



TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ADMINISTRACIÓN DE GONADOTROFINA CORIÓNIC EQUINA Y CRIOPRESERVACIÓN SEMINAL EN CHIVOS

María Noel Viera Fittipaldi

*Orientadora: Lic. MSc. Florencia Beracochea, Facultad de Veterinaria,
UdelaR*

*Co-orientador: Lic. MSc. PhD. Rodolfo Ungerfeld, Facultad de
Veterinaria, UdelaR*

Tribunal

*Dr. Danilo Fila, Dra. MSc. Lorena Lacuesta y Lic. MSc. Florencia
Beracochea*

Montevideo, Uruguay
Febrero, 2016

DEDICATORIA

“Si dejas salir tus miedos, tendrás más espacio para vivir tus sueños”

(Bob Marley)

A mi madre, por su apoyo incondicional y por ser quien me da las fuerzas para luchar por mis sueños

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Florencia Beracochea por guiarme en este proceso y estar siempre dispuesta a explicarme una y otra vez. Gracias por ser un ejemplo a seguir.

A mi co-tutor Rodolfo Ungerfeld por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de formar parte de su equipo, por su orientación y buena disposición en este proceso.

A mi compañera Lucía Acevedo por transitar conmigo este camino en el cual supimos superar los tropiezos juntas.

A mis compañeros Lorena Lacuesta, Julia Giriboni, Rosalía Morales y Matías Villagrán por la gran ayuda que me dieron y por sus consejos, sin su ayuda no hubiera sido posible. A Juan Pablo Damián por su ayuda en la estadística. A Milton Pintos y Fernando Fumagalli por el cuidado de los animales.

A Facultad de Ciencias mi casa de estudios y a Facultad de Veterinaria la cual me ha brindado la oportunidad de continuar con mi formación como investigadora.

A mi familia por su apoyo incondicional, muy especialmente a mi mamá quien ha sabido guiarme en la vida y acompañarme en todo momento. A Esteban por ser mi compañero de vida y darme las fuerzas para alcanzar mis metas. Gracias por la paciencia, te amo. A mi otra familia, gracias Daniel y Gabriela por su cariño y apoyo.

A mis amigos, tanto de Facultad de Ciencias como de Veterinaria que me ayudaron en este proceso y que siempre han sabido estar en los buenos y malos momentos.

A mis amigos de la vida que han sabido comprender mis ausencias y que siempre contamos los unos con los otros.

A Danilo Fila por aceptar ser parte del tribunal y por la rapidez en la corrección.

Gracias a todos aquellos que directa o indirectamente dieron su aporte en este proceso y que me ayudaron a formarme como persona y como profesional.

Muchas gracias!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplares de chivos de Gabón adulto.....	6
Figura 2. Representación esquemática de los días administración de las dosis de eCG y los días de colección seminal, de chivos de Gabón durante la estación no reproductiva....	11
Figura 3a. Calidad de la motilidad de semen de chivos de Gabón tratados con eCG y no tratados en función de los días de colección, durante la estación no reproductiva.....	14
Figura 3b. Calidad de la motilidad espermática de chivos de Gabón tratados con eCG y no tratados en función de las etapas (semen fresco, semen luego de la adición del diluyente, semen posdescongelación), durante la estación no reproductiva.....	14
Figura 4a. Porcentaje de espermatozoides móviles de semen de chivos de Gabón tratados con eCG y no tratados en función de los días de colección, durante la estación no reproductiva.....	15
Figura 4b. Porcentaje de espermatozoides móviles de semen de chivos de Gabón tratados con eCG y no tratados, en función de las etapas (semen fresco, semen luego de la adición del diluyente, semen posdescongelación), durante la estación no reproductiva.....	15
Figura 5a. Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva de semen de chivos de Gabón tratados con eCG y no tratados en función de los días de colección, durante la estación no reproductiva.....	16
Figura 5b. Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva de semen de chivos de Gabón tratados con eCG y no tratados en función de las etapas (semen fresco, semen luego de la adición del diluyente, semen posdescongelación), durante la estación no reproductiva.....	16
Figura 6. Porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra de semen de chivos de Gabón tratados con eCG y no tratados en función de los días de colección, durante la estación no reproductiva.....	17
Figura 7a. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro de semen de chivos de Gabón tratados con eCG y no tratados en función de los días de colección, durante la estación no reproductiva.....	18
Figura 7b. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro de semen de chivos de Gabón tratados con eCG y no tratados en función de las etapas (semen fresco, semen luego de la adición del diluyente, semen posdescongelación), durante la estación no reproductiva.....	18

CONTENIDO TEMÁTICO

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Lista de figuras.....	iii
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Regulación neuroendocrina de la espermatogénesis.....	4
1.2. Organización testicular y espermatogénesis.....	4
1.3. Estacionalidad reproductiva.....	5
1.3.1. Estacionalidad en pequeños rumiantes.....	5
1.3.2. Estacionalidad en caprinos.....	6
1.4. Control de la estacionalidad.....	7
1.5. Congelación espermática.....	7
1.6. Gonadotropina coriónica equina (eCG o PMSG).....	8
1.6.1. Origen y modo de acción.....	8
1.6.2. Estructura.....	8
1.6.3. Antecedentes del uso de eCG.....	8
2. HIPÓTESIS	10
3. OBJETIVOS	10
3.1. Objetivo general.....	10
3.2. Objetivos específicos.....	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS	11
4.1. Animales y su manejo.....	11
4.2. Colección seminal.....	11
4.3. Evaluación de semen fresco.....	12
4.4. Adición del diluyente y congelación espermática.....	12
4.5. Descongelación espermática.....	13
4.6. Análisis estadístico.....	13
5. RESULTADOS	14
6. DISCUSIÓN	19
7. CONCLUSIONES	22
8. BIBLIOGRAFÍA	23

RESUMEN

La gonadotropina coriónica equina (eCG) es una hormona que presenta actividad FSH y LH ampliamente utilizada en protocolos de inseminación de ovejas, para inducir la ovulación. Sin embargo, existen escasos trabajos que utilicen la eCG para promover la actividad reproductiva en machos. El objetivo de este estudio fue determinar si la administración de eCG a chivos de Gabón durante la estación no reproductiva mejora los parámetros seminales del semen fresco, luego de la adición de un diluyente y luego de la descongelación. Se utilizaron 20 chivos de Gabón adultos separados en dos grupos: un grupo fue tratado con eCG (grupo GeCG, n=10) y un grupo control (grupo GCon, n=10) que no recibió tratamiento. Los chivos del GeCG recibieron una dosis inicial de 800 UI, seguido por 1 dosis de 500 UI de eCG, administrada cada 5 días, durante 4 días. Se consideró la primera dosis de eCG como el día 0 del trabajo. Se colectó semen quincenalmente durante 2 meses (octubre-diciembre) mediante electroeyaculación e inmediatamente se evaluó la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides móviles y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. Además se determinó el porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales, así como la integridad de membrana y del acrosoma. Luego se adicionó un diluyente comercial (Andromed, Minitube, Alemania) a las muestras seminales y las mismas fueron congeladas en nitrógeno líquido, para su posterior descongelación 2 meses más tarde. Luego de la adición del diluyente y de la descongelación de las muestras, se evaluaron los mismos parámetros seminales que en el semen fresco. Para el análisis de los datos se consideraron tres etapas: semen fresco, semen fresco con diluyente y semen posdescongelación. Los datos fueron comparados mediante ANOVA para mediciones repetidas tomando como tratamientos la administración o no de eCG, determinando la influencia de la fecha de colección y la etapa, así como sus respectivas interacciones. Se incluyó el promedio de los datos de semen fresco obtenidos previamente a la administración de eCG en cada animal como covariable. La calidad de la motilidad fue mayor en el GeCG que en el GCon ($P=0,004$). La calidad de la motilidad varió de acuerdo a los días de colección para el GCon (6: $1,84 \pm 0,15$; 21: $2,03 \pm 0,15$; 36: $2,50 \pm 0,15$; 51: $2,14 \pm 0,15$) y para el GeCG (6: $2,26 \pm 0,15$; 21: $2,80 \pm 0,16$; 36: $2,62 \pm 0,15$; 51: $2,37 \pm 0,15$), ($P=0,01$), y disminuyó a lo largo de las etapas ($P=0,003$). Sin embargo, no hubo interacción del grupo con los días de colección ni con la etapa. El porcentaje de espermatozoides móviles tendió a ser mayor en el GeCG que en el GCon ($P=0,10$). Se observó una interacción entre el tratamiento y los días de colección ($P=0,03$), siendo mayor el GeCG en los días 6 y 21. El porcentaje de espermatozoides móviles varió a lo largo de los días de colección para el GCon (6: $44,9 \pm 2,77$; 21: $56,1 \pm 2,72$; 36: $61,7 \pm 2,72$; 55,8 $\pm 2,72$) y para el GeCG (6: $55,6 \pm 2,72$; 21: $64,3 \pm 2,78$; 36: $59,2 \pm 2,66$; 54,2 $\pm 2,66$), ($P= 0,0008$), y disminuyó a lo largo de la etapas ($P<0,0001$) pero no existió interacción entre el grupo y la etapa. Los tratamientos no afectaron el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva varió a lo largo de los días de colección para el GCon (6: $39,6 \pm 2,94$; 21: $49,9 \pm 2,89$; 36: $55,8 \pm 2,89$; 49,7 $\pm 2,89$) y para el GeCG (6: $46,8 \pm 2,89$; 21: $58,7 \pm$

