewe effect: endocrine and testicular changes in experienced adult and inexperienced young Corriedale rams used for the ram effect. **Anim Reprod Sci**, v.80, p.251-259, 2004.

VALENTIM, R. C.; CORREIA, T. M.; AZEVEDO, J. M. T. Utilização de implantes de melatonina em ovinos. **Albeitar**.v.2, n.6, p. 18-23, nov-dez 2006.

VALENTIM, R. C.; Estudo da sazonalidade sexual em carneiros da raça Churra Galega Bragança. Aplicação de dois tratamentos – luz e melatonina. 2004. 225f. Tese (Dotourado em Veterinária). Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 2004.

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiol. Rev.**, v. 78, p. 687-721, 1998.

WATSON, R. H.; WHITMYRE, M.; STETSON, M.H. Stimulation of peak melatonin release restores sensitivity to evening melatonin injections in pinealectomised hamsters. **Endocrinology**, v.112, p.763-765, 1983.

WAYNE, N.L.; MALPAUX, B.; KARSCH, F.J. How does melatonin code for daylength in the ewe: Duration of nocturnal melatonin release or coincidence of melatonin with a light-entrained sensitive period. **Biol. Reprod.**, v.39, p. 66-75, 1988.

WELLINGTON, G.H.; HOGUE, D.E.; FOOTE, R.H. Growth, carcass characteristics and androgen concentrations of gonadally altered ram lambs. **Small Rumin Res**, v.48, p.51-59, 2003.

WILLIAMS, L.M.; HELLIWELL, R.A. Melatonin and seasonality in the sheep. **Animal Reproduction Science**.v.33, p.159-182, 1993.

WILLIAMS, G.L.; RUTTLE, J. L.; EZAZ, Z. Plasma androgen levels in yearling and mature rams. **J. Anim. Sci.** v.43, p.290-310, 1976.

ARTIGO CIENTÍFICO

Effect of exogen melatonin on quality of Santa Inês ram spermatozoa in a Tropical Region of Brazil.

L.B.C. Beltrão¹, D. Chesneau², F.C.S.P. Ramalho¹, B.B. Santana¹, P.R.F. Oliveira¹,
L.E.P.A. Ferreira¹, N.B. Marques¹, C.C.D. Carvalho³, G.F. Carneiro^{1*}

^{1*} Garanhuns Academic Unity, Federal Rural University of Pernambuco, 55.292-270, Garanhuns, PE, Brazil; ²INRA UMR85 - Institut National de la Recherche Agronomique - CNRS UMR 7247 Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours, Nouzilly 37380 France; ³Veterinary Medicine Department, Federal Rural University of Pernambuco, 52.171-900, Recife, PE, Brazil

Abstract

The objective of this study was to assess the effects of exogenous melatonin on testicular circumference, sperm concentration and testosterone serum concentration in Santa Inês hair sheep rams at a tropical environment with small photoperiod differences during the year. Semen samples from eight Santa Inês rams were collected and divided into 2 groups of 4 animals, a treatment group (TG), subjected to exogenous melatonin subcutaneous implants (Melovine[®], CEVA), and a control group (CG) subjected to subcutaneous application of 1 mL of saline as a placebo. Both groups were kept in barns with a mean luminosity of 11.26 hrs/day, for 120 days. Data were compared using analysis

*Corresponding author. Tel.: +55 81 9974 6663;

E-mail address: gustavo@uag.ufrpe.br (G.F. Carneiro).

of variance (ANOVA). The contrasts between means were evaluated through Student-Newman-Keuls test. There was a significant increase in serum concentration of melatonin in TG compared to CG, on the first 3 morning and evening collections ($p < 0.05$). No differences were observed in the 2 latest. Serum concentration of melatonin has demonstrated a night/day rhythm characteristic in both TG and CG groups with a difference in the mean concentration of CG melatonin in the morning (3.9 pg/mL) compared with the night sample (59.56 pg/mL), however, this difference was not observed in TG (572.45 pg/mL vs 939.52 pg/mL). An increased serum concentration of melatonin was directly proportional to the increase in scrotal circumference. Also, a significant increase was observed in sperm concentration in TG 45 days after the placement of implants. Serum testosterone concentration increased significantly in TG 45 days after placement of the implants when it began a decline in concentration of melatonin. Results of this study demonstrated that treatment with exogenous melatonin in hair sheep at tropical region had a positive effect on scrotal circumference, on sperm concentration and on serum testosterone concentration suggesting that in tropical regions with no marked difference in photoperiod, melatonin plays a role in the reproductive processes.

Keywords: Semen; Ram, Testosterone, Reproduction, Melatonin

1. Introduction

Melatonin is a natural hormone in all mammals, which is synthesized and secreted during the night by the pineal gland with daily and seasonal rhythms mainly under the control of the circadian oscillator located in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus [1]. Photoperiod is the main environmental factor controlling the seasonality of reproduction [2, 3, 4]. In seasonally breeding mammals that use changes in the photoperiod to time their reproductive cycles, temporal signals to the reproductive system

are controlled by the daily rhythm in melatonin production [5, 6, 7]. Although semen production continues throughout the year in rams, sperm quality in the non-breeding season is lower [8]. Seasonal changes in reproductive activity are clearly defined in sheep breeds from high latitudes ($>40^\circ$), where the differences in daylight duration between short days and long days are more notable [9]. It has been reported that in tropical areas the local sheep show restricted sexual activity due to high environmental temperature associated with high ambient humidity which would cause impairment of reproductive functions [10].

Plasma testosterone peaks are reached when photoperiod shortens. The pineal gland is probably important as mediator of the seasonal reproductive change in ram and endocrine responses to stimuli influence of photoperiod [11]. The secretion of melatonin, regulated by photoperiod, controls the production and release of testosterone [12].

The administration of exogenous melatonin can mimic the stimulatory effect of short days in advancing the onset of maximum reproductive parameters in seasonal rams [13]. Exogenous Melatonin is commercialized in pellets of 18 mg. It allows a constant release during 70 days after its introduction in the subcutaneous tissue, mimicking a condition such as an absence of luminosity [14]. However, studies evaluating effect of melatonin administration in tropical areas with low latitude is scarce.

