



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**ADMINISTRACIÓN DE β -NGF A CARNEROS FUERA DE LA ESTACIÓN
REPRODUCTIVA COMO ESTRATEGIA PARA MEJORAR SU DESEMPEÑO
REPRODUCTIVO**

por

**Sebastián CASTILLO
Federica SALOMONE**

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

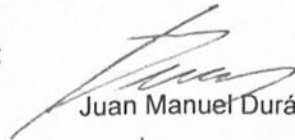
MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2025**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Juan Manuel Durán

Segundo miembro (tutor):



Rodolfo Ungerfeld

Tercer miembro:



Karina Neimaur

Cuarto miembro:



Javier Meilán

Quinto miembro:



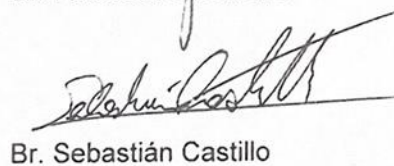
Marcelo Ratto

Fecha: 4 de setiembre de 2025

Autores:



Br. Federica Salomone



Br. Sebastián Castillo

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a todas las personas que, de una forma u otra, hicieron posible la realización de este trabajo y el cierre de una etapa tan significativa en nuestras vidas. En primer lugar, agradecemos especialmente a nuestro tutor, el Dr. Rodolfo Ungerfeld, por su dedicación, tiempo y conocimiento, fundamentales para poder culminar esta etapa. Asimismo, agradecemos profundamente a nuestros cotutores, el Dr. Marcelo Ratto y el Dr. Javier Meilán, por su constante apoyo, colaboración y valiosos aportes a lo largo del proyecto.

Deseamos hacer una mención especial al personal de la Facultad y a la Cátedra de Fisiología, cuyo compromiso y disposición fueron imprescindibles.

A nuestras familias y amigos, gracias por el apoyo incondicional, por su comprensión y por acompañarnos a lo largo de todo el proceso, el cual hoy esta culminado.

Y, por último, a la Facultad de Veterinaria, que fue mucho más que un lugar de formación, fue nuestro hogar durante estos años, donde no solo aprendimos, sino donde también construimos vínculos que quedarán para siempre.

A todos, gracias por ser parte de este camino.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|----|
| LISTA DE CUADROS Y FIGURAS | 6 |
| 1. RESUMEN | 7 |
| 2. SUMMARY | 8 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 9 |
| 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 10 |
| 4.1 Ovulación inducida en camélidos | 10 |
| 4.2 OIF como β -NGF: factor de crecimiento neural (Nerve growth factor) | 11 |
| 4.3 Efecto dosis dependiente de β -NGF | 11 |
| 4.4 Receptores de β -NGF | 12 |
| 4.5 β -NGF en órganos reproductivos en machos | 12 |
| 4.6 Papel del β -NGF en la espermatogénesis | 13 |
| 4.7 Mecanismo de acción - Potencial acción del β -NGF sobre el eje hipotálamo–hipófisis–gonadal: | 14 |
| 4.8 Efectos del β -NGF en las características del espermatozoide | 16 |
| 4.9 Efectos de la administración exógena de β -NGF | 17 |
| 4.9.1. Efecto luteotrófico | 17 |
| 4.9.2. Aumento en la secreción de LH y FSH | 17 |
| 4.9.3. Efecto en calidad seminal | 18 |
| 4.9.4. Efectos en criopreservación seminal | 19 |
| 4.10 El carnero como modelo de estudio | 19 |
| 4.11 El carnero Corriedale | 20 |
| 4.12 Cambios ambientales. Fotoperiodo | 20 |
| 4.13 Cambios fisiológicos y morfológicos del carnero | 21 |
| 4.14 Administración de β -NGF como estimulación reproductiva en el carnero | 22 |
| 5. HIPÓTESIS DE TRABAJO | 23 |
| 6. OBJETIVOS | 24 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS | 25 |
| 7.1. Animales y mantenimiento | 25 |
| 7.2. Tratamientos experimentales | 25 |
| 7.3. Colecta de sangre y medición de testosterona | 25 |
| 7.4. Medición de circunferencia escrotal | 26 |
| 7.5. Colecta de semen | 26 |
| 7.6. Evaluación de semen | 26 |
| 7.7. Análisis estadístico | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 8. DISCUSIÓN | 33 |
| 9. CONCLUSIONES | 38 |
| 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 39 |

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Cronograma de actividades realizadas durante el ensayo experimental. **Página 27.**

Figura 2. Concentración espermática, volumen del eyaculado, total de espermatozoides en el eyaculado y total de espermatozoides normales del grupo de carneros tratados con 1 mg de β -NGF y del grupo no tratado con β -NGF. **Página 31.**

Figura 3. Cantidad total de espermatozoides motiles y espermatozoides con motilidad progresiva eyaculados del grupo de carneros tratados con 1 mg de β -NGF y del grupo no tratado con β -NGF. **Página 32.**

Tabla 1. Valores medios ($MMC \pm EEM$) y efecto del tratamiento (sin tratar o tratados con β -NGF), del tiempo y de la interacción entre tratamiento y tiempo, sobre la circunferencia escrotal, la concentración de testosterona, la calidad seminal y características del eyaculado de carneros tratados con cuatro dosis de 1 mg de β -NGF ($G\beta$ -NGF) o grupo control (CON) no tratados durante la estación no reproductiva. **Página 30.**

1. RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo determinar si la administración de β -NGF mejora el desempeño reproductivo de los carneros fuera de la estación reproductiva. El estudio se realizó durante la mitad de la estación no reproductiva (octubre-diciembre) con dos grupos de carneros Corriedale: tratados con 1 mg β -NGF (grupo G β -NGF) y un grupo control no tratado (grupo CON). Los carneros tratados recibieron cuatro dosis de β -NGF administradas cada 5 días. Se evaluaron periódicamente las características del eyaculado (volumen, concentración, motilidad, morfología, membrana funcional) y las concentraciones plasmáticas de testosterona hasta 58 días luego de la primera administración. El tratamiento con β -NGF aumentó significativamente el volumen del eyaculado ($P=0,004$), el total de espermatozoides eyaculados ($P=0,006$), así como el total de espermatozoides normales ($P=0,002$), motiles ($P=0,02$) y con motilidad progresiva ($P=0,01$) eyaculados. Estos efectos no se manifestaron inmediatamente, observándolos luego de finalizado el periodo del tratamiento. El tratamiento no modificó las concentraciones séricas de testosterona. Se concluyó que la administración intramuscular de β -NGF a carneros Corriedale fuera de la estación reproductiva mejora su desempeño reproductivo al aumentar la cantidad total de espermatozoides, su motilidad, su morfología y el volumen del eyaculado, lo cual podría ser una herramienta biotecnológica para optimizar el uso de carneros de alto valor genético.