2,95; 36: $53,6 \pm 2,84$; $49,1 \pm 2,84$), ($P=0,0004$), y ambos grupos fueron disminuyendo a lo largo de las etapas ($P<0,0001$). Sin embargo, no hubo interacción del tratamiento con los días de colección ni con las etapas. El porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra no difirió entre los grupos. Se observó una interacción entre el tratamiento y los días de colección ($P=0,009$), siendo mayor el GeCG en el día 6. El porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra para el GCon aumento a lo largo de los días de colección y el GeCG disminuyó a lo largo de los días de colección, disminuyendo también a lo largo de las etapas ($P<0,0001$), pero no existió interacción entre el grupo y la etapa. No se observaron diferencias entre GeCG y el GCon en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro ni en el porcentaje de espermatozoides anormales. El porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro aumento para el GCon y varió para el GeCG a lo largo de los distintos días de colección (6: $71,8 \pm 1,58$; 21: $70,6 \pm 1,58$; 79,4 $\pm 1,61$; 51: $73,3 \pm 1,55$), ($P=0,0005$), y disminuyó a lo largo de las etapas ($P<0,0001$), mientras que el porcentaje de espermatozoides anormales no presentó diferencias. No hubo interacción de los grupos con la etapa ni con los distintos días de colección en ninguno de los dos parámetros evaluados. En conclusión, la administración de eCG en la estación no reproductiva mejoró la calidad de la motilidad espermática, el porcentaje de espermatozoides móviles y la integridad de membrana de los espermatozoides en chivos de Gabón.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Regulación neuroendocrina de la espermatogénesis

El eje hipotálamo-hipófiso-gonadal conecta el sistema nervioso y el endócrino (Somoza, 2002) y es el responsable de regular la reproducción. La GnRH es un decapeptido que se secreta en forma pulsátil a través del sistema porta hipotálamo-hipofisiario y de esta forma llega a la adenohipófisis produciendo la liberación pulsátil de la hormona leutinizante (LH), mientras que la hormona folículo estimulante (FSH) es secretada continuamente (Tilbrook y Clarke, 2001; Somoza 2002). La LH y la FSH son responsables de estimular las gónadas, los ovarios en la hembra y los testículos en el macho (Somoza, 2002). La LH actúa sobre las células de Leydig, ubicadas en el testículo, estimulando la producción de andrógenos, específicamente testosterona. La testosterona llega mediante difusión a los túbulos seminíferos donde estimula la espermatogénesis (Evans y Maxwell, 1990; Bielli, 2002). Por otra parte, el blanco de acción de la FSH es la célula de Sertoli, también ubicada en el testículo. La FSH es la encargada de estimular la secreción de estrógenos por parte de la célula de Sertoli. Los andrógenos se metabolizan a estrógenos, mediante un proceso denominado aromatización (Bielli, 2002). Por lo tanto, la FSH va a ser necesaria para estimular el inicio de la espermatogénesis mientras que la LH es necesaria para que la actividad espermatogénica sea normal.

1.2. Organización testicular y espermatogénesis

El testículo es la gónada masculina y se encuentra alojado en el interior de la bolsa escrotal, también llamada escroto. Allí se encuentra cubierto por la túnica albugínea, que es una capsula fibrosa de tejido conjuntivo grueso. El mediastino testicular está conformado por la continuación de la túnica albugínea, y allí se encuentran la rete testis, los vasos sanguíneos y los conductos eferentes. El epidídimo es un tubo alargado que conecta a los conductos deferentes, donde se almacenan los espermatozoides hasta que adquieren movilidad (Bielli, 2002).

En el resto del parénquima testicular se encuentran los túbulos seminíferos, que presentan una estructura tubular contorneada, lugar donde se producen los espermatozoides. Las espermatogonias (células que van a producir los espermatozoides) se localizan en la membrana basal de los túbulos seminíferos y una de sus caras (cara convexa) está en contacto con las células de Sertoli (Hafez, 1989).

Después de la maduración sexual del macho, se produce la primera liberación de espermatozoides móviles y fértiles, pero el proceso de espermatogénesis comienza durante la vida fetal. La espermatogénesis ocurre en tres etapas: proliferación, meiosis y espermiogénesis. En la primera etapa, proliferan las espermatogonias, pasando por una serie de divisiones mitóticas hasta transformarse en espermatogonias en diferenciación. A estas espermatogonias se las denominan A_1 , A_2 , A_3 y A_4 , espermatogonias intermedias y

espermatogonias B. Al final de esta fase ocurre la meiosis, proceso por el que se reduce a la mitad el material genético luego de dos divisiones celulares sucesivas. Las espermatogonias B más diferenciadas son las que van a dar lugar a los espermatoцитos primarios preleptoténicos. En la meiosis I la cromatina pasa por varios estados que son: leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. Al culminar la meiosis II se obtienen espermátidas redondas (haploides). La última etapa es la espermiogénesis, en la que las espermátidas se convierten en espermatozoides. Una vez que el espermatozoide está completo se produce la espermiación (liberación del espermatozoide a la luz del túbulo seminífero por parte de la célula de Sertoli) (Bielli, 2002).

1.3. Estacionalidad reproductiva

La reproducción no es sólo consecuencia de mecanismos neuroendocrinos (internos) sino que también influyen mecanismos externos (Ungerfeld, 2007). Los efectos del medio ambiente junto con el potencial genético de los individuos van a determinar el período reproductivo y la intensidad del mismo (Chemineau, 1993). La selección natural es uno de los factores que se encarga de que la reproducción se sincronice de modo tal que los nacimientos se produzcan en un momento ventajoso del año, para que de esta forma haya disponibilidad de nutrientes no sólo para la madre sino también para la cría (Malpoux, 1996; Fosberg, 2002).

1.3.1. Estacionalidad en pequeños rumiantes

Los ovinos y los caprinos se caracterizan por ser especies con reproducción estacional. Se les suele llamar reproductores de días cortos debido a que su estación reproductiva comienza cuando las horas de luz disminuyen (Evans y Maxwell, 1990). La percepción de las horas de luz se da a través de la retina, y la información se transmite por vía nerviosa a la glándula pineal. Esta glándula es la responsable de sintetizar y secretar melatonina a la circulación durante las horas de oscuridad (Forsberg, 2002). La melatonina regula la liberación de la GnRH por parte del hipotálamo y estimula la liberación de FSH y LH de la adenohipófisis, la que a su vez estimula la liberación de testosterona testicular (Hafez, 1989). Tanto en ovinos como en caprinos, las hembras poseen un período de anestro en el que hay una disminución de la frecuencia de los pulsos de LH en comparación con la estación reproductiva. La baja pulsatilidad de la LH se debe a mecanismos inhibitorios; por un lado la retroalimentación negativa del estradiol al hipotálamo y por otro lado, el efecto directo del fotoperiodo (Chemineau y Delgadillo, 1993; Ungerfeld, 2007). Los machos disminuyen su actividad reproductiva cuando las hembras se encuentran en anestro estacional, pero esa disminución no implica que su actividad cese por completo (Menchaca, 2002). En los machos, durante la estación reproductiva se produce un aumento de la frecuencia de pulsos de LH y de las concentraciones de FSH y de testosterona (D'Occhio *et al.*, 1984). Además el porcentaje de espermatozoides anormales disminuye y la calidad del

eyaculado, la concentración espermática y la motilidad espermática aumentan (Cupps *et al.*, 1960; Brown *et al.*, 1991; Forsberg, 2002).

1.3.2. Estacionalidad en caprinos

Los caprinos son una especie con reproducción poliéstrica estacional (Menchaca, 2002) y su patrón reproductivo va a depender de la latitud en que se encuentre. En nuestra región, la estación reproductiva comprende parte del verano y todo el otoño-invierno. Las razas de origen alpino como Pardo Alpina, Saanen y Toggenburg tienen una estación reproductiva que va desde febrero-marzo a septiembre-octubre, mientras que la razas africanas y asiáticas como la Anglo Nubian tienen una estación reproductiva más extendida de diciembre-enero a septiembre (Menchaca, 2002). Otra raza de origen africano es la cabra del Gabón (Okere *et al.*, 1986); en su lugar de origen estas cabras son utilizadas para la producción tanto de carne como de leche (Dairy Goat Journal, 2015), pero en nuestro país no son utilizadas con fines productivos, pudiéndose encontrar ejemplares en los zoológicos. Si bien, el patrón reproductivo de estas cabras no es tan marcado como en otras razas, se observó un aumento de la actividad reproductiva (mayor concentración sérica de testosterona y mejor calidad seminal) desde finales de la primavera hasta mediados del otoño (Giriboni, 2014).

El chivo de Gabón (Figura 1), conocido como West African Dwarf Goat (WADG), es una raza enana, con una altura de tan solo 30 a 50 cm, y un peso de 25 a 35 kg. Su pelaje suele ser de color negro, chocolate y oro, aunque también es común que presenten manchas blancas y otras combinaciones de colores. El enanismo de esta raza es debido a una mutación genética que genera acondroplasia, enfermedad que se manifiesta fenotípicamente con piernas cortas y cuerpo robusto (Dairy Goat Journal, 2015; Farm Animal Biology, 2015). Esta raza es un buen modelo biológico de una especie estacional que puede ser utilizada en protocolos de investigación de nuevas metodologías reproductivas, y de esta forma ser extrapolados a otras especies.