The objectives of this study was to evaluate the effect of photoperiod by the use of an exogenous melatonin (Melovine[®], CEVA) in the scrotal circumference (SC), sperm concentration and serum testosterone of Santa Inês rams, noting the influence of the seasonal factor and heat stress, in a location with tropical climate, low latitude ($< 9^\circ$) and high humidity.

2. Materials and methods

2.1. Animals and melatonin implantation

The experiment was carried out at Bovine Clinics from Federal Rural University of Pernambuco located in Garanhuns city (latitude 8°53'25" S and longitude 36°29'34" W) at an altitude of 900 m. We used 8 clinically healthy Santa Inês rams, 12 months old of age, with an average daily light period of 11:26 hours/day from June to September 2012, raised under semi-intensive management with daily access to forage-based grass (*Pennisetum purpureum e Cynodon doctylon*), and a commercial grain concentrate (maize based concentrate (52.5%), wheat bran (30%), soybean (15%), ammonium chloride (0.5%), limestone (1%), water and mineral salt *ad libitum*). The rams were allocated into two groups; a control group (CG) and a treatment group (TG) subjected to three melatonin implants containing 18 mg each pellet (Melovine[®], CEVA), to the near base of ear subcutaneously by special gun 15 days before semen evaluation and blood sampling. The CG group was subject to 1 mL of saline as placebo.

2.2. Semen evaluation

Prior to start the study both groups were subjected to andrological examination in order to detect possible diseases that could interfere with their reproductive potential. The examination included a general clinical evaluation (inspection of body condition and for presence of hereditary defects and functionality of the nervous, respiratory, circulatory, digestive and musculoskeletal systems) and morphological evaluation of the genitalia (inspection and palpation of the scrotum, testis, epididymis, spermatic cords, prepuce and penis). Semen was collected using an artificial vagina with a female dummy in natural or induced estrus following the standards of the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA, 1998). Semen was collected every two weeks during the experiment, totaling 80 ejaculates. Fresh semen samples were subjectively examined for wave mass movement (0-

5), motility and vigor (0-100% and 0-5, respectively; magnification, 100 X), Neubauer chamber for concentration (400 X), and sperm pathologies by wet mount chamber (1000 X), using phase-contrast microscopy (Olympus, Tokyo, Japan). The SC was measured in centimeters (cm) using a millimeter tape on the portion of the scrotum of greatest diameter. All exams were performed after implant introduction.

These experiments received approval from the Ethics Committee for Animal Experimentation of Pío X College (Brazil) under process number CAE: 29/2012.

2.3. Blood Sampling, Melatonin and Testosterone Assay

Jugular blood samples were collected from each ram every 15 days at noon and midnight totaling 10 blood collections starting 15 days after melatonin implantation. Each sample was centrifuged at 5000 g for 10 minutes and blood plasma was stored at -20°C until assayed for melatonin and testosterone.

Melatonin assay was performed by radioimmunoassay (RIA). Using an anti-melatonin obtained on a rabbit [15] with tracer of melatonin labeled with iodine 125. The assay conditions using 100 μl of plasma double which was added 100 μl of antibody (final dilution 1/400000) + 300 μl of melatonin marked I125 (15000 cpm / tube). A nearly 24-hour incubation at 4°C , a second antibody is added (manufacturing INRA), 1 mL / tube for 1 hour at 4°C . Centrifugation is then performed for 30 minutes at 2800 g gets the supernatant. After draining the tubes are counted on a Packard gamma counter. Reference range is from 4 to 1000 pg / mL. The sensitivity is 4 pg / mL. Coefficients of variation of the RIA are 12.9 % for values less than 4 pg / mL was 4.6 % for a value of 200 pg / mL [16].

Testosterone assay was performed in a competitive immunoassay using direct chemiluminescent technology [17]. Testosterone in the sample competes with acridinium ester-labeled testosterone in the Lite Reagent for a limited amount of polyclonal rabbit

anti-testosterone antibody bound to monoclonal mouse anti-rabbit antibody, which is coupled to paramagnetic particles in the Solid Phase. The assay used Testosterone Releasing Agent to release bound testosterone from the endogenous binding proteins in the sample.

2.4. Statistical analysis

Comparisons among treatments were done with one-way ANOVA (General Linear Model procedure of the Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) [18]. A Student-Newman-Keuls test was used *post hoc* to detect differences among groups. The scrotal circumference was analyzed with a Kruskal-Wallis test. For all analyses, values were considered significant at $P \leq 0.05$.

3. Results

No significant effect was seen between TG and CG on body condition and all animals were healthy during the experiment, demonstrating no influence on metabolic parameters by melatonin implants.

There was a significant increase in Melatonin serum concentration in TG compared to CG, both morning and night samples during the first 3 blood sample collection ($p < 0.05$). At the last 2 blood sample collections, no difference was seen between TG and CG (Fig. 1).

Melatonin serum concentration showed a clear night/day rhythm in both TG and CG animals, with a significant difference ($p < 0.05$) in the mean concentration of melatonin taken in the morning (3.9 pg/mL) compared to the sample taken at night in CG (59.56 pg/mL), however this difference was not observed in the TG (572.45 pg/mL vs 939.52 pg/mL) (Fig.1).

The increase in Melatonin serum concentration in TG was directly proportional to the increase in SC (Fig.2). A significant difference in sperm concentration was seen 45 days after melatonin implant in the TG compared to CG (Fig.3).

Testosterone concentration increased significantly 45 days after melatonin implant and was inversely proportional to melatonin concentration. When melatonin starts dropping there was an increase in testosterone concentration (Fig.4).

4. Discussion

In temperate regions with high latitudes, the sheep reproductive activity is affected by season, being the photoperiod the key factor in triggering the reproductive cycle [5, 6, 7]. In tropical regions, however, where day length varies very little, such as in the case of northeastern region of Brazil, is reported that ovine species shows no reproductive seasonality, and can reproduce year-round. In this region, reproductive performance of ram is influenced mainly by nutrition and by the system of creation (extensive management). In hair sheep typical of the region, sexual behavior is more related to body weight than with seasonality [19]. In our experiment we were able to see the effect of melatonin implants on semen parameters with differences in SC directly proportional to the increase in Melatonin serum concentration associated to an increase in sperm concentration 45 days after melatonin implant in the TG proving an artificial seasonal effect due to exogenous Melatonin. This is a new information and could help to increase semen production in reproductive center at tropical areas.