2. SUMMARY

This study aimed to determine whether the administration of β -NGF improves the reproductive performance of rams outside the breeding season. The study was conducted during the middle of the non-breeding season (October–December) using two groups of Corriedale rams: one treated with 1 mg of β -NGF (β -NGF group) and an untreated control group (CON group). Treated rams received four doses of β -NGF administered every five days. Ejaculate characteristics (volume, concentration, motility, morphology, functional membrane integrity) and plasma testosterone concentrations were periodically evaluated for up to 58 days after the first administration. β -NGF treatment significantly increased ejaculate volume ($P=0.004$), the total number of ejaculated spermatozoa ($P=0.006$), and the number of normal ($P=0.002$), motile ($P=0.02$), and progressively motile spermatozoa ($P=0.01$). These effects were not immediate and were observed after the treatment period had ended. The treatment did not alter serum testosterone concentrations. It was concluded that intramuscular administration of β -NGF to Corriedale rams outside the breeding season improves their reproductive performance by increasing total sperm count, motility, morphology, and ejaculate volume. This approach may serve as a biotechnological tool to optimize the utilization of genetically valuable rams.

3. INTRODUCCIÓN

El factor de crecimiento neural beta (β -NGF) es una molécula proteica, originalmente llamada así por su rol como factor de crecimiento del tejido nervioso (Rocco et al., 2018). Sin embargo, la misma molécula fue encontrada en otros tejidos, cumpliendo diferentes funciones biológicas. En particular, el β -NGF fue encontrado en el plasma seminal de varias especies, incluyendo rumiantes domésticos (Bogle et al., 2018; Hoffman & Unsicker, 1982). Ratto et al. (2012) reportaron que el β -NGF alcanza importantes concentraciones en el plasma seminal de la llama y otros camélidos, siendo la sustancia responsable de la ovulación inducida en estas especies. Además, se ha demostrado la presencia de β -NGF y sus receptores en el tracto reproductivo masculino de varias especies (Bogle et al., 2018; Jin et al., 2010, Li et al., 2010), incluyendo los carneros (Mercati et al., 2024), lo que sugiere potenciales funciones en la regulación de la espermatogénesis y la maduración espermática.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Ovulación inducida en camélidos

Los camélidos son especies de ovulación inducida, es decir, que se necesita la cópula para inducir la secreción de GnRH en el hipotálamo, seguida por la liberación preovulatoria de la hormona luteinizante (LH) desde la hipófisis (Adams et al., 2005; Adams & Ratto, 2012; Silva et al., 2020). El primer aumento significativo en las concentraciones de LH plasmática ocurre entre 15 y 40 minutos después del inicio del apareamiento en llamas y alpacas (Bravo et al., 1990). El rápido aumento en la concentración de LH plasmática tras la cópula en camélidos se asemeja al observado en conejos (Jones et al., 1976) y gatos (Concannon et al., 1980), especies también clasificadas como de ovulación inducida. Originalmente se asumía que la estimulación física de la intromisión del pene era la responsable del desencadenamiento del aumento preovulatorio de LH (Fernandez-Baca et al., 1970). Sin embargo, los resultados de estudios recientes en llamas y alpacas apoyaron la hipótesis de que una sustancia química contenida en el semen es responsable de inducir la ovulación. Adams et al. (2005) demostraron la existencia de un potente factor inductor de ovulación (Ovulation inducing factor, OIF por su sigla en inglés) tras desencadenar la ovulación en el 93% de las alpacas y 90% de las llamas tratadas con plasma seminal intramuscular de su respectiva especie. Sorprendentemente, en dicho trabajo ninguna de las hembras ovuló tras la deposición intrauterina del plasma seminal. Los autores de dicho estudio atribuyeron las diferencias a una absorción atenuada de OIF desde la mucosa uterina en comparación con el músculo.

En los camélidos, la cópula tiene una duración prolongada, que varía entre 5 y 50 minutos, con un promedio de 18 minutos en alpacas y 20 minutos en llamas (Bravo et al., 1994). Durante este proceso, la deposición del semen es intracornual, con la eyaculación ocurriendo en grupos de contracciones (Bravo et al., 1994). Esta larga duración de la cópula provoca una inflamación aguda y transitoria del endometrio debido a la abrasión repetida del pene (Adams & Ratto et al., 2012). Bravo (2002) observó hemorragias, edema e inflamación en los cuernos uterinos en alpacas sacrificadas 24 horas después de la cópula. Además, Ratto et al. (2005) evidenciaron que la administración intramuscular de plasma seminal de alpaca a hembras de la misma especie indujo una tasa de ovulación significativamente más alta (93%) que la administración intrauterina (41%), con un valor intermedio tras un curetaje endometrial (67%). Estos resultados sugieren que el OIF en el plasma seminal actúa de manera sistémica y que el curetaje facilita su absorción, demostrando que la ovulación en alpacas no depende de la estimulación física del tracto genital, aunque esta es necesaria para provocar una irritación endometrial que aumente la absorción sistémica del OIF desde la mucosa uterina. Es decir, la cópula genera una acción similar a la realizada por el curetaje, como se observó en este estudio.