Figura 1. Ejemplares de chivos de Gabón adulto.

1.4. Control de la estacionalidad

En las especies estacionales, como los chivos, el período del año limita fuertemente la utilización del semen de estos machos con fines reproductivos. Por ello se han desarrollado técnicas que permiten minimizar el efecto de la estacionalidad. Una de las técnicas utilizadas para promover la actividad reproductiva es la colocación de implantes de melatonina. Éstos liberan melatonina en forma constante simulando el efecto de los días cortos (O'Callaghan *et al.*, 1991). Si bien los días cortos estimulan la actividad sexual, la exposición prolongada de los animales a los días cortos, puede causar un período refractario, observándose una disminución de la actividad sexual. Sin embargo, si se intercala la exposición de los animales entre días cortos y largos, éstos mantienen una actividad reproductiva satisfactoria durante todo el año. (Chemineau *et al.*, 1992). En los chivos, la inducción de la actividad reproductiva puede realizarse mediante la alternancia de días cortos y días largos, lo que permite colectar y utilizar el semen de estos machos durante gran parte del año (Chemineau *et al.*, 1992). La desventaja de este método es que, si bien produce un aumento de los parámetros reproductivos, estos pueden visualizarse luego de dos meses de comenzado el tratamiento (Delgadillo *et al.*, 2001). En chivos Creole se indujo el comportamiento sexual durante la estación no reproductiva con tratamientos de días largos seguidos de la inserción de dos implantes de melatonina (Delgadillo *et al.*, 2001). Mediante estos tratamientos se observó un aumento del peso testicular y una mayor calidad espermática. Además se produjo un aumento en la frecuencia de los pulsos de LH y de la concentración sérica de testosterona (Chemineau *et al.*, 1992; Delgadillo *et al.*, 2001). Si bien los implantes de melatonina han tenido buenos resultados, en nuestro país hay limitaciones en cuanto a la disponibilidad ya que deben ser importados. Además los implantes no actúan en forma rápida, visualizando sus efectos recién entre los 30 y 70 días luego de su implantación (Buffoni, 2013).

1.5. Congelación espermática

Una forma para disponer de semen durante todo el año es mediante la criopreservación seminal. La congelación de semen es una técnica de criopreservación que permite la conservación tanto de gametos femeninos como masculinos (Isachenko *et al.*, 2004). A bajas temperaturas, el metabolismo de las células disminuye, lo que permite la conservación de las mismas a largo plazo (Gao y Critser, 2000), permitiendo su utilización en cualquier época del año. La congelación de semen como método de almacenamiento causa daños ultraestructurales, bioquímicos y funcionales a los espermatozoides, lo que puede resultar en una disminución tanto de la motilidad, como de la viabilidad y la capacidad de fecundar de esos espermatozoides (Leboeuf *et al.*, 2000). Además las características seminales varían a lo largo del año y esto ocasiona que la repercusión negativa de la congelación durante la estación no reproductiva sea mayor que en la estación reproductiva. Las variaciones estacionales también repercuten en la composición del plasma seminal,

medio en el que se encuentran los espermatozoides (La Falci *et al.*, 2002). A raíz de éstas dificultades es que se han buscado alternativas para preservar las características seminales del semen colectado durante la estación no reproductiva.

1.6. *Gonadotropina coriónica equina (eCG o PMSG)*

1.6.1. *Origen y modo de acción*

La eCG es secretada por las copas endometriales de las yeguas aproximadamente entre los 40 y 120 días de gestación (Allen y Moor, 1972). En pequeños rumiantes es la única hormona glucoproteica capaz de provocar la actividad tanto de la LH como de la FSH, ya que posee sitios de unión a los receptores de ambas hormonas (Christakos y Bahl, 1979).

1.6.2. *Estructura*

Está compuesta por dos subunidades, llamadas α y β . En la yegua la primera es igual a otras glucoproteínas como la FSH, LH y la TSH (hormona estimulante de la tiroides), mientras que la segunda es la que genera la actividad específica. Estas subunidades se mantienen unidas mediante enlaces no covalentes y pueden ser separadas con tratamientos con urea, guanidina o ácido mineral diluido (Hartree y Renwick, 1992). El contenido de carbohidratos de la hormona es de 41,7%, entre ellos, L-fucosa, D-manosa, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido siálico (Christakos y Bahl, 1979). En la subunidad β los contenidos de ácido siálico y de galactosa son mayores que en la α (Christakos y Bahl, 1979). La eCG posee una vida media de aproximadamente 5 días (Murphy y Martinuk, 1991). Los vínculos de ácido siálico son muy resistentes a las neuraminidasas lo que permite una mayor vida media (Kamerling *et al.*, 1990) en comparación con otras hormonas glucoproteicas.

1.6.3. *Antecedentes del uso de eCG*

La eCG ha sido utilizada para inducir la ovulación y aumentar las tasas de preñez en protocolos de inseminación artificial en ovejas (Luther *et al.*, 2007). Sin embargo en cabras se ha observado que el uso repetido de eCG para la inducción de la ovulación podría causar un descenso en la fertilidad debido a la generación de anticuerpos anti-eCG (Roy *et al.*, 1999).

La eCG es capaz de unirse a los receptores de LH y FSH, por lo que podría estimular indirectamente la espermatogénesis, y aumentar la concentración sérica de testosterona. Existen escasos trabajos en los que se ha utilizado la eCG para promover la actividad reproductiva de los machos. A un venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) azoospermico (ausencia de espermatozoides) se le administró 5000 UI de eCG para restaurar la producción seminal. La terapia logró restaurar la actividad testicular y reiniciar la espermatogénesis (Ungerfeld, 2013). En otro trabajo, se administró peptidina (una droga sintética similar a un

opioide que actúa suprimiendo la actividad gonadal) a ratas, para posteriormente evaluar los efectos de la administración de 5 UI de eCG. Dicha administración permitió mantener la espermatogénesis (Patil *et al.*, 1998). La administración de tres dosis de 250 UI de eCG con un intervalo de 2 semanas entre cada una en perros con astenozoospermia (disminución de la motilidad de los espermatozoides) produjo una mejoría transitoria en la espermatogénesis (Kawakami *et al.*, 1999). Además en carneros se ha demostrado que la administración de eCG en estación no reproductiva, aumenta los niveles de testosterona y la capacidad para estimular la actividad reproductiva en las hembras (Ungerfeld *et al.*, 2014).

2. HIPÓTESIS

La administración de eGC a chivos durante la estación no reproductiva mejora los parámetros seminales del semen fresco, luego de adicionar el diluyente y la resistencia de los espermatozoides a la congelación-descongelación.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo general*

Determinar si la administración de eCG a chivos de la raza Gabón durante la estación no reproductiva mejora la calidad de los parámetros seminales del semen fresco, del semen luego de la adición del diluyente y del semen posdescongelado.

3.2. *Objetivos específicos*

Determinar si la administración de 1 dosis de eCG administradas cada 5 días, durante 4 días mejora:

- la calidad de la motilidad (escala del 0-5)
- el porcentaje de espermatozoides móviles y con motilidad progresiva
- el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales
- la integridad de membrana y acrosómica de los espermatozoides

del semen fresco, y la resistencia de éstos frente a la adición de un diluyente (estrés osmótico) y luego de un proceso de congelación-descongelación (estrés térmico).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Animales y su manejo

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción, Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria. Se utilizaron 20 chivos adultos de la raza Gabón los que fueron adjudicados a 2 grupos: 1) los animales del grupo tratado recibieron 1 dosis de eCG (GeCG, n=10) cada 5 días, siendo la primer dosis de 800 UI (día 0) y las 4 restantes de 500 UI de eCG (Novormón, Syntex, Montevideo, Uruguay) (Figura 2) , y 2) un grupo control al que no se le administró la hormona (GCon, n=10).

4.2. Colección seminal

El semen fue colectado quincenalmente durante 2 meses (octubre-diciembre) en la estación no reproductiva (Figura 2). El semen se colectó mediante electroeyaculación utilizando una sonda rectal de 300 mm de largo x 9 mm de diámetro, con 3 electrodos longitudinales de cobre de 30 mm de longitud (modelo 303; P-T Electronics, Oregon, E.E.U.U) realizando series de 10 pulsos (4-5 s por pulso) de estímulo, con intervalos de descanso de 2-3 s por serie. La intensidad del voltaje fue en aumento desde 1-6 V hasta la eyaculación. Previo a realizar la electroeyaculación, se vació el recto de heces y se lavó el prepucio para evitar que se contaminara la muestra seminal.