It has been shown that melatonin implant in sheep conveys a short-day photoperiod signal in prolonging the breeding season [20], but the way in which melatonin implants act in tropical areas, is not clear. In fact, is reported that the effectiveness of exogenous melatonin depends on the time of the start of treatment (later as latitude increases) [14, 21]

and the genotype [22, 23]. In this experiment we used adapted hair sheep in a region with low latitude ($8^{\circ}53'25''$ S) and an average daily light period of 11:26 hours/day which did not influence the semen production of non treated animals during the whole year. A high individual variation in sensitivity to melatonin implants has been also observed [24, 25], but we were not able to see these variations in our experiment.

The increase in Melatonin concentration in TG compared to CG in both morning and night samples was expected, however, no differences was seen between morning and night samples from TG. Even at night the plateau was probably reached with the exogen melatonin which did not differ in the concentration in the morning. At the last 2 collections after 60 days of implant melatonin concentration started dropping with no difference between groups.

The increase in Melatonin serum concentration in TG was followed by an increase in SC and sperm concentration as well. The SC is used as parameter for sperm production and it is well known that as larger the SC, higher sperm production.

Testosterone concentration increased significantly also 45 days after melatonin implant when started dropping serum melatonin concentration. In rams, the onset of breeding season is characterized by an increase frequency of LH pulses in reponse to elevated levels of gonadotropin releasing hormone which is modulated by melatonin secretion by pineal gland. Elevated LH levels results in increased plasma testosterone levels and stimulates testicular development [4]. Langford et al. [25] demonstrated that melatonin stimulates spermatogenic activity in ram testis by increasing the sensitivity of Leydig cells to luteinizing hormone. In this experiment we saw this effect by a melatonin signal that translates into a possibly LH elevation within 2-4 weeks and testosterone concentration had a response 45 days later. Kusakari and Ohara [26] reported that sperm production reached maximum level in rams after 45 days of melatonin administration.

Lincoln and Ebling [27] also reported that melatonin administration in the non-breeding season result in elevated testosterone levels in rams supporting our work.

As a conclusion, administration of an exogenous melatonin (Melovine[®], CEVA) increased SC, improved sperm concentration significantly and increased serum testosterone concentration 45 days after melatonin implantation in a tropical climate environment with low latitude (< 9°) and high humidity. Further studies has been planned in order to investigate the physiological mechanisms involved in these observations.

Acknowledgments

The authors are grateful to Bovine Clinics from Federal Rural University of Pernambuco where the experiment was performed; to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) due to part of this study was financed by REPENSA PROJECT (PROJETO REPENSA/CNPq/562455/2010-8). and, as well as to CEVA Saint Animale for the donation of exogenous melatonin (@Melovine).

References

- [1] Reiter RJ. The pineal gland and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrine Rev.* 1980;1:109-131.
- [2] Hafez ESE. *Reproduction in Farm Animals*, 1987.Fifth Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 1987.
- [3] Hanif M and Williams H.L. The effect of melatonin and light treatment on the reproductive performance of yearling sufolk rams. *Br. Vet. J.*, 1991;147:49-56.
- [4] Webster JR, Suttie JM, Veenvliet B.A. Manley T.R and Littlejohn R.P. Effect of melatonin implants on secretion of luteinizing hormone in intact and castrated rams. *J. Reprod. Fert.*, 1991; 92: 21-31.

- [5] Reiter RJ: Comparative Physiology: Pineal Gland. Annual Review of Physiology 1973; 35:305-328.
- [6] Stetson, MH, Elliot JA, Menaker M. Photoperiodic regulation of hamster testis? Circadian sensitivity to the Effects of Light. Biol Reprod 1975; 13:329-339.
- [7] Terek FW, Desjardins C, Menaker M: Melatonin-induced inhibition of testicular function in adult golden hamster. Proc Soc Exp Biol Med 1976; 151:502-506.
- [8] Chemineau P, Malpaux B, Delgadillo JA, Guerin Y, Pavault JP, Thimonier J, Pelleiter J. Control of sheep and goat reproduction : use of light and melatonin. Anim.Reprod. Sci., 1992; 30:157-184.
- [9] Peletier J, Chemineau P, Thimonier J, Vollandnail P. (1987). Environmental and changes in reproductive activity in sheep and goat. Ed. P. Pevet. Karger Basel. Proc. 8th ESPC Conf. Strasbourg, Vol. 3, pp. 121-135.
- [10] Marai IFM, El-Darawany AA, Fadiel A, Abdel-Hafez MAM. (2007). Physiological traits as affected by heat stress in sheep-A review. Small Ruminant Research 2007; 71, No.1-3, (August):1-12.
- [11] Mann T, Lutwak-Mann C. Male reproductive function and semen. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York, 1981; 495.
- [12] Ritar, A.J. Seasonal changes in LH, androgens and testes in the male angora goat. Theriogenology, 1991; 36(6):959-972.
- [13] Rosa HJD, Silva CC, Bryant MJ. The effect of melatonin treatment in rams on seasonal variation of testicular size and sêmen production parameters. Small Ruminant Research 2012; Vol 102, No. 2, (February):197-201.
- [14] Staples, L.D., McPhee, S., Kennaway, D.J. and Williams, A.H., The influence of exogenous melatonin on the seasonal patterns of ovulation and oestrus in sheep. Anim. Reprod.Sci. 1992; 30: 185-223.