4.2 OIF como β -NGF: factor de crecimiento neural (Nerve growth factor)

Ratto et al. (2011) logró purificar el OIF, el que fue aislado del plasma seminal de llama como una molécula proteica de 14 kDa que provoca un pico preovulatorio de LH, seguido de ovulación y formación de cuerpo lúteo en las llamas, lo que sugiere un efecto endocrino a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Posteriormente, el OIF fue identificado como el ya conocido factor de crecimiento neural β -NGF (Ratto et al., 2012). El análisis mediante MALDI-TOF reveló una masa molecular de 13,221 Da, y secuencias aminoacídicas de OIF mostraron homología con las secuencias del β -NGF en humanos, cerdos, bovinos y ratones.

El β -NGF fue originalmente aislado tanto del veneno de serpiente como de las glándulas submaxilares de ratón (Levi-Montalcini & Angeletti, 1968). Inicialmente se había caracterizado principalmente por su papel en la supervivencia y crecimiento de neuronas sensoriales y simpáticas, así como en células de la médula adrenal (Angeletti & Bradshaw, 1971), pero posteriormente se descubrió que también interactúa con otras células blanco dentro del sistema nervioso, así como con células extra-neuronales, como los mastocitos, linfocitos T y B, granulocitos, monocitos, queratinocitos, células endoteliales y tejidos de los órganos reproductivos masculinos y femeninos (Rocco et al., 2018).

4.3 Efecto dosis dependiente de β -NGF

La fuente principal de β -NGF en el plasma seminal varía entre especies. En un estudio realizado con varias especies, la próstata fue identificada como la principal fuente de β -NGF seminal en llamas y alpacas, mientras que en bovinos fue la glándula vesicular y las ampollas, y en ciervos fueron las ampollas y la próstata (Bogle et al., 2018). La abundancia de inmunoreactividad a β -NGF en la próstata de la llama determinada en dicho estudio respalda el alto nivel encontrado en el plasma seminal. Particularmente, en los eyaculados de llama y alpaca, β -NGF representa aproximadamente el 27% del total de las proteínas, mientras que en los eyaculados bovinos representa menos del 1% (Bogle et al., 2018). Coincidiendo con lo antes mencionado, Ratto et al. (2006) demostraron que el plasma seminal de toro indujo ovulaciones en el 26% de las llamas tratadas mediante administración intramuscular, mientras que el 100% de las hembras tratadas con plasma seminal de llama o alpaca ovularon. Cabe destacar que el experimento se realizó utilizando el mismo volumen de plasma seminal en las diferentes especies sin considerar las concentraciones de β -NGF en cada caso.

Tanco et al. (2011) compararon los efectos de cuatro dosis de β -NGF, con una dosis máxima (500 μ g) que corresponde a 1/25 de la cantidad normalmente presente en un eyaculado de llama (un eyaculado promedio de 2 mL contiene aproximadamente 3-6 mg de β -NGF) sobre la ovulación, y la formación y función del cuerpo lúteo. Se observó que dosis más altas inducen la ovulación en un mayor porcentaje de animales (90%) y favorecen el proceso de luteinización, observándose que el cuerpo lúteo inducido alcanza un diámetro mayor. En cambio, dosis bajas (1/200 de lo normal) resultaron en

la ovulación de una menor proporción de animales y menor funcionalidad del cuerpo lúteo. Este estudio demuestra claramente el impacto significativo del β -NGF sobre la función ovárica y proporciona más evidencia de su papel en la regulación de la ovulación y la actividad de la fase lútea de manera dependiente de la dosis, así como también refuerza la hipótesis de que a mayor concentración de β -NGF en el plasma seminal del macho, mayor podría ser el impacto ejercido en la hembra tras la cópula aumentando la tasa de ovulación y posterior desarrollo embrionario.

4.4 Receptores de β -NGF

El β -NGF es un miembro de la familia de las neurotrofinas, estas se unen y activan receptores de alta afinidad que poseen un dominio tirosina quinasa, y cada neurotrofina se une a un receptor tirosina quinasa específico (Carrasco et al., 2020). El receptor tirosina quinasa A (trkA) es un receptor de alta afinidad para el β -NGF y media sus efectos neurogénicos tales como proliferación, supervivencia y diferenciación celular (Dissen et al., 1996). Además, todas las neurotrofinas interactúan con el receptor específico de baja afinidad (p75NTR). Además de ser un mediador apoptótico, ejerce diferentes funciones, entre ellas regula la activación de trkA, aumentando su afinidad al unirse al β -NGF. El receptor p75NTR también tiene una interacción de baja afinidad con otras neurotrofinas (Dissen et al., 1996).

4.5 β -NGF en órganos reproductivos en machos

Un estudio reciente que comparó cinco especies diferentes reveló que el β -NGF está presente en al menos una glándula accesoria masculina en todas ellas (Bogle et al., 2018). La principal fuente de β -NGF en llamas, conejos, cobayos y ciervos de cola blanca es la próstata, mientras que en bovinos y bisontes proviene de las ampollas y las glándulas vesiculares (Sari et al., 2018). Entre las especies examinadas hasta la fecha, la concentración de β -NGF en el plasma seminal parece ser más alta en camélidos y conejos, según pruebas bioquímicas y biológicas *in vivo* (ovulación) e *in vitro* (células PC12), además de ensayos inmunológicos como ELISA, RIA e inmunohistoquímica (García-García et al., 2017; Maranesi et al., 2015; Silva et al., 2012; Tribulo et al., 2014). En llamas tratadas con volúmenes similares de plasma seminal, la proporción de animales que ovuló fue del 90-100% cuando se usó plasma seminal de camélidos o conejos (Adams et al., 2005; Silva et al., 2011), del 26% con semen de toro (Ratto et al., 2006), del 29% con semen de caballo y del 18% con semen de cerdo (Bogle et al., 2011). La presencia de β -NGF en el plasma seminal de toros, carneros y padrillos fue confirmada posteriormente mediante caracterización proteómica (Druart et al., 2013).