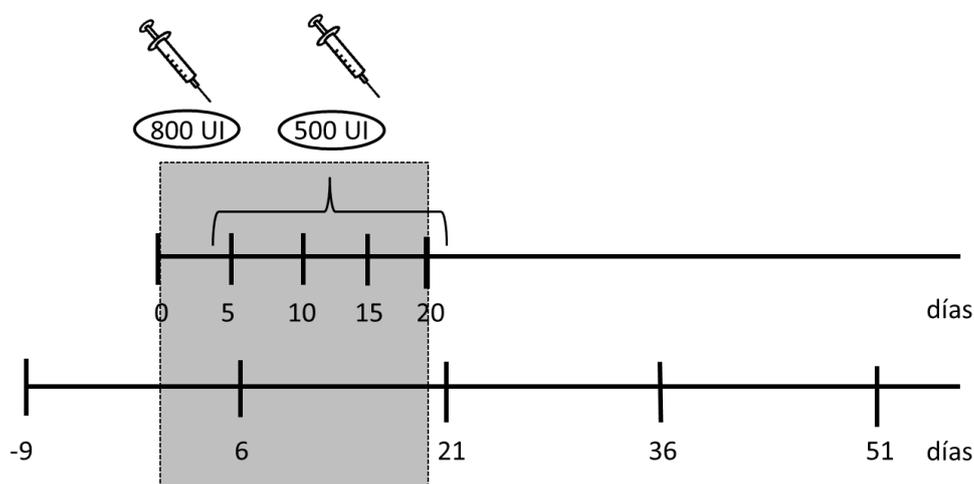


Figura 2. Representación esquemática de los días administración de las dosis de eCG (en la línea superior) y los días de colección seminal (en la línea inferior) de chivos de Gabón durante la estación no reproductiva. El cuadro gris representa el período de administración de la hormona y los valores inyectados en UI.

4.3. Evaluación de semen fresco

Una vez colectado el semen se procedió a la evaluación inmediata de cada muestra, manteniendo la misma en baño maría a 37°C. Primero, se midió el pH con tiras colorimétricas para controlar que no existiera contaminación con orina. Para evaluar el porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra se colocaron 10 µL de la muestra en una solución hipoosmótica (Jeyendran *et al.*, 1984), incubándose durante 15 min a 37°C y luego se fijó en formol-citrato. En una solución hipoosmótica el espermatozoide debe lograr un equilibrio entre el medio interno y el externo; para ello difunde agua hacia el interior y como consecuencia la cola se hincha y se pliega (Jeyendran *et al.*, 1984). Esta técnica permite determinar la integridad de membrana de los espermatozoides, considerándose como vivos aquellos que pliegan su cola a causa de la solución en la que se encuentran (positivos) y muertos aquellos que mantienen su cola recta (negativos).

La motilidad espermática se evaluó en un microscopio óptico con contraste de fase (Nikon, modelo Eclipse E200, Shanghai, China con un aumento de 40X) equipado con platina térmica a 37°C. Para ello se diluyó parte de la muestra en leche descremada UHT y se colocó un cubre objetos sobre la muestra. La calidad de la motilidad se determinó, asignando una escala que va del 0 al 5, siendo 0 cuando no hay movimiento de espermatozoides y 5 cuando el movimiento es muy rápido (Soler, 2003). También se evaluó el porcentaje de espermatozoides móviles y con motilidad progresiva. Luego se fijó una muestra en formol-citrato para posteriormente evaluar el porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales y el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro.

4.4. Adición del diluyente y congelación espermática

Para almacenar las muestras en pajuelas de 0,5 mL, se determinó la concentración de los espermatozoides en el eyaculado. Primero se extrajeron 10 µL de la muestra fijada en formol-citrato. Luego se determinó la concentración espermática con una cámara de Neubauer y el total de espermatozoides en el eyaculado. Esta información permitió el cálculo del volumen de diluyente a adicionar.

Las muestras fueron diluidas con un diluyente comercial (Andromed, Minitube, Tiefenbach, Alemania). Una vez agregado el diluyente se evaluaron las mismas variables que en el semen fresco, y el semen fue colocado en pajuelas a las que progresivamente se les disminuyó la temperatura para realizar la curva de enfriamiento. Para ello, las pajuelas fueron colocadas en un recipiente con agua a temperatura ambiente. Luego, se las colocó en un freezer donde se controló su temperatura hasta llegar a los 5°C. Una vez alcanzados los 5°C las pajuelas fueron extraídas del recipiente, se las secó y se las colocó en vapores de nitrógeno líquido durante 10 min (aproximadamente -80 °C). Posteriormente se colocaron las pajuelas directamente en nitrógeno líquido (-196°C) y se las conservó en un tanque de nitrógeno líquido durante 2 meses para su posterior descongelación y evaluación.

4.5. Descongelación espermática

El semen se descongeló retirando las pajuelas del nitrógeno líquido, manteniéndolas durante 10 s a temperatura ambiente y colocándolas a 37°C durante 30 s. Luego se secaron las pajuelas y se cortó uno de los extremos, colocándola en un tubo eppendorf, para posteriormente cortar el otro extremo para liberar el semen.

Al momento de la descongelación se evaluó la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides mótils y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. Inmediatamente luego de la descongelación se realizaron fijaciones para evaluar el porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales, así como la integridad de membrana y acrosómica de los espermatozoides.

4.6. Análisis estadístico

Los datos fueron comparados mediante ANOVA para mediciones repetidas, tomando como efectos principales el tratamiento (administración o no de eCG), el momento de colección de las muestras (días), las etapas de evaluación (semen fresco, luego de agregado el diluyente, y luego de descongelado), así como sus respectivas interacciones. La media de los datos del semen fresco de cada animal colectadas previo a la administración de eCG fue incluida en el modelo de cada variable como covariable. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados \pm EE.

5. RESULTADOS

La calidad de la motilidad fue mayor en el GeCG que en el GCon ($2,52 \pm 0,08$ vs $2,13 \pm 0,08$; respectivamente; $P=0,004$). La calidad de la motilidad varió de acuerdo a los días de colección para el GCon (6: $1,84 \pm 0,15$; 21: $2,03 \pm 0,15$; 36: $2,50 \pm 0,15$; 51: $2,14 \pm 0,15$) y para el GeCG (6: $2,26 \pm 0,15$; 21: $2,80 \pm 0,16$; 36: $2,62 \pm 0,15$; 51: $2,37 \pm 0,15$), ($P=0,01$; Figura 3A) y disminuyó a lo largo de las etapas ($P=0,003$; Figura 3B). Sin embargo, no hubo interacción del grupo con los días de colección ni con la etapa.

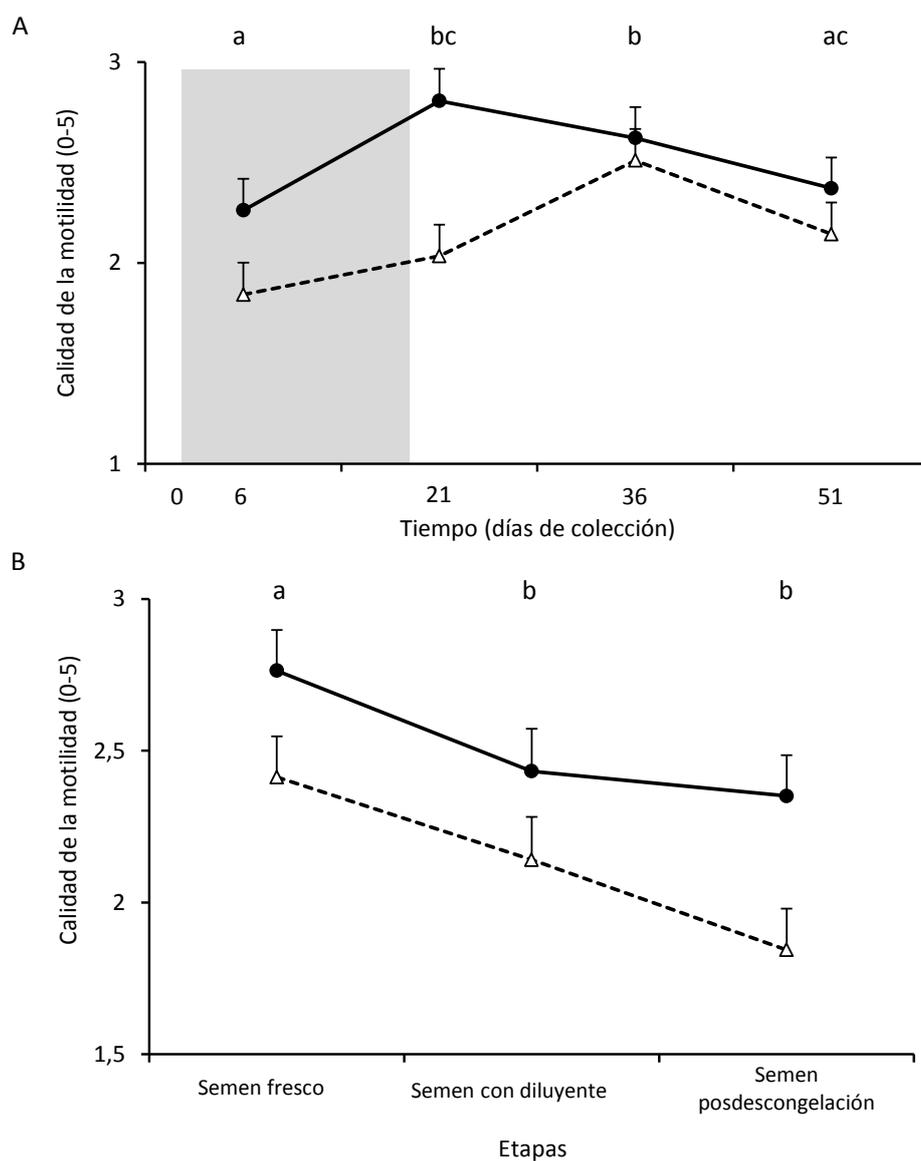


Figura 3. Calidad de la motilidad de semen de chivos de Gabón tratados con eCG (●) y no tratados (-Δ-) en función de los días de colección (para cada día de colección se promediaron todas las etapas) (A) y en función de las etapas de evaluación (para cada etapa se promediaron todos los días de colección) (B) (semen fresco, semen luego de la adición del diluyente, semen posdescongelación). La barra gris en A indica el período de administración de la eCG. Las muestras fueron colectadas durante la estación no reproductiva. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados \pm EE de la muestra de semen fresco, luego de agregado el diluyente y posdescongelación. La primera dosis de eCG se administró el día 0. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de los días de colección y de las etapas: $P < 0,05$.