- [15] Tillet Y. , Ravault JP, Selue C., G. Evin, B. Castro, and MP Dubois
Terms of use of specific antibodies for immunohistochemical visualization of serotonin and melatonin in the pineal gland of the sheep. *Cr Acad Sci (Paris)* 1986; 303:77-82.
- [16] S. Fraser, P. Cowen, M. Franklin, C. Franey, J. Arendt and Direct radioimmunoassay for melatonin in plasma. *Clin Chem* 1983; 29:396-397.
- [17] Babson, AL. The immulite automated immunoassay system. *J. Clin. Immunoassay* 1991; 14:83-88.
- [18] SAS Institute. SAS User's Guide: Statistical Analysis Systems Institute. Inc Cary, 2000.
- [19] Maia MS, Medeiros IM, Lima CAC. Reproductive characteristics of rams in Northeast of Brazil: seminal parameters. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 2011; 35, n.2:175-179.
- [20] O'Callaghan D, Karsch FJ, Boland MP, Roche JF. What photoperiodic signal is provided by a continuous-release melatonin implant? *Biol Reprod.* 1991; 45:927-933.
- [21] Robinson, J.J., Wigzell, S., A&en, R.P., Wallace, J.M., Ireland, S. and Robertson, I.S., Daily oral administration of melatonin from March onwards advances by 4 months the breeding season of ewes maintained under the ambient photoperiod at 57'N. *Anim. Reprod.Sci.* 1992; 27:141-160.
- [22] Haresign, W. The effect of implantation of lowland ewes with melatonin on the time of mating and reproductive performance. *Anim. Prod.* 1992; 54:31-39.
- [23] Lopez, A. and Inskeep, E.K. Response of ewes of Mediterranean sheep breeds to subcutaneous implants of melatonin. *Livest. Prod. Sci.* 1991; 27:177-184.
- [24] Chemineau, P., Maurice, F. and Daveau, A., 1993. Re-initiation of ovulatory activity by melatonin given as a constant-release implant in long-day treated Ile-de-France ewes depends on endogenous secretion of melatonin. In: Y. Touitou, J. Arendt and P. Pévet

(Editors), Melatonin and the Pineal Gland - From Basic Science to Clinical Application Elsevier, Amsterdam, pp.247-250.

[25] Forcada, F., Zarazaga, L. and Abecia, J.A., Effect of exogenous melatonin and plane of nutrition after weaning on estrous activity, endocrine status and ovulation rate in Salzwed ewes lambing in the seasonal anestrus. *Theriogenology* 1995; 43:1179-1193.

[26] Kusakari N, Ohara M. Effect of Melatonin feeding on testicular development, reproductive behavior, and sperm production in Suffolk rams. *J. Reprod. Dev.* 1993; 39:357-361.

[27] Lincoln GA, Ebling FJP. Effect of constant-release implants of melatonin on seasonal cycles in reproduction, prolactin secretion, and moulting in rams. *J. Reprod. Fertil.* 1985; 73:241-253.

Figure legend:**Figure 1**

Mean melatonin serum levels (pg / mL) during morning (12:00) and night (00:00) in Santa Inês rams from treatment group (melatonin implanted) and control group (placebo implanted) in Northeastern Region of Brazil.

Figure 2

Mean Scrotal Circumference (cm) in Santa Inês rams from treatment group (melatonin implanted) and control group (placebo implanted) in Northeastern Region of Brazil.

Figure 3

Mean sperm concentration (10^7 / mL) in Santa Inês rams from treatment group (melatonin implanted) and control group (placebo implanted) in Northeastern Region of Brazil.

Figure 4

Mean testosterone concentration (pg / mL) in Santa Inês rams from treatment group (melatonin implanted) and control group (placebo implanted) in Northeastern Region of Brazil.