En carneros, se ha observado que β -NGF está presente en múltiples órganos sexuales, siendo más abundante en las vesículas seminales, seguido por la próstata, el conducto deferente, la ampolla, el epidídimo, la glándula bulbouretral y los testículos. Un patrón similar se encontró para el receptor trkA, mientras que p75NTR se localizó principalmente en fibras nerviosas y ganglios. Además, los niveles de

ARNm de *trkA* y *p75NTR* mostraron un patrón de distribución similar, con una expresión elevada en las vesículas seminales (Mercati et al., 2024).

4.6 Papel del β -NGF en la espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso altamente organizado que ocurre en los túbulos seminíferos y culmina con la producción de espermatozoides maduros. Este se extiende por aproximadamente 48 días en carneros (Ortavant, 1958). Comprende tres etapas principales: la proliferación mitótica de las espermatogonias, seguida de dos divisiones meióticas sucesivas que generan primero espermatocitos y luego espermatidas, y finalmente la espermiogénesis, durante la cual las espermatidas se transforman en espermatozoides funcionales (Nishimura & L'Hernault, 2017). Tanto la espermatogénesis como la regulación del entorno seminífero se atribuyen principalmente a las células de Sertoli, que desempeñan un papel esencial a través del establecimiento de la barrera hematotesticular durante la pubertad. Esta barrera física, formada por uniones estrechas entre las células de Sertoli, divide el epitelio seminífero en dos compartimentos funcionales: el basal, donde se localizan las espermatogonias en mitosis, y el adluminal, un microambiente especializado donde ocurren la meiosis y la diferenciación espermática (França et al., 2016). Las células de Sertoli, que se extienden desde la base hasta la luz del túbulo, proporcionan soporte estructural y funcional, siendo esenciales para el desarrollo de las células germinales (Setchell, 1991).

La espermatogénesis está regulada tanto por mecanismos endocrinos como paracrinos. El control hormonal está mediado por la hormona foliculoestimulante (FSH) y la testosterona. El mecanismo paracrino de regulación está mediado por las células de Sertoli y las células germinales, las cuales están involucradas en la producción de una variedad de factores reguladores (Sofikitis et al., 2008). Las células de Sertoli son indispensables para la espermatogénesis; de hecho, su número determina la cantidad de espermatozoides que un macho puede producir (Cheng et al., 2010). Sin embargo, las células germinales también son necesarias para modular la función de las células de Sertoli (Pineau et al., 1993), por lo que un funcionamiento testicular adecuado depende de la capacidad de establecer una comunicación bidireccional entre ambos tipos celulares. De hecho, el fluido seminífero del carnero contiene secreciones tanto de células de Sertoli como germinales, las cuales podrían participar en esta interacción (Chalmel et al., 2014). En ratas, *p75NTR* está presente en células de Sertoli, células de Leydig, espermatocitos y espermatidas elongadas mientras que *TrkA* solo mostró inmunorreactividad en las espermatidas elongadas (Li et al., 2005).

Numerosos estudios han indicado el impacto del β -NGF en varios aspectos de la espermatogénesis. Se ha demostrado la presencia de la proteína β -NGF y sus receptores en células germinales de carneros (Mercati et al., 2024). A nivel testicular, dicho estudio determinó la presencia de β -NGF en las espermatidas, desde la fase de Golgi hasta la fase final de maduración de la espermiogénesis. Esta localización ya

fue descrita en otras especies animales: en los espermatozoides recolectados de la rete testis y de diferentes regiones del epidídimo, como la cabeza y la cola, en el hámster dorado (Jin et al., 2010). A su vez este mismo estudio demostró que el β -NGF estimula funciones espermáticas importantes como la apoptosis, la motilidad y la reacción acrosómica, y en el caso de estas dos últimas, la regulación ocurre de manera dependiente del tiempo y de la dosis.

El β -NGF podría actuar sobre la espermatogénesis en forma autocrina y paracrina. Seidel et al. (1996) demostró que el cultivo tanto de células de Sertoli como de células miodies peritubulares induce la expresión de ARNm de p75NTR, demostrando un mecanismo de acción autocrino del β -NGF en estas células. Mercati et al. (2024) describe la señal de β -NGF como autocrina tras demostrar que los tejidos sexuales del carnero sintetizan ARNm de β -NGF y sus receptores. Adicionalmente, en dicho estudio, mediante inmunohistoquímica se demostró que existen señales positivas para β -NGF, trkA y p75NTR en varias células y estructuras, incluyendo las células germinales de la gónada, el epitelio de revestimiento del epidídimo, el epitelio glandular de la ampolla del conducto deferente, las vesículas seminales, las glándulas prostáticas y bulbouretrales, así como en las fibras nerviosas y los ganglios periféricos anexos a los órganos analizados. Por lo tanto, se asume, además, un mecanismo de acción paracrino.

Basándose en la presencia de β -NGF y sus receptores en las diferentes fases de la espermatogénesis, se plantea la hipótesis de que el β -NGF podría tener un papel en la maduración de las espermátidas (Jin et al., 2010; Mercati et al., 2024).

4.7 Mecanismo de acción - Potencial acción del β -NGF sobre el eje hipotálamo–hipófisis–gonadal:

La espermatogénesis está regulada por el eje hipotálamo–hipófisis–gonadal. El hipotálamo produce la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) y la libera de forma pulsátil estimulando a las células gonadotrópicas de la adenohipófisis a sintetizar y secretar LH y FSH (Ferraguti et al., 2022). La secreción de LH es inmediata tras la estimulación con GnRH, la liberación de FSH es lenta y gradual (Lincoln, 1978). La LH estimula la producción de testosterona en las células de Leydig presentes en el espacio intersticial (Ferraguti et al., 2022). La FSH, por otro lado, actúa tanto de forma independiente como en conjunto con la testosterona para estimular la proliferación de las células de Sertoli presentes en los túbulos seminíferos y para producir moléculas de señalización y nutrientes que apoyen la maduración de las espermátidas, induce la producción de ABP (proteína fijadora de andrógenos) e inhibina en las células de Sertoli. La inhibina ejerce un efecto directo inhibitorio de la secreción de FSH sobre la adenohipófisis. La FSH y la LH juegan un papel central en la regulación de la espermatogénesis, principalmente porque median el funcionamiento de las células de Sertoli, ya sea de forma directa o indirecta (Oduwole et al., 2018). El eje hipotálamo–hipófisis–gonadal está finamente regulado por un mecanismo de retroalimentación negativa (Ferraguti et al., 2022).