El porcentaje de espermatozoides m3viles tendi3 a ser mayor en el GeCG que en el GCon ($58,3 \pm 1,50$ vs $54,6 \pm 1,51$; respectivamente; $P=0,10$). Se observ3 una interacci3n entre el tratamiento y los d3as de colecci3n ($P=0,03$), siendo mayor el GeCG en los d3as 6 y 21 (Figura 4A). El porcentaje de espermatozoides m3viles vari3 a lo largo de los d3as de colecci3n para el GCon (6: $44,9 \pm 2,77$; 21: $56,1 \pm 2,72$; 36: $61,7 \pm 2,72$; 51: $55,8 \pm 2,72$) y para el GeCG (6: $55,6 \pm 2,72$; 21: $64,3 \pm 2,78$; 36: $59,2 \pm 2,66$; 51: $54,2 \pm 2,66$), ($P=0,0008$) y disminuy3 a lo largo de la etapas ($P<0,0001$) (Figura 4B) pero no existi3 interacci3n entre el grupo y la etapa.

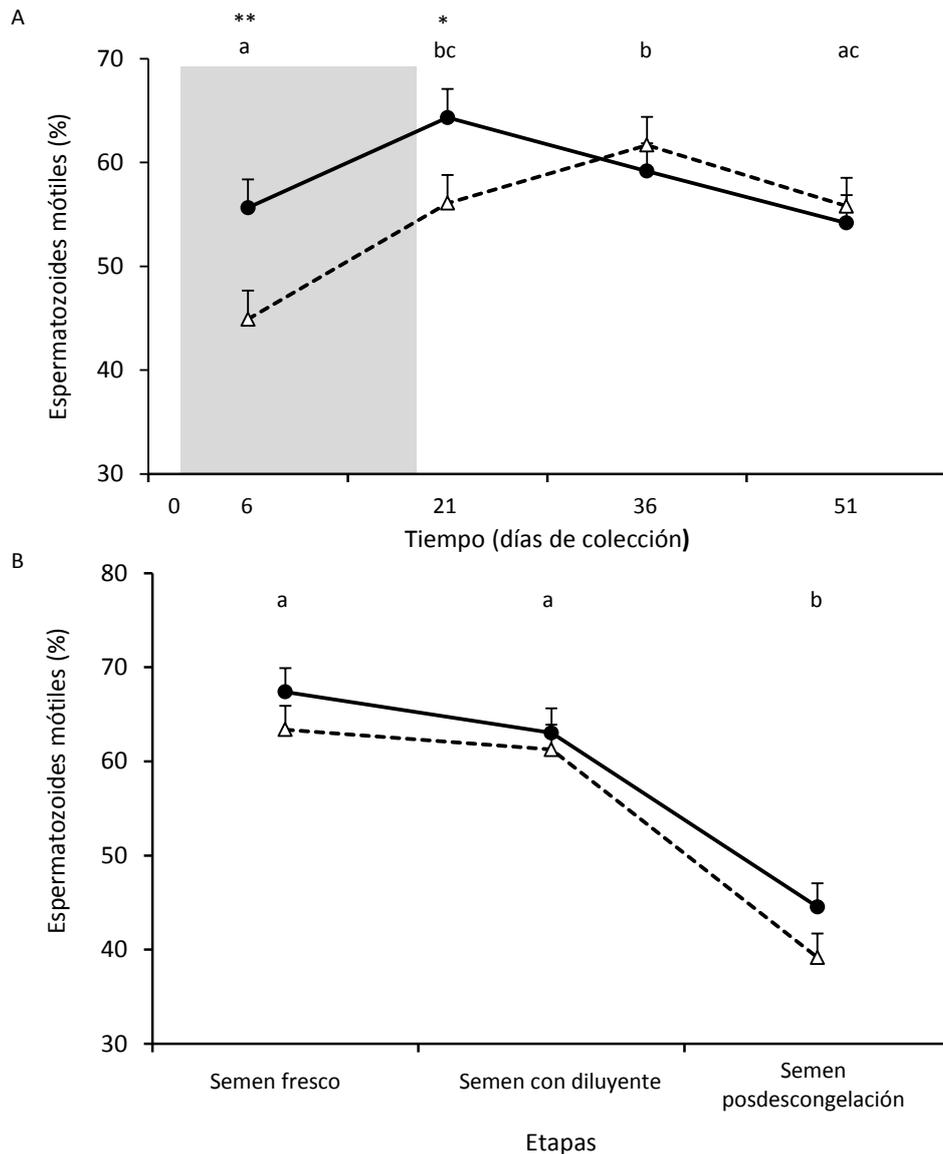


Figura 4. Porcentaje de espermatozoides m3viles de semen de chivos de Gab3n tratados con eCG (-●-) y no tratados (-Δ-) a lo largo de los d3as de colecci3n (para cada d3a de colecci3n se promediaron todas las etapas) (A) y en funci3n de las etapas de evaluaci3n (para cada etapa se promediaron todos los d3as de colecci3n) (B) semen fresco, semen luego de la adici3n del diluyente, semen posdescongelaci3n). La barra gris en A indica el per3odo de administraci3n de la eCG. Las muestras fueron colectadas durante la estaci3n no reproductiva. Los datos se presentan como media de los m3nimos cuadrados \pm EE de la muestra de semen fresco, luego de agregado el diluyente y posdescongelaci3n. La primera dosis de eCG se administr3 el d3a 0. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de los d3as de colecci3n y de las etapas: $P<0,05$. Diferencias significativas en la interacci3n del grupo y los d3as de colecci3n se indican como: * ($P<0,05$) y ** ($P<0,01$).

No existieron diferencias entre el GeCG y GCon en el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva varió a lo largo de los días de colección para el GCon (6: $39,6 \pm 2,94$; 21: $49,9 \pm 2,89$; 36: $55,8 \pm 2,89$; 49,7 $\pm 2,89$) y para el GeCG (6: $46,8 \pm 2,89$; 21: $58,7 \pm 2,95$; 36: $53,6 \pm 2,84$; 49,1 $\pm 2,84$), ($P=0,0004$; Figura 5A) y ambos grupos fueron disminuyendo a lo largo de las etapas ($P<0,0001$; Figura 5B). Sin embargo, no hubo interacción del tratamiento con los días de colección ni con las etapas.