Figure 1

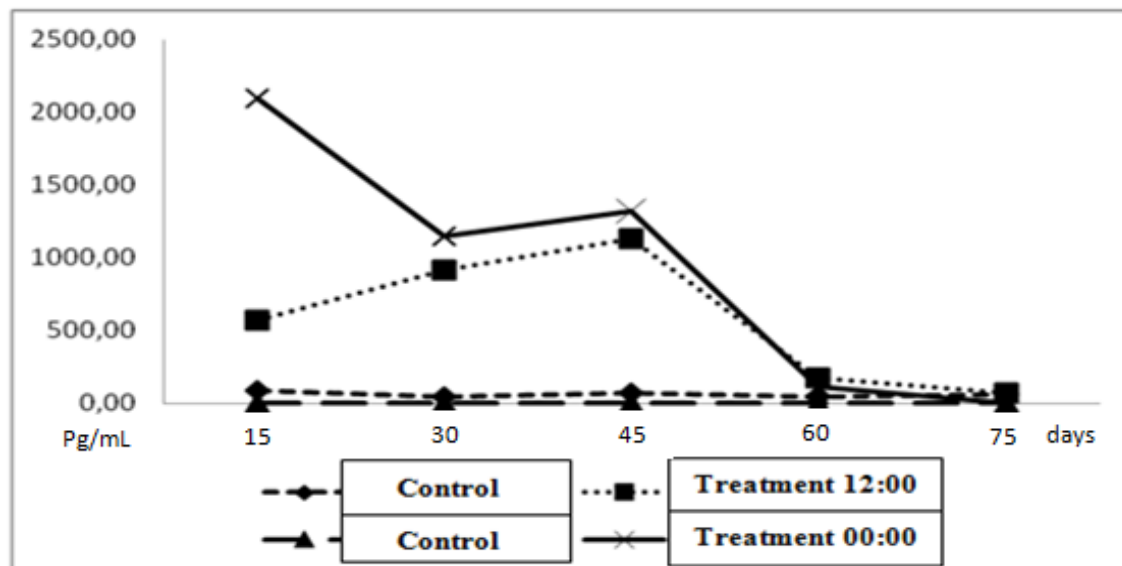


Figure 2

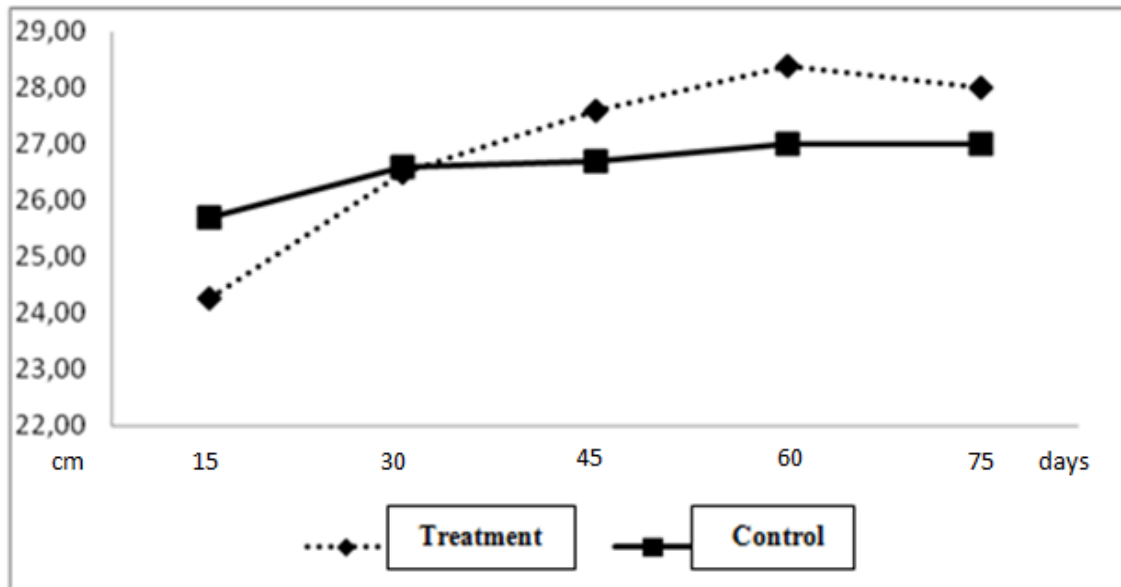


Figure 3

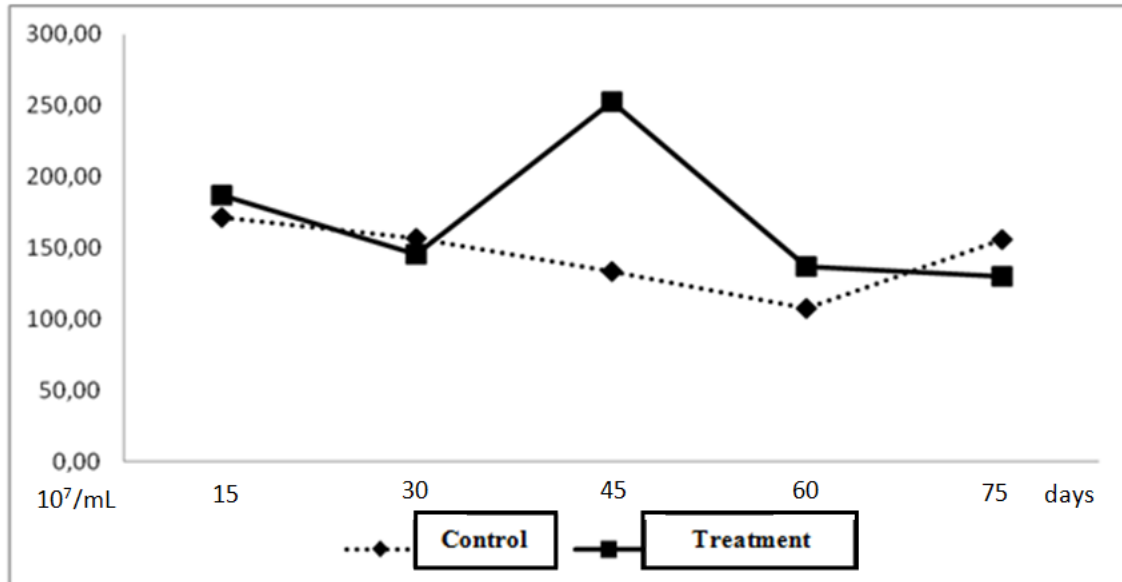
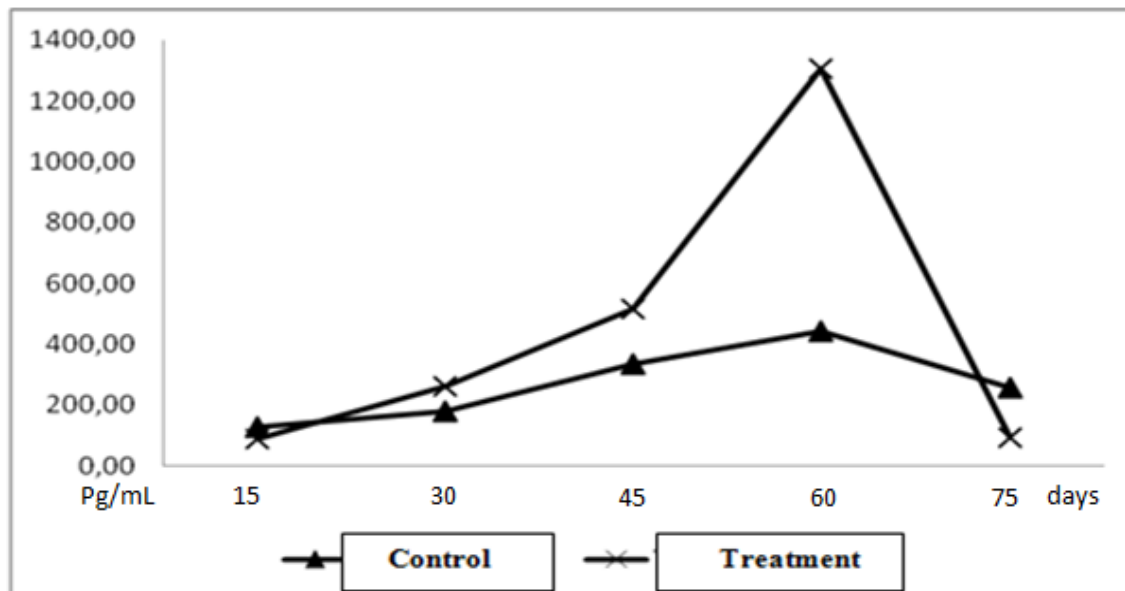


Figure 4



APÊNDICES

APÊNDICE A

TABELA 1- Média mensal dos horários do nascer do sol, ocaso do sol e quantidade de hora/luz no período de junho à setembro de 2012, no município de Garanhuns-PE.

MESES	NASCER DO SOL	OCASO DO SOL	HORAS/LUZ
Junho	5h37'	17h14'	11h26'
Julho	5h41'	17h21'	11h31'
Agosto	5h34'	17h24'	11h29'
Setembro	5h18'	17h22'	11h20'

*A tabela acima foi feita utilizando fonte de dados do Anuário do Observatório Nacional, Coordenação de Astronomia e Astrofísica (COAA).

APÊNDICE B

TABELA 2 – Média mensal dos índices pluviométrico, temperatura média máxima, temperatura média mínima, umidade relativa do ar, no período de junho à setembro de 2012 do município de Garanhuns- PE.

MESES	ÍNDICE PLUVIOMÉTRICO (mm)	TEMPERATURA MÉDIA MÁXIMA °C	TEMPERATURA MÉDIA MÍNIMA °C	UMIDADE RELATIVA DO AR
Junho	70	24,53	16,98	92,28
Julho	109,2	22,57	16,72	91,54
Agosto	122,3	23,23	16,88	91,12
Setembro	19,1	25,50	16,88	89,87

*A tabela acima foi feita utilizando fonte de dados do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia), banco de dados meteorológicos para ensino e pesquisa.