Silva et al. (2011) plantearon que el β -NGF actúa sobre las células secretoras de GnRH en el hipotálamo para generar su descarga. El efecto de liberación de LH luego de la administración de 1 mg de β -NGF fue completamente inhibido en llamas tratadas previamente con un antagonista de GnRH (Cetrorelix), que se une de manera competitiva a los receptores de GnRH en la adenohipófisis. La falta de efecto estimulante del β -NGF sobre la secreción de LH después de bloquear los receptores de GnRH respalda la idea de que el hipotálamo es el objetivo primario de la acción del β -NGF. Lo mismo fue reportado por Luo et al. (2018), tras la administración de Cetrorelix (0,5 mg/kg) mediante inyección intraperitoneal 30 minutos antes de la administración intracerebroventricular de β -NGF a ratones macho donde los efectos del β -NGF estimulando la secreción de LH y testosterona fueron completamente bloqueados por el tratamiento. De hecho, se demostró que el hipotálamo de llamas tiene receptores trkA para β -NGF (Carrasco et al., 2016). Recientemente, Carrasco et al. (2020) determinaron la presencia de varias poblaciones neuronales hipotalámicas con expresión de TrkA y p75NTR , respaldando la hipótesis de un efecto central del β -NGF. Curiosamente, en dicho estudio la presencia de p75NTR en tanicitos y células endoteliales del hipotálamo se encontró exclusivamente en llamas, mientras que estuvo ausente en ovejas indicando una posible diferenciación en los efectos de β -NGF en especies de ovulación inducida y espontánea.

Sin embargo, la aplicación de β -NGF a cultivos celulares de la hipófisis de llamas y bovinos induce la secreción de LH. Además, se observó un aumento en la magnitud de la respuesta a medida que se incrementó la dosis administrada, lo que proporciona evidencia de un efecto directo del β -NGF sobre la secreción de gonadotrofinas en la porción anterior de la hipófisis (Bogle et al., 2012), glándula que en ratas también tiene receptores para β -NGF (Patterson & Childs, 1994). Esto es consistente con un estudio en el que se demostró que la adición de plasma seminal de camellos bactrianos a cultivos primarios de células hipofisarias de rata induce la secreción de LH (Zhao et al., 2001). Por lo tanto, esto implica que β -NGF podría tener una doble acción, estimulando tanto la liberación de GnRH en el hipotálamo como la de LH en la adenohipófisis.

Se necesitan más estudios tanto en especies de ovulación inducida como en las de ovulación espontánea para determinar si esta proteína presente en el plasma seminal, que es absorbida a la circulación desde el lumen uterino, atraviesa la barrera hematoencefálica y si sus receptores están localizados en el hipotálamo. Es interesante notar que, en diversos estudios, el aumento de LH inducido por β -NGF exógeno comienza y alcanza su pico entre 1 y 2 horas después del provocado por GnRH exógeno (Adams et al., 2005; Carrasco et al., 2021). Esta respuesta relativamente retardada del β -NGF podría indicar la participación de un paso intermedio en la vía necesaria para inducir la liberación de GnRH/LH.

Curiosamente, en el plasma seminal de carneros analizado durante la actividad reproductiva de esta especie, el β -NGF aparece en concentraciones reducidas

durante la estación reproductiva (Mercati et al., 2024), que corresponde a un fotoperiodo negativo. Esto plantea la interesante posibilidad de que este componente participe en un mecanismo que inhiba la actividad reproductiva masculina y se active durante el anestro de la hembra. En concordancia con lo anteriormente mencionado, Squillacioti et al. (2009) demostraron que los niveles de ARNm de β -NGF y TrkA aumentaron significativamente después de la castración en ratas, sugiriendo que los andrógenos regulan negativamente la expresión de β -NGF y TrkA. Estos resultados podrían sugerir la implicancia del β -NGF dentro de un mecanismo de retroalimentación negativa del eje-hipotálamo-hipófisis-gonadal.

4.8 Efectos del β -NGF en las características del espermatozoide

Una vez finalizada la espermatogénesis, cuando los espermatozoides salen de los testículos transportados a través de la rete testis, se consideran inmaduros, ya que no son móviles, no pueden llevar a cabo la reacción acrosómica ni fertilizar un ovocito (Robaire et al., 2006). Para adquirir estas capacidades, los espermatozoides deben someterse a un proceso de maduración en el epidídimo (Fournier-Delpech et al., 1979), el cual toma aproximadamente 13 días en el carnero (Ortavant, 1958). Las principales características de un espermatozoide maduro pueden resumirse como un gameto masculino capaz de activar su motilidad (progresiva e hiperactivada), capacitarse, unirse a la zona pelúcida, fusionarse con la membrana del ovocito y lograr el desarrollo de un embrión viable (Dacheux & Dacheux, 2013).

Se demostró que el β -NGF ejerce una variedad de efectos sobre las características del espermatozoide maduro. Tanto el β -NGF como sus receptores se han identificado en células espermáticas. En bovinos, el β -NGF se localiza en la cabeza y la cola de los espermatozoides, mientras que el receptor TrkA está presente en el acrosoma, núcleo y cola (Li et al., 2010). De forma similar, Stabile et al. (2023) encontraron que ambos receptores se expresan en la cola de espermatozoides maduros humanos. Más recientemente, Meilan et al. (2025) confirmaron la presencia de β -NGF y sus receptores en espermatozoides de carneros. La presencia en dichas estructuras podría estar relacionada con una función del β -NGF en la regulación de la motilidad espermática. Por otro lado, la activación de p75NTR es importante principalmente en la modulación de la capacitación, la motilidad espermática y la apoptosis. Se comprobó que la neutralización del receptor TrkA, permitiendo únicamente la unión de β -NGF al receptor p75NTR, incrementó la cantidad de células apoptóticas en el semen. Asimismo, en conejos se ha demostrado que al bloquear p75NTR se reduce la velocidad de desplazamiento del esperma, lo cual es coherente con la alta cantidad de receptores expresados en la pieza media, zona responsable de la producción de energía mitocondrial (Castellini et al., 2019). Por lo tanto, el β -NGF podría tener un papel clave en la modulación de la supervivencia y senescencia de los espermatozoides, dependiendo de cuál vía de señalización receptor-dependiente se active: p75NTR (pro-apoptótica) o TrkA (pro-supervivencia). Es necesario destacar que el rol de la apoptosis es la eliminación de espermatozoides defectuosos