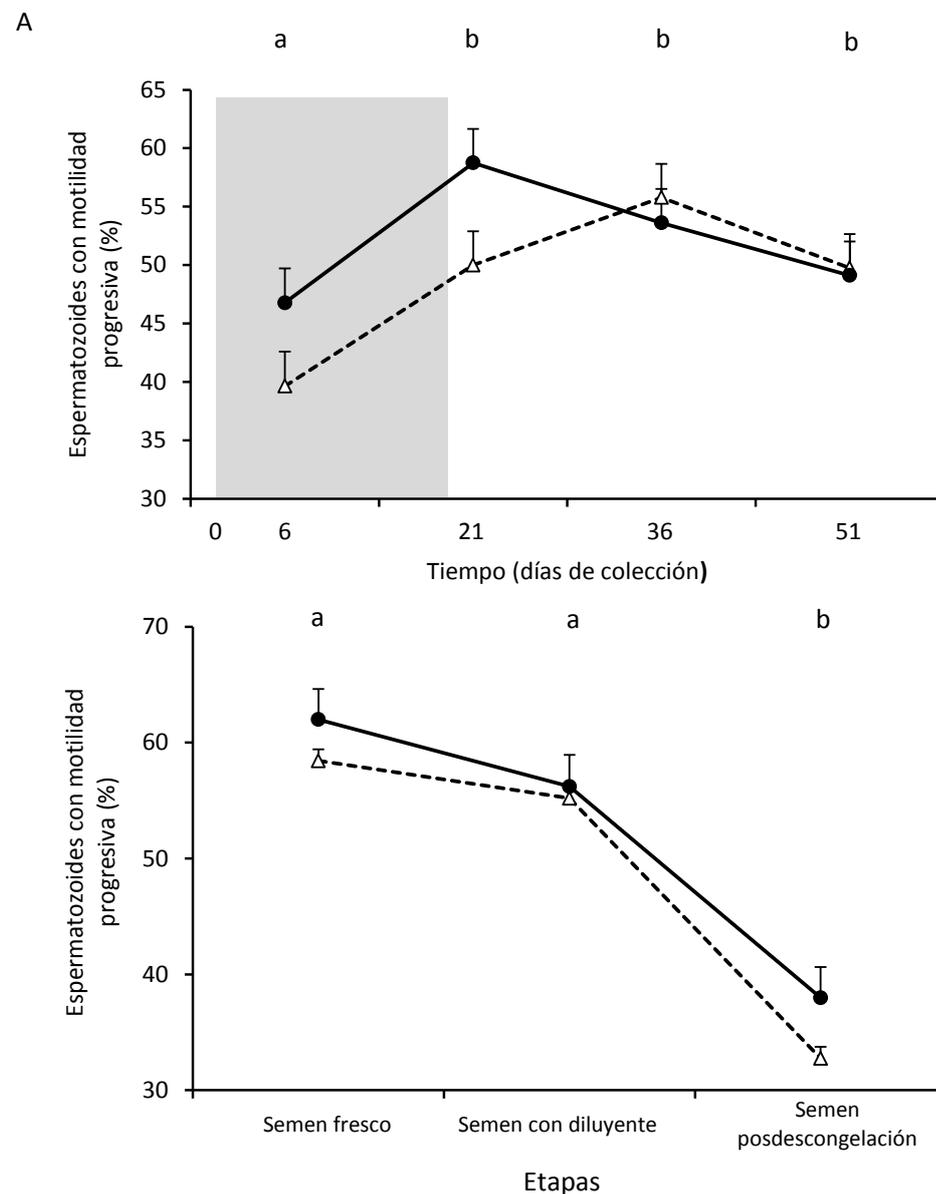


Figura 5. Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva de semen de chivos de Gabón tratados con eCG (-●-) y no tratados (-Δ-) a lo largo de los días de colección (para cada día de colección se promediaron todas las etapas) (A) y en función de las etapas de evaluación (para cada etapa de colección se promediaron todos los días de colección) (B) (semen fresco, semen luego de la adición del diluyente, semen posdescongelación). La barra gris en A indica el período de administración de la eCG. Las muestras fueron colectadas durante la estación no reproductiva. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados \pm EE de la muestra de semen fresco, luego de agregado el diluyente y posdescongelación. La primera dosis de eCG se administró el día 0. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de los días de colección y de las etapas: $P<0,05$.

El porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra no difirió entre los grupos. Se observó una interacción entre el tratamiento y los días de colección ($P=0,009$), siendo mayor el GeCG en el día 6 (Figura 6). El porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra para el GCon aumento a lo largo de los días de colección y el GeCG disminuyó a lo largo de los días de colección, disminuyendo también a lo largo de las etapas ($P<0,0001$), pero no existió interacción entre el grupo y la etapa., y disminuyó a lo largo de las etapas (semén fresco: $75,86 \pm 2,54$; semén posdescongelación: $33,8 \pm 2,53$; $P<0,0001$) pero no existió interacción entre el grupo y la etapa.

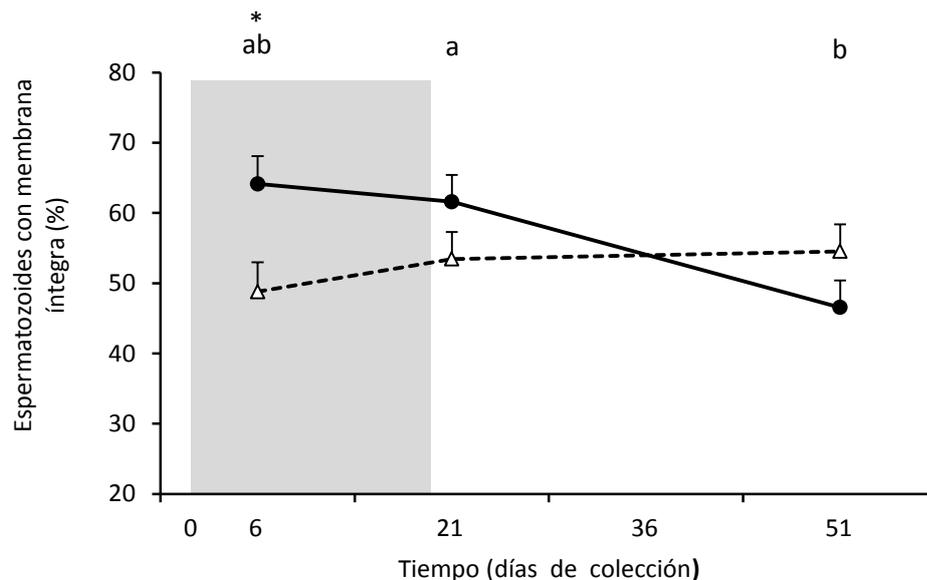


Figura 6. Porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra de semen de chivos de Gabón tratados con eCG (-●-) y no tratados (-Δ-) a lo largo de los días de colección. La barra gris indica el período de administración de la eCG. Las muestras fueron colectadas durante la estación no reproductiva. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados \pm EE de la muestra de semen fresco, luego de agregado el diluyente y posdescongelación. La primera dosis de eCG se administró el día 0. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de los días de colección: $P<0,05$. Diferencias significativas en la interacción del grupo y los días de colección se indican como: * ($P<0,05$).

No se observaron diferencias entre GeCG y el GCon en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro ni en el porcentaje de espermatozoides anormales. El porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro aumentó para el GCon y varió a lo largo de los distintos días de colección para el GeCG (6: $71,8 \pm 1,58$; 21: $70,6 \pm 1,58$; 36: $79,4 \pm 1,61$; 51: $73,3 \pm 1,55$), ($P=0,0005$; Figura 7A) y disminuyó a lo largo de las etapas ($P<0,0001$; Figura 7B), mientras que el porcentaje de espermatozoides anormales no presentó diferencias. No hubo interacción de los grupos con la etapa ni con los distintos días de colección en ninguno de los dos parámetros evaluados.

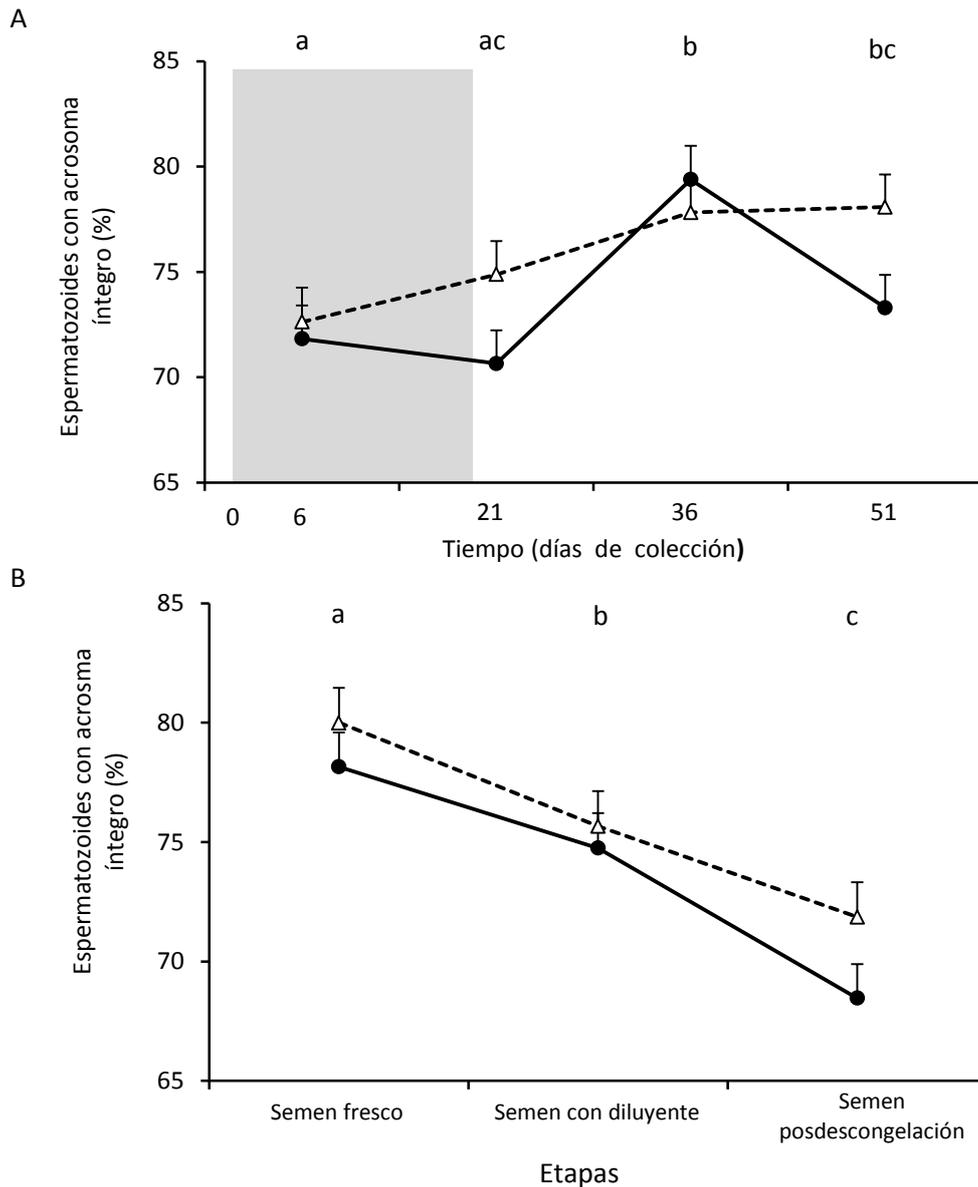


Figura 7. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro de semen de chivos de Gabón tratados con eCG (-●-) y no tratados (-Δ-) a lo largo de los días de colección (para cada día de colección se promediaron todas las etapas) (A) y en función de las etapas de evaluación (para cada etapa de colección se promediaron todos los días de colección) (B) (semen fresco, semen luego de la adición del diluyente, semen posdescongelación). La barra gris en A indica el período de administración de la eCG. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados \pm EE de la muestra de semen fresco, luego de agregado el diluyente y posdescongelación. La primera dosis de eCG se administró el día 0. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de los días de colección y de las etapas: $P < 0,05$.