ANEXOS

ANEXO A



Aprisco onde os animais estavam alocados durante o experimento.

ANEXO B



Animais do experimento.

ANEXO C



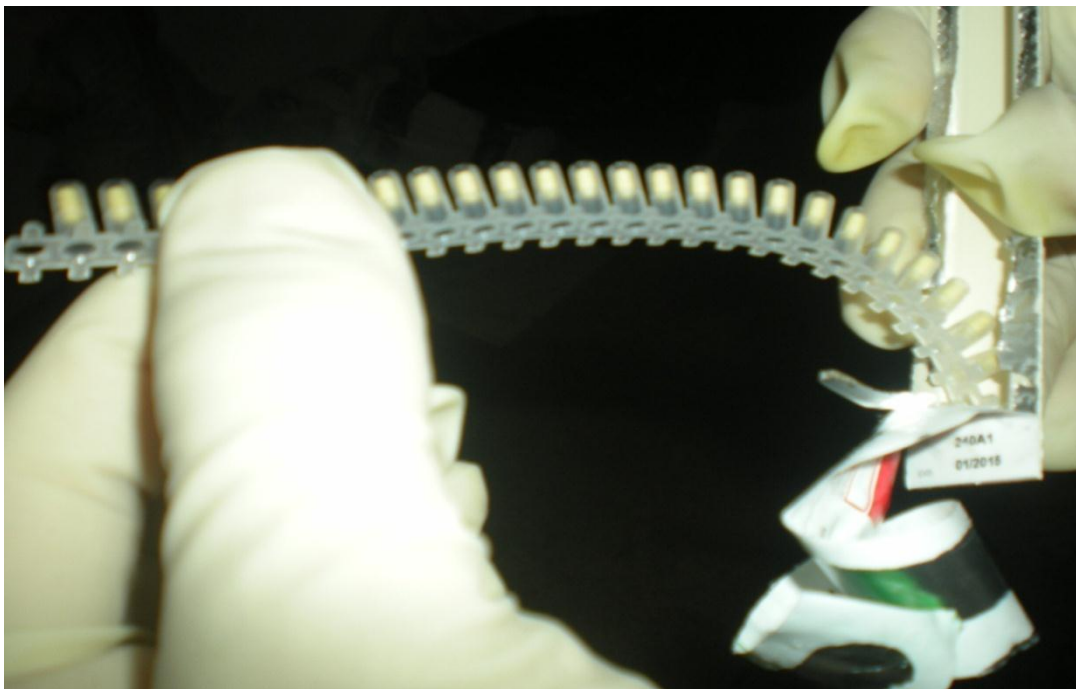
Pistola desmontada.

ANEXO D



Caixa Melovine[®], dois cartuchos e duas agulhas.

ANEXO E



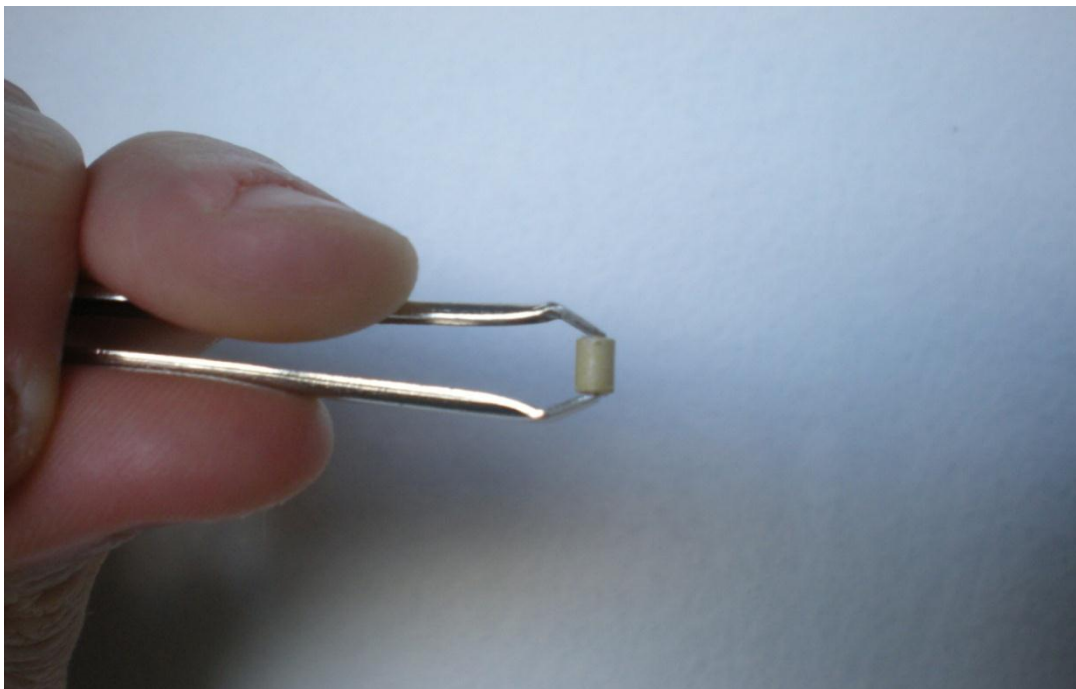
Abertura do cartucho.