producidos durante la espermatogénesis, mientras que en los espermatozoides maduros representa una senescencia programada necesaria. En este contexto, se reportó que el ARNm de p75NTR se expresa en niveles elevados en muestras de semen calificado como infértil en comparación con los espermatozoides de hombres fértiles. Este hallazgo sugiere que el desarrollo normal del espermatozoide requiere una disminución progresiva en la expresión génica de TrkA y p75NTR, y que la persistencia de un nivel elevado de p75NTR en espermatozoides maduros podría constituir un mecanismo para facilitar la reabsorción de células defectuosas, asegurando así la calidad espermática (Stabile et al., 2023).

4.9 Efectos de la administración exógena de β -NGF

Aunque el β -NGF y sus receptores se expresan en varios órganos reproductivos de diversas especies, el mecanismo de síntesis, secreción y transporte en el tracto reproductivo masculino, así como el papel del β -NGF en la función espermática, son poco entendidos tanto en camélidos como en otras especies. Por ello, la administración exógena de β -NGF puede ser una excelente estrategia para determinar sus efectos. Si bien existe cierta bibliografía sobre dicho aspecto principalmente en hembras (Botino et al., 2021; Gajardo et al., 2021; Tanco et al., 2011; Tribulo et al., 2014), la información existente sobre los posibles efectos de la aplicación de β -NGF en machos es aún escasa.

4.9.1. Efecto luteotrófico

En llamas, se demostró que la administración de β -NGF tiene un efecto luteotrófico directo al inducir la liberación de LH con un inicio retrasado y una duración prolongada en comparación con GnRH, lo que se asocia con una mayor vascularización del folículo ovulatorio y del cuerpo lúteo en desarrollo, así como un aumento más rápido en la concentración de progesterona en hembras (Ulloa-Leal et al., 2014). Aunque Tribulo et al. (2014) administraron 6 mL de plasma seminal de bovino conteniendo 250 ug/mL de β -NGF a vacas, no lograron inducir la ovulación, pero sí se sincronizó la misma y se alcanzó un mayor desarrollo del cuerpo lúteo. Más recientemente, Gajardo et al. (2021) confirmaron este efecto al administrar β -NGF a vaquillonas asociado a un tratamiento de inseminación a tiempo fijo, lo que resultó en un aumento de la irrigación del cuerpo lúteo y una mayor secreción de progesterona. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que la neurotrofina pueda ser utilizada como un agente luteotrófico para mejorar la eficiencia reproductiva en especies domésticas.

4.9.2. Aumento en la secreción de LH y FSH

Carrasco et al. (2021) demostraron que la administración intravenosa de 1 mL de β -NGF a una concentración de 1 mg/mL indujo un aumento de 6 veces en las concentraciones de LH en llamas y alpacas macho intactos, y la respuesta fue el doble de alta que la obtenida después del tratamiento con GnRH, permaneciendo elevadas durante al menos 2 horas más. La respuesta de LH observada en machos fue similar

a la reportada en estudios previos en llamas hembras tratadas con β -NGF (Adams et al., 2005), donde la concentración de LH en plasma aumentó tras la administración de β -NGF, de forma más lenta, pero perdurando por mayor tiempo que en el grupo tratado con GnRH.

A través de la estimulación en el aumento de LH, β -NGF podría promover la producción de testosterona. En este mismo estudio, Carrasco et al. (2021) demostraron que mientras que los niveles de testosterona plasmática eran inicialmente similares en ambos grupos, posteriormente disminuyeron en el grupo control, probablemente debido al estrés por manipulación, pero se mantuvieron estables (con un aumento no significativo) en el grupo tratado con β -NGF.

Al modificar las concentraciones de testosterona, el β -NGF podría influir en los comportamientos sociales y reproductivos. De hecho, un estudio reciente en ratones (Luo et al., 2018) apoya la noción de que, la administración intranasal de β -NGF (12,5, 25, 50 o 100 μ g/kg) dos veces por semana durante 12 semanas resultó en un aumento significativo de las concentraciones de LH y FSH sérica, al igual que de testosterona sérica e intratesticular. También se evidenciaron mejoras en el comportamiento sexual, incluyendo el número de montas, el número de eyaculaciones, y el tiempo en el que se producía la eyaculación. El peso de las vesículas seminales, la viabilidad espermática, la tasa de supervivencia de espermatozoides y la cantidad de estos en la cola del epidídimo aumentaron significativamente en los ratones tratados con β -NGF.

Por otra parte, en hembras, el β -NGF también indujo proliferación celular en ovarios de ratas neonatales, lo que sugiere un papel en el mantenimiento de la vascularización folicular y lútea (Julio-Pieper et al., 2006). Además, estimuló la secreción de estradiol en células de la granulosa humana, aumentando la síntesis de receptores de FSH (Salas et al., 2006). Las capas de granulosa y teca del folículo dominante, tanto en ondas foliculares anovulatorias como ovulatorias del ciclo estral, mostraron niveles más altos de receptores *trkA* que los folículos subordinados, lo que sugiere un papel de β -NGF durante la selección y maduración de los folículos (Carrasco et al., 2016).