6. DISCUSIÓN

La administración de eCG a chivos de Gabón durante la estación no reproductiva (octubre-diciembre) mejoró la calidad seminal, aumentando la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides móviles y la integridad de membrana de los espermatozoides. Este efecto se produjo inmediatamente de comenzada la administración de la hormona, pero luego de cesado el tratamiento no se observaron diferencias significativas entre los grupos. La melatonina puede aumentar el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva recién a los 45 - 90 días luego de su implantación en carneros (Casao *et al.*, 2010a), mientras que en esta tesis se observó un aumento de la calidad seminal ya a los 6 días de la primera administración de eCG. Éstos resultados son realmente alentadores, siendo una alternativa rápida, eficaz y de bajo costo para mejorar el desempeño reproductivo de los machos durante la estación no reproductiva.

Dada la inmediatez del efecto y, que la espermatogénesis dura aproximadamente 48 días en los chivos (França, *et al.*, 1999), se podría descartar que el efecto positivo sea sobre la misma. Además, si fuera sobre las células en sus últimas etapas espermatogénicas, el efecto positivo debería haberse mantenido por más tiempo luego de cesar la administración de la hormona. Por tanto, parece razonable especular que los efectos positivos de la eCG se produzcan en el epidídimo, afectando a los espermatozoides ya formados y el medio en el que están inmersos, y/o en las glándulas anexas, modificando indirectamente la composición del plasma seminal. El epidídimo, es el órgano encargado del transporte, la maduración y almacenamiento de los espermatozoides (Zhang *et al.*, 1997; Świder-Al-Amawi *et al.*, 2010). El epidídimo posee receptores de FSH (FSH-R) (Dahia y Rao, 2006; Dahia *et al.*, 2008) y de LH (LH-R) (Lie *et al.*, 2003; Shayu y Rao, 2006), principalmente en la zona de la cola.

Świder-Al-Amawi *et al.* (2010) no sólo observaron la presencia de FSH-R en las células epiteliales del epidídimo de la rata y del humano, sino que también demostraron que la FSH es capaz de modificar la morfología de las células epiteliales y de participar en la esteroidogénesis. Este grupo de trabajo también realizó pruebas con ratones *knockout* para FSH-R en el epidídimo, constatando que dichos animales presentaban defectos en el desarrollo de los espermatozoides, lo que demuestra que la presencia de FSH y de FSH-R en el epidídimo son importantes para que el proceso de maduración de los espermatozoides ocurra correctamente. Zhang *et al.* (1997) y Lie *et al.* (2003) reportaron la presencia de receptores de LH-R en el epidídimo de mono y de ratón, y su importancia en la morfología y en la función de dicho órgano. La falta de LH-R en ratones *knockout* resulta en cambios en la morfología de las células epiteliales (Lie *et al.*, 2003). Los LH-R son capaces de reconocer gonadotrofinas coriónicas debido a la similitud de sus cadenas aminoácidas (Dufau, 1998) y estas hormonas van a ser capaces de generar cambios morfológicos en las células del epidídimo como ocurre con las células de Leydig (Swider *et al.* 2003). Por tanto, la eCG podría haberse unido a los FSH-R y LH-R participando de esta forma en los cambios morfológicos de las células del epidídimo y en la correcta maduración espermática.

Cómo se mencionó anteriormente, la eCG también podría estar actuando a nivel de las glándulas anexas (próstata y vesícula seminal) ya que se ha demostrado que las mismas poseen LH-R (Reiter *et al.*, 1995; Tao *et al.*, 1995; Tao *et al.*, 1998). Cabe destacar, que las glándulas anexas están implicadas en la producción del plasma seminal, por lo que la administración de la eCG podría estar repercutiendo indirectamente en la composición del mismo. Si bien hay escasa información acerca de la composición del plasma seminal, Cardozo *et al.* (2006) observaron que las variaciones en el perfil proteico del plasma seminal a lo largo del año se relacionan con variaciones en el porcentaje de espermatozoides móviles, con la viabilidad espermática y con la concentración del eyaculado, siendo éstos mejores durante la estación reproductiva. A su vez, La Falci *et al.* (2002) identificaron y caracterizaron proteínas con afinidad a la heparina (HAP) en chivos Saneen, observando que su concentración en el plasma seminal varía a lo largo del año. Según estos investigadores, las HAP se encuentran en mayor proporción en estación no reproductiva, produciendo un deterioro en el acrosoma y en la motilidad espermática, por lo que la calidad seminal disminuye. Por estas razones es que la administración de eCG podría influir indirectamente de forma positiva en el plasma seminal, generando un mejor medio para los espermatozoides, similar a lo que ocurre durante la estación reproductiva.

Por otro lado, en varios estudios se ha demostrado que la administración de eCG es capaz de estimular la secreción de testosterona (Hochereau- De Rivers *et al.*, 1990; Price *et al.*, 1991; Ungerfeld *et al.*, 2014). Si bien en este trabajo no se realizaron las mediciones de esta hormona, hay que tener en cuenta que no sólo existen variaciones estacionales en la concentración sérica de testosterona, sino que la concentración de dicha hormona en el plasma seminal también varía a lo largo del año (Casao *et al.*, 2010b). Cabe destacar, que la aromatasa metaboliza la testosterona en estrógenos (Simpson *et al.*, 1994) y que éstos últimos podrían regular la motilidad espermática, mediante su aromatización en el plasma seminal. Esto sugiere que la eCG podría haber estimulado la producción de testosterona durante el período en que se administró la misma, repercutiendo en la concentración de estrógenos del plasma seminal y por ende mejorando la motilidad espermática. Si bien en el presente trabajo no se evaluó la composición del plasma seminal, ni la concentración de testosterona, sería interesante evaluarlas para determinar en qué medida pueden ser modificadas durante el período de administración de la eCG.

Al finalizar la administración de la eCG se observó una disminución inmediata en los parámetros seminales, que luego se estabilizaron rápidamente a valores similares al GCon. Es probable que al cesar la administración hormonal se genere un cambio brusco en la composición del medio en el que se encuentran los espermatozoides, y que por ello, los parámetros seminales disminuyen a valores próximos al GCon.

En síntesis, la administración de eCG en chivos de Gabón durante la estación no reproductiva tuvo un efecto positivo sobre la calidad seminal. Este efecto comenzó

inmediatamente de iniciado el tratamiento hormonal, y finalizó apenas se dejó de administrar la hormona.

7. CONCLUSIONES

La administración de eCG a chivos durante la estación no reproductiva aumentó la calidad del semen fresco, con diluyente y posdescongelación.

8. BIBLIOGRAFÍA

Allen, R.W., Moor, R.M., 1972. The origin of the equine endometrial cups. *Journal of Reproduction and Fertility*, 29: 313-316.

Bielli, A., 2002. Regulación hormonal de la función reproductiva en el macho. En: Ungerfeld, R., (Ed.) *Reproducción en los animales domésticos*. Tomo I. Montevideo. Melibea, 81-94p.

Brown, J.L., Wildt, D.E., Raath, J.R., de Vos, V., Janssen, D.L., Citino, S.B., Howard, J.G., Bush, M., 1991. Seasonal variation in pituitary-gonadal function in free-ranging impala (*Aepyceros melampus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 93: 497-505.

Buffoni, A., 2013. Efecto de los implantes de melatonina sobre los rendimientos en la obtención de embriones in vivo, la calidad seminal y la actividad reproductiva de ovinos en la región patagónica argentina. Tesis de Doctorado. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Zaragoza, España.

Cardozo, J.A., Fernández-Juan, M., Forcada, F., Abecia, A., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., 2006. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, 66: 841-850.

Casao, A., Vega, S., Palacin, I., Pérez-PE, R., Laviña, A., Quintin, F.J., Sevilla, E., Abecia, J.A., Cebrian-Pérez, J.A., Forcada, F., Muiño-Blanco, T., 2010a. Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproduction parameters in Rasa Aragonesa rams. *Reproduction in Domestic Animals*, 45: 425-432.

Casao, A., Cebrián, I., Asumpção, M.E., Pérez-Pé, R., Abecia, J.A., Forcada, F., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T., 2010b. Research Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8: 59.

Chemineau, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., Guerin, Y., Ravault, J.P., Thimonier, J., Pelletier, J., 1992. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Animal Reproduction Science*, 30: 157-184.

Chemineau, P., 1993. Medio ambiente y reproducción animal. *World Animal Review*, 77: 2-14.

Chemineau, P., Delgadillo, J.A., 1993. Neuroendocrinología de la reproducción en el caprino. *Revista Científica*, 3: 113-121.

Christakos, S., Bahl, O.P., 1979. Pregnant mare serum gonadotrophin. Purification and physicochemical, biological, and immunological characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 254: 4253-4261.

Cupps, P.T., McGowan, B., Rahlam, D.F., Reddon, A.R., Weir, W.C., 1960. Seasonal changes in the semen of rams. *Journal of Animal Science*, 19: 208-213.

Dahia, C.L., Rao, A.J., 2006. Demonstration of follicle-stimulating hormone receptor in cauda epididymis of rat. *Biology of Reproduction*, 75: 98-106.