ANEXO F



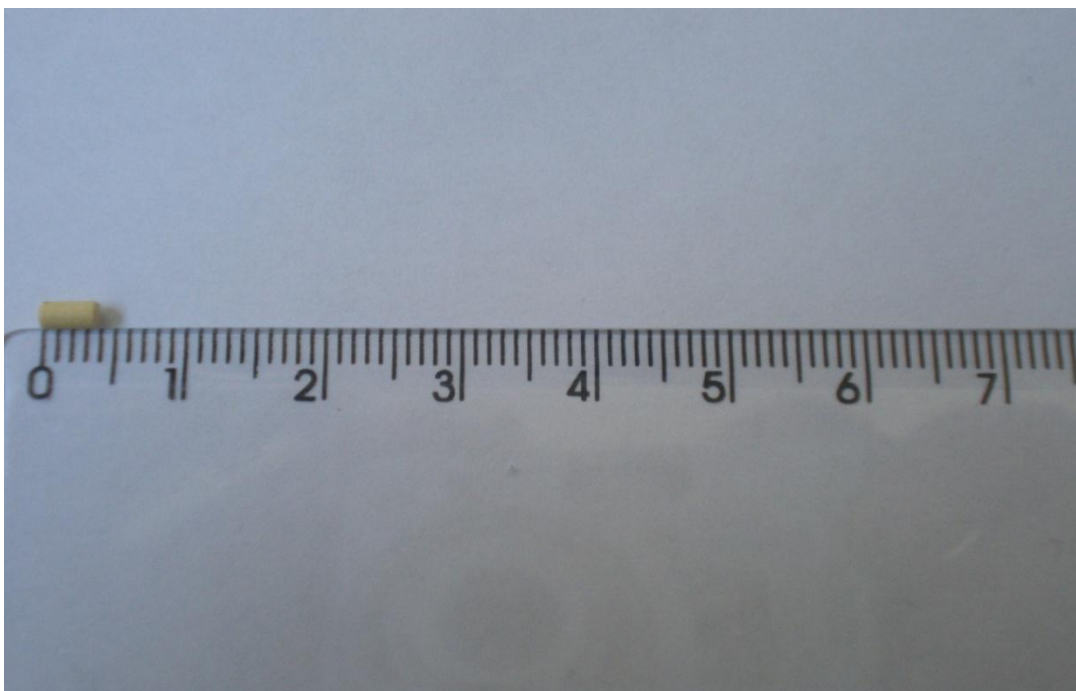
Pistola montada.

ANEXO G



Pellet de melatonina.

ANEXO H



Pellet de melatonina.

ANEXO I



Tricotomia da região do implante.

ANEXO J



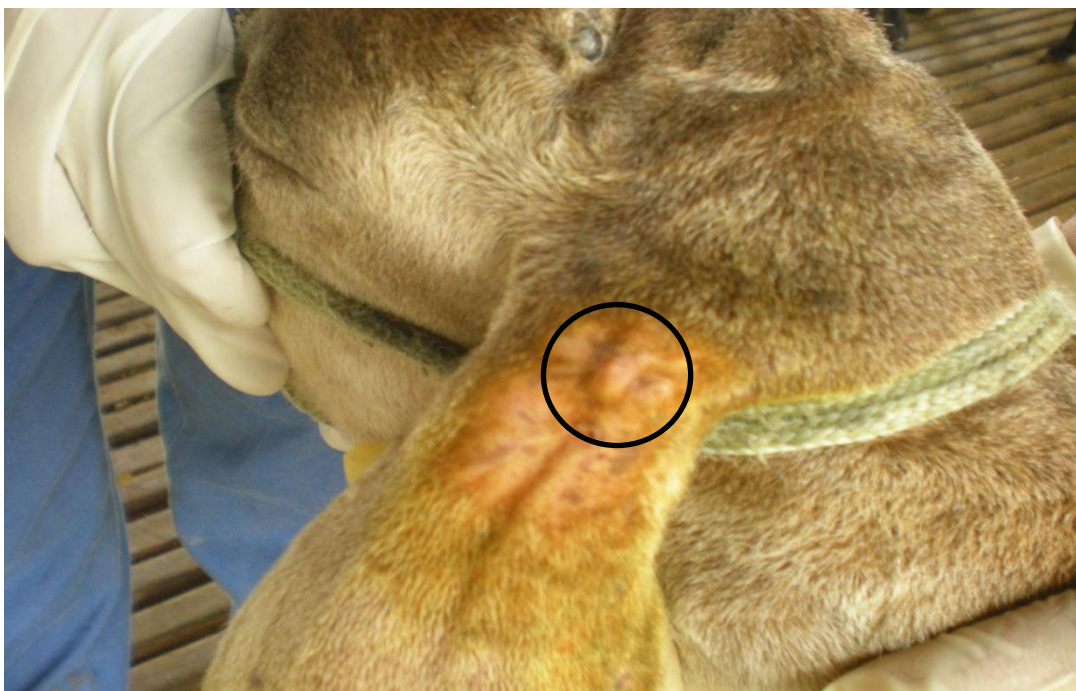
Antissepsia da região do implante.

ANEXO K



Aplicação subcutânea na base da orelha.

ANEXO L



Região após implantação dos pellets.

ANEXO M



Aplicação do placebo.

ANEXO N



Região após aplicação do placebo.

**ASSOCIAÇÃO DE ENSINO E CULTURA PIO DÉCIMO
FACULDADE PIO DÉCIMO**



**FACULDADE
PIO DÉCIMO**

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "EFEITO DA MELATONINA NA QUALIDADE SEMINAL DE CARNEIROS DESLANADOS NO AGRESTE MERIDIONAL DO ESTADO DE PERNAMBUCO", protocolo nº 29/2012, utilizando 8 (oito) carneiros, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade Pio Décimo e foi aprovado em reunião do dia 20/12/2012.

(We certify that the Research "EFFECT OF MELATONIN ON QUALITY OF SHEEP SEMINAL WOOLESS AGRESTE IN SOUTHERN STATE PERNAMBUCO", protocol number 29/2012, utilizing 8 (eight) sheep, under the responsibility of Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro, conforms to the ethical principles of animal experimentation of the Committee on Bioethics of Faculty Pio Tenth and was approved in a meeting held on 20.12.2012).

Aracaju, 21 de dezembro de 2012.

Prof. Dr. Emerson Israel Mendes
Presidente da Comissão de Bioética
Faculdade Pio Décimo



Associação de Ensino e Cultura Pio Décimo
Campus I: Rua Estância 362/382 – Bairro Centro – Aracaju – Sergipe – Telefones: +55 (79) 2106-3050 – Fax: (79) 3211-3363
Campus II: Av. Augusto Franco, 2685 – Bairro Ponto Novo – Aracaju – Sergipe – Telefone: +55 (79) 3225-7075
Campus III: Av. Tancredo Neves, 5655 – Bairro Jaboatana – Aracaju – Sergipe – Telefones: +55 (79) 3234-8400 – Fax: 3234-8429
www.piodecimo.com.br

Guide for Authors

• THERIOGENOLOGY - GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Please consult this Guide for Authors for further details on the requirements for submitting your paper to *Theriogenology*. The guidelines described in this document should be adhered to carefully, to ensure high-quality and rapid publication of your manuscript.