4.9.3. Efecto en calidad seminal

En 2010, dos estudios distintos informaron sobre la adición de β -NGF exógeno al eyaculado de distintas especies animales. Un grupo demostró que la adición de β -NGF exógeno tenía efectos positivos en la viabilidad espermática y en la apoptosis de espermatozoides de bovino, aunque no afectaba la reacción acrosómica (Li et al., 2010). El otro grupo estudió espermatozoides de hámster, demostrando que el β -NGF estimula la reacción acrosómica y aumenta la motilidad espermática. Este efecto estimulante del β -NGF sobre la motilidad espermática fue dependiente tanto del tiempo como de la dosis. La velocidad rectilínea, un indicador clave de la capacidad de los espermatozoides para fertilizar un óvulo, se incrementó de igual manera con el tratamiento de β -NGF (Jin et al., 2010). Posteriormente se publicó un estudio en

esperma humano que reportó que el β -NGF *in vitro* también mejora características de motilidad espermática como la velocidad rectilínea, la velocidad curvilínea, la velocidad promedio de trayectoria, la linealidad y la frecuencia de cruce del flagelo (Shi et al., 2012). Lo mismo fue reportado por Castellini et al. (2019), demostrando que la administración de β -NGF a semen de conejos *in vitro*, afectó tanto la cinética como otros indicadores fisiológicos como capacitación y apoptosis.

4.9.4. Efectos en criopreservación seminal

Adicionalmente, otros estudios han demostrado que el β -NGF también tiene un efecto positivo en la motilidad de los espermatozoides criopreservados. La adición de β -NGF a muestras criopreservadas mejora la motilidad y viabilidad de los espermatozoides humanos, reduce la apoptosis y aumenta la concentración de óxido nítrico (Saeednia et al., 2015). Parthipan et al. (2017) observaron que los niveles de β -NGF son más altos en el semen de toros clasificados como “buenos” (aquellos que presentaron un porcentaje de eyaculados descartados inferior al 25% durante el año) que en los categorizados como “pobre” (registraron más del 40% de eyaculados descartados en el mismo período). Además, demostraron que el β -NGF ejerce efectos positivos en las características cinéticas del semen luego de ser descongelado (como, por ejemplo, velocidad espermática, linealidad, rectitud y potencial de membrana mitocondrial).

4.10 El carnero como modelo de estudio

Hasta donde sabemos, existe escasa información sobre la presencia y localización de β -NGF y sus receptores en la especie ovina. Con anterioridad se determinó su presencia en el tracto reproductivo del carnero, incluyendo testículos, epidídimo y glándulas accesorias (Bogle et al., 2018; Mercati et al., 2024). Dichos autores también determinaron su presencia en el plasma seminal, con concentraciones variables a lo largo del año. Posteriormente Meilán et al. (2025) también determinó la presencia de β -NGF y sus receptores en los espermatozoides de dicha especie. En el caso de la hembra, β -NGF se encontró en líquido folicular en ovejas, variando su concentración en las diferentes fases del desarrollo folicular (Barboni et al., 2002). Es bastante probable que la respuesta ovulatoria pueda verse influenciada por la posible presencia de dicha proteína en el plasma seminal del macho. En 2020, Bottino administró β -NGF a ovejas en anestro, logrando una mayor tasa de crecimiento folicular, y una mayor proporción de ovejas que ovularon con respecto a las que se les administró GnRH.

Además, posteriormente Bottino et al. (2021) demostraron que la monta frecuente de los carneros a ovejas desencadena un aumento de la cantidad de LH secretada durante el pico, acorta el celo, y disminuye la relación LH/estrógenos. Aunque en este trabajo no se exploraron los mecanismos que podrían estar subyacentes, estos son efectos previamente vinculados a β -NGF en llamas (Adams et al., 2005), sugiriendo una posible acción de dicha proteína presente en el plasma seminal.

Crispo et al. (2016) evidenciaron que la incorporación de β -NGF al medio de maduración y fertilización durante la producción in vitro de embriones ovinos mejora la tasa de segmentación y desarrollo de estos. Este efecto además de estar relacionado con el ovocito y/o las células del cúmulo, podría sugerir una relación interesante entre el β -NGF encontrado en el plasma seminal del carnero y los posibles efectos que ejerce sobre los espermatozoides del eyaculado.

En síntesis, estos trabajos demuestran que las hembras ovinas son sensibles a la administración de β -NGF, al igual que muchas otras especies, por lo que sería esperable encontrar efectos positivos de la administración de β -NGF en machos de la misma especie. En ese sentido, los carneros pueden ser un excelente modelo para estudiar si la administración de β -NGF genera respuestas reproductivas en los machos de rumiantes domésticos, dado que tienen cambios estacionales fisiológicos en su estatus reproductivo que le permite contar con periodos de mayor sensibilidad potencial a ser estimulados.

4.11 El carnero Corriedale

La raza ovina Corriedale es altamente versátil y se adapta bien a las condiciones climáticas y geográficas del país. En particular, los carneros Corriedale han sido ampliamente estudiados en Uruguay como modelo reproductivo (Bielli et al., 1997; Gastel et al., 1995; Pérez-Clariget et al., 1997a, 1998a, 1998b; Ungerfeld, 2012). La literatura científica indica que su actividad reproductiva aumenta gradualmente en primavera (octubre a diciembre), se estabiliza a comienzos del verano, disminuye a partir de abril y alcanza valores basales en junio. Durante este período, los carneros experimentan diversos cambios fisiológicos y morfológicos propios de la estacionalidad reproductiva.

4.12 Cambios ambientales. Fotoperíodo

Los ovinos han desarrollado una estrategia reproductiva que vincula la época de actividad sexual con el fotoperíodo. Es así que esta especie es conocida desde hace tiempo como mamíferos estacionales de día corto (Hafez, 1952). Aunque el carnero es fértil durante todo el año y no presenta un periodo de completa quiescencia como la oveja, también muestra variaciones estacionales en su actividad reproductiva (Lincoln & Short, 1980), alcanzando el pico de máxima actividad alrededor de un mes antes que las ovejas (Evans & Robinson, 1980).