Dahia, C.L., Petrusz, P., Hall, S.H., Rao, A.J., 2008. Effect of deprivation of endogenous follicle stimulating hormone on rat epididymis: a histological evaluation. *Reproductive Biomedicine Online*, 17: 331-337.

Dairy Goat Journal, 2015. Disponible en: http://www.dairygoatjournal.com/86-4/nigerian_dwarf_dairy_goats/. Fecha de consulta: 18/6/15.

Delgadillo, J.A., Carrillo, E., Moran, J., Duarte, G., Chemineau, P., Malpoux, B., 2001. Induction of sexual activity of male creole goats in subtropical northern Mexico using long days and melatonin. *Journal of Animal Science*, 79: 2245-2252.

D'Occhio, M.J., Schanbacher, B.D., Kinder, J.E., 1984. Profiles of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, testosterone and prolactin in rams of diverse breeds: effects of contrasting short (8L:16D) and long (16L:8D) photoperiods. *Biology of Reproduction*, 30: 1039-1054.

Dufau, M.L., 1998. The luteinizing hormone receptor 1. *Annual Review of Physiology*, 60: 461-496.

Evans, G., Maxwell, W.M.C., 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza. Acriba, 192p.

Farm Animal Biology (FBN), 2015. Disponible en: <http://www1.fbn-dummerstorf.de/en/forschung/fbs/fb5/langbein/Research%20Animals.htm>. Fecha de consulta: 18/6/15.

Forsberg, M., 2002. Estacionalidad reproductiva: el significado de la luz. En: Ungerfeld, R., (Ed.) *Reproducción en los animales domésticos*. Tomo I. Montevideo. Melibea, 123-140p.

França, L.R., Becker-Silva, S.C., Chiarini-Garcia, H., 1999. The length of the cycle of seminiferous epithelium in goats (*Capra hircus*). *Tissue and Cell*, 31: 274-280.

Gao, D., Critser, J.K., 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Institute for Animal Research Journal*, 41: 187-196.

Giriboni, J., 2014. Estímulo con hembras en celo y estacionalidad reproductiva de chivos adultos de Gabón. Tesis de Maestría. PEDECIBA, Biología. Montevideo, Uruguay.

Hafez, E.S.E., 1989. Reproducción e inseminación artificial en animales. 5ª Edición. México. Interamericana McGraw-Hill, 694 p.

Hartree, A.S., Renwick, A.G., 1992. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochemical Journal*, 287: 665.

Hochereau-De Reviers, M.T., Copin, M., Seck, M., Monet-Kuntz, C., Cornu, C., Fontaine, I., Perreau, C., Elsen, J.M., 1990. Stimulation of testosterone production by PMSG injection in the ovine male: effect of breed and age and application to males carrying or not carrying the "F" Booroola gene. *Animal Reproduction Science*, 23: 21-32.

Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I.I., Rahimi, G., Schöndorf, T., Mallmann, P., Dessole, S., Nawrath, F., 2004. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant- free vitrification. *Human Reproduction*, 19: 932-939.

Jeyendran, R., Van der Ven, H., Pérez-Peláez, M., Grabo, B., and Zaneveld, L., 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70: 219-228.

Kamerling, J.P., Daram, J.B.L., Hard, K, Van Dedem, G.W.K., de Boer, W., Vliegthart, J.F.G., 1990. Differences in structure of carbohydrate chains of human and equine chorionic gonadotropins. En: Chin, W.W., Boime, I. (Eds) *Glycoprotein Hormones*. Serono, Norwell, MA, 123p.

Kawakami, E., Hori, T., Tsutsui T., 1999. Changes in plasma testosterone and testicular transferrin concentration, testicular histology and semen quality after treatment of testosterone-depot plus PMSG to 3 dogs with asthenozoospermia. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62: 203-206.

La Falci, V.S.N., Tortorella, H., Rodrigues, J. L., Brandelli, A., 2002. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology*, 57: 1035-1048.

Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62: 113-141.

Lei, Z.M., Zou, W., Mishra, S., Li, X., Rao, C.V., 2003. Epididymal phenotype in luteinizing hormone receptor knockout animals and its response to testosterone replacement therapy. *Biology of Reproduction*, 68: 888-895.

Luther, J.S., Grazul-Bilska, A.T., Kirsch, J.D., Weigl, R.M., Kraft, K.C., Navanukraw, C., Pant D., Reynolds, L.P., Redmer, D.A., 2007. The effect of GnRH, eCG and progestin type on estrous synchronization following laparoscopic AI in ewes. *Small Ruminant Research*, 72: 227-231.

Malpaux, B., Vigui, C., Skinner, D.C., Thiéry, J.C., Pelletier, J., Chemineau, J., 1996. Seasonal breeding in sheep: mechanism of action of melatonin. *Animal Reproduction Science*, 42: 109-117.

Menchaca, A., 2002. Principales aspectos de la fisiología reproductiva en la especie caprina. En: Ungerfeld, R., (Ed.) *Reproducción en los animales domésticos*. Tomo I. Montevideo. Melibea, 261-271p.

Murphy, B.D., Martinuk, S.D., 1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews*, 12: 27-44.

O'Callaghan, D., Karsch, F.J., Boland, M.P., Roche, J.F., 1991. What photoperiodic signal is provided by a continuous-release melatonin implant?. *Biology of Reproduction*, 45: 927-933.

Okere, C., Chiboka, O., Montsma, G., 1986. Effect of frequent ejaculation of West African Dwarf Goat on semen characteristics. *Animal Reproduction Science*, 11: 249-258.

Patil, S.R., Sonar, A., Londonkar, R., Patil, S.R., Patil, S.B., 1998. Efficacy of exogenous gonadotropins on the maintenance of spermatogenesis in pethidine treated albino rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 42: 509-514.

Price, C.A., Hudson, N.L., McNatty, K.P., 1991. Plasma LH, FSH and testosterone concentrations in adult rams which were homozygous carriers or non-carriers of the Booroola fecundity gene. *Journal of reproduction and fertility*, 91: 267-275.

Reiter, E., McNamara, M., Closset, J., Hennen, G., 1995. Expression and functionality of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor in the rat prostate. *Endocrinology*, 136: 917-923.

Roy, F., Maurel, M.C., Combes, B., Vaiman, D., Crihiu, E.P., Lantier, I., Pobel, T., Delétang, F., Combarnous, Y., Guillou, F., 1999. The negative effect of repeated equine chorionic gonadotropin treatment on subsequent fertility in Alpine goats is due to a humoral immune

response involving the major histocompatibility complex. *Biology of Reproduction*, 60: 805-813.

Shayu, D., Rao, A.J., 2006. Expression of functional aromatase in the epididymis: role of androgens and LH in modulation of expression and activity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 249: 40-50.

Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C.R., Michael, M.D., Mendelson, C.R., 1994. Aromatase Cytochrome P450, The Enzyme Responsible for Estrogen Biosynthesis*. *Endocrine reviews*, 15: 342-355.

Soler, A.J., Astore, V., Sestelo, A., Rivolta, M., Jácome, L.N., Garde, J.J., 2003. Effect of thawing procedure on cryosurvival of deer spermatozoa: work in progress. *Theriogenology*, 60: 511-520.

Somoza, G.M., 2002. Eje hipotálamo-hipofisiario. Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). En: Ungerfeld, R., (Ed.) *Reproducción en los animales domésticos*. Tomo I. Montevideo. Melibea, 17-23p.

Świder-Al-Amawi, M., Marchlewicz, M., Wiszniewska, B., Wenda-Rózewicka, L., 2003. Effect of hCG on the morphology of rat epididymal epithelial cells in vitro. *Folia morphologica*, 62: 489-491.

Świder-Al-Amawi, M., Kolasa, A., Sikorski, A., Marchlewicz, M., Baranowska-Bosiacka, I., Wiszniewska, B., 2010. The immunoexpression of FSH-R in the ductuli efferentes and the epididymis of men and rat: effect of FSH on the morphology and steroidogenic activity of rat epididymal epithelial cells in vitro. *Journal of BioMed Research*, 2010.

Tao, Y.X., Lei, Z.M., Woodworth, S.H., Rao, C.V., 1995. Novel expression of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene in rat prostates. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 111: R9-R12.

Tao, Y.X., Lei, Z.M., Rao, C.V., 1998. Seminal vesicles are novel sites of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin—receptor gene expression. *Journal of Andrology*, 19: 343-347.

Tilbrook, A.J., Clarke, I.J., 2001. Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biology of Reproduction*, 64: 735-742.

Ungerfeld, R., 2007. Socio-sexual signaling and gonadal function: opportunities for reproductive management in domestic ruminants. Society of Reproduction and Fertility Supplement, 64: 207-221.

Ungerfeld, R., 2013. Treatment with an equine chorionic gonadotrophin single dose restored spermatozoa production in an azoospermic pampas deer (*Ozotoceros benzoarticus*) male: a case report. Reproductive Medicine and Biology, 12: 65-68.

Ungerfeld, R., Clemente, N., Bonjour, L., Orihuela, A., 2014. Equine chorionic gonadotrophin administration to rams improves their effectiveness to stimulate anoestrous ewes (the “ram effect”). Animal Reproduction Science, 149: 194-198.

Zhang, T., Guo, C.X., Hu, Z.Y., Liu, Y.X., 1997. Localization of plasminogen activator and inhibitor, LH and androgen receptors and inhibin subunits in monkey epididymis. Molecular Human Reproduction, 3: 945-952.