Theriogenology is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. *Theriogenology* publishes only material that has never been previously published and is not currently being considered for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

Types of article

1. Original Research Papers (Regular Papers)

2. Review Articles
3. Technical Notes

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects within the scope of the journal that are of active current interest. They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals.

Technical Notes are concise, comprehensive descriptions of technical aspects of innovative methods (that will not be subsequently published as a full-length paper). The entire submitted manuscript typically should not exceed approximately 12 double-spaced pages.

Page Charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>

Policy and Ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EU Directive 2010/63/EU for animal*

experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Theriogenology*.

Conflict of Interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>

Submission Declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under current consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition, analysis and interpretation of data; (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to Authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript, together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles (including abstracts) for internal circulation within their institutions. However, permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>).

Retained Author Rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details see <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the Funding Source

You are requested to identify the source(s) of financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in writing the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement, this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Open Access

This journal offers authors two choices to publish their research;

1. Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

2. Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY NC SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC-BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Creative Commons Attribution (CC-BY): available only for authors funded by organizations with which we have established an agreement with. For a full list please see www.elsevier.com/fundingbodies

Elsevier has established agreements with funding bodies. This ensures authors can comply with funding body Open Access requirements, including specific user licenses, such as CC-BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. www.elsevier.com/fundingbodies

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles. The Open Access publication fee for this journal is \$USD 2,500, excluding taxes.

Learn more about Elsevier's pricing policy

www.elsevier.com/openaccesspricing

Funding Body Agreements and Policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors, whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies, please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please

visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site

at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online; you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail, removing the need for a paper trail. **Submit your article**

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/therio>.

Referees

Please submit, as part of the covering letter with the manuscript, the names, full affiliations (department, institution, city and country) and e-mail addresses of 3 potential Referees.

Appropriate Referees should be knowledgeable about the subject, but have no close

connection with any of the authors. You may also suggest reviewers you do not want to review your manuscript, but please state your reasons for doing so.

PREPARATION

Use of word-processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format and double spaced. It is important that all pages and lines are numbered. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts, etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the word processor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. In lieu of a grid, use tabs, not spaces, to align columns. Electronic text should be prepared similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with

Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file; instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your word processor, and to read it critically.

Article Structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1. (then 1.1.1., 1.1.2., ...), 1.2., etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line, with one blank line above and below.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. Introduction should generally not exceed 2 manuscript pages (double-spaced).

Materials and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published in a readily available source should be indicated by a reference (only relevant modifications should be described).

Results

Results should be clear and concise. If data are reported in a table or figure, the text should only highlight the information, but not repeat it in detail.

Discussion

This should explore the relevance and implications of the results of the work, not simply repeat them. A combined Results and Discussion section may be appropriate. Avoid excessive citations and discussion of published literature. Although there are always exceptions, in general the Discussion section should generally not exceed 40% of the manuscript (excluding references, figures, and tables) and there should be no more than 35 references (except for review papers).

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or a Results and Discussion section.

Essential title page information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations, trade names, and formulae.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. First names or initials can be used according to author preference. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of review and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Some keywords may be identical to words used in the title, but consideration should be given to keywords which are complimentary to words used in the title (to facilitate retrieval of your article from electronic databases). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field should be used. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related

Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text). Please see *Additional Style Notes* below.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Image manipulation

Although it is generally accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long

as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork. Avoid excessively large fonts.
- For labels on figures, both those on the figure axes as well as those directly on the figure, capitalize only the first letter of the first word.
- Do not prepare a figure to communicate very limited data that could easily be included in the text of the Results.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.

Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g.,
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites), regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **Information regarding the cost of color reproduction in print will be sent by Elsevier after your article has been accepted.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Since technical complications can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version, should you not opt for color in print), if you have any figures with color that will not be published in color in the printed version, please submit two versions (color and usable black and white).

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Present incidental graphics not suitable for mention as figures, plates or schemes at the end of the article and number them "Graphic 1", etc. Their precise position in the text can then be indicated. See further information under Electronic artwork. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left, but such embedding should not be done specifically for publishing purposes. Further, high-resolution graphics files must be provided separately.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References**Citation in text**

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: "...as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result..."

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they first appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51-9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281-304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors, the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details, you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927-34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Do not abbreviate a journal name which is a single word, or is in a language other than English.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer authors additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips, etc. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including

ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. To ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Additional style notes

Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 &Mgr;g im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

Standard definitions

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- germinal vesicle: nucleus of the ovum
- zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
- embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete
- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)

- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy."

The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods):

AI	ANOVA	ADP	ATP	BSA
cAMP	CL	DEAE-cellulose	DMSO	DNA
eCG	EDTA	EGF	ELISA	FSH
GH	GnRH	hCG	HEPE	ShMG
IVC	IVF	IVM	LH	MOET
MSH	mRNA	NAD	NADH	PBS
PGF _{2α}	PGFM	PIPES	PRID	PRL
RIA	RNA	SDS-PAGE	SCNT	TRH
TRIS	tRNA	TSH		

Units of Measure

cpm - counts per min

dpm - disintegrations per min

g - gram

ga - gauge of hypodermic needle

h - hour

kg - kilogram

L - liter

mL - milliliter

μL - microliter

m - meter

min - minute

mo - month

s - second

v:v - volume ratio

wk - week

wt/vol - weight per volume

y - year

Routes of treatment

id - intradermal

im - intramuscular

iu - intrauterine

iv - intravenous

sc - subcutaneous

po - oral

Statistical expressions

ANOVA - analysis of variance

CV - coefficient of variation

df - degrees of freedom

F - variance ratio

NS - not significant

P - probability

SD - standard deviation

SEM - standard error of the mean

r - correlation coefficient

r^2 - coefficient of regression

Additional information

- For issues of style and format not addressed here, please consult *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Sixth Edition*.
- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult the CBE Manual or a current English language (collegiate-level or higher) dictionary.
- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions regarding preparation of your manuscript.

Submission Checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details regarding any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked' (and critically read and reviewed)
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information, please visit our customer support site

at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes.

Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information.

The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address, then paper proofs will be sent by post), or a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>.

Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are on the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and send by e-mail or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that if no response is received, Elsevier may proceed with publication of your article.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

Updated January 2012