El fotoperíodo es la principal señal ambiental que controla la estacionalidad reproductiva de los ovinos. La retina recibe la información fotoperiódica, que mediante vías multi sinápticas llega a la glándula pineal, donde tiene lugar la síntesis y secreción de melatonina durante la noche. La melatonina, hormona para la cual se han identificado receptores hipotalámicos y en otros sitios del organismo, es el traductor hormonal de la información fotoperiódica que recibe el animal (Forcada et al. 2009). Los cambios en el fotoperíodo son percibidos por el sistema nervioso, quien transmite

primeramente la información, y se traduce en cambios reproductivos a través del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (D'Occhio & Suttie, 1992; Malpaux et al., 1993). Las horas de luz modifican el patrón de secreción de la LH: los días cortos estimulan su pulsatilidad y los días largos la disminuyen (Lincoln et al., 1976; Pelletier & Ortavant, 1975). El fotoperíodo influye también sobre la secreción de la FSH, modifica la respuesta hipofisaria al estímulo de la hormona GnRH y la respuesta testicular a la LH (Lincoln, 1977, 1978). El fotoperíodo actúa a través de vías GnRH dependientes, y modifica la secreción de esta hormona, ya sea actuando directamente sobre el generador pulsátil o modulando los efectos de retroalimentación negativa que la testosterona ejerce a nivel hipotalámico (Lincoln, 1984; Pelletier & Ortavant, 1975).

4.13 Cambios fisiológicos y morfológicos del carnero

Estos cambios incluyen diferencias en la pulsatilidad de LH (Pérez-Clariget et al., 1998b). La circunferencia escrotal, sufre variaciones durante el año de manera similar a las variaciones de peso corporal, disminuye durante el otoño (de mayo a junio) y permanece estable hasta la mitad del invierno. El primer aumento significativo de la circunferencia escrotal se registró a principios de primavera (septiembre) y la máxima circunferencia escrotal fue alcanzada a mediados de noviembre (Pérez-Clariget et al., 1998a). Con respecto a la secreción de testosterona, las concentraciones mínimas se registraron a fines de otoño (mayo) y las concentraciones máximas durante fines de verano y principio de otoño (Lincoln & Short, 1980; Ungerfeld, 2012), al igual que varios indicadores de calidad seminal como variaciones en morfología, volumen y motilidad.

Concretamente, se demostró que la incidencia de anomalías espermáticas aumenta en primavera y alcanza los valores máximos en verano (Pérez-Clariget et al., 1998b). Las anomalías observadas con mayor frecuencia fueron las de cola, gota citoplasmática distal y de cabeza representando juntas el 75% del total de las anomalías. Las anomalías específicas más frecuentes fueron la gota citoplasmática distal y la torsión simple de cola, sumando ambas casi 50% del total de anomalías observadas (López et al., 2011).

También se observan cambios estacionales en la histología testicular, aunque la actividad espermatogénica está presente durante todo el año. El diámetro (Gastel et al., 1995) y el volumen total de los túbulos seminíferos (Bielli et al., 1999) es máximo a principio de otoño (marzo) y mínimo a principios de invierno (observado en junio para el diámetro y en agosto para el volumen). La cantidad y calidad del semen eyaculado también sufre cambios a lo largo del año. El volumen, la concentración y la motilidad espermática presentan sus valores más bajos durante el invierno (Gundoğan et al. 2003), mientras que el porcentaje de espermatozoides normales más alto se observa en otoño (Pérez-Clariget et al., 1997a).

4.14 Administración de β -NGF como estimulación reproductiva en el carnero

Es relevante considerar que los cambios que ocurren durante las etapas finales de la estación no reproductiva pueden constituir indicadores valiosos de los procesos que podrían ser modulados por la administración de β -NGF. En especies con estacionalidad reproductiva, como la ardilla, se ha observado una variación en la expresión de β -NGF y de sus dos receptores de acuerdo al momento del año (Li et al., 2014; Zhang et al., 2020). En carneros, Mercati et al. (2024) reportaron que la concentración de β -NGF en el plasma seminal de carneros es mayor durante la estación no reproductiva. Si bien no se ha determinado la expresión estacional de sus receptores en esta especie, sería razonable esperar que su comportamiento siga un patrón similar al del neurotransmisor. De confirmarse esta hipótesis, el periodo en que se realizó nuestra experimentación —correspondiente a la fase final de la estación no reproductiva— representaría un momento particularmente adecuado para evidenciar los efectos de la administración de β -NGF, ya que los carneros podrían encontrarse en un estado de mayor receptividad a su acción.

Los espermatozoides que se observan en un eyaculado iniciaron su proceso de formación en el epitelio seminífero aproximadamente dos meses antes, ya que en el carnero la espermatogénesis dura entre 47 y 49 días (Ortavant, 1958) y el pasaje por el epidídimo 13 días (Berndtson et al. 1988). Por lo tanto, si los cambios inducidos a nivel testicular fueran exclusivamente promover el inicio de la espermatogénesis, estos se verían reflejados en la calidad seminal recién alrededor de 60-70 días luego de comenzada la administración de β -NGF.

Es posible que, durante etapas muy tempranas de la estación no reproductiva, estos animales no sean sensibles a estímulos hormonales, y por tanto no respondan adecuadamente a la administración de tratamientos hormonales. Los carneros Corriedale responden a la administración de eCG (gonadotrofina coriónica equina) con aumentos importantes de testosterona durante octubre - noviembre (Beracochea et al. 2020). Por lo tanto, se espera que, si los carneros responden a la administración de β -NGF, lo hagan en un periodo del año similar. Sin embargo, es posible que se produzcan efectos positivos en distintas etapas del ciclo espermatogénico, por lo que los efectos podrían ser más rápidos.

Los efectos positivos en la calidad seminal podrían ser tanto de forma directa, como indirecta, mediante el aumento de LH y testosterona. Estos efectos pueden influir en la maduración epididimaria y en la composición del plasma seminal. En este sentido, por ejemplo, la administración de eCG indujo mejoras inmediatas en la calidad seminal en chivos, y estas mejoras cesaron inmediatamente después de la última dosis. Se demostró que el principal efecto se produjo sobre los espermatozoides ya formados y almacenados en el epidídimo y/o en la modificación de la composición del plasma seminal (Beracochea et al. 2018).

5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Se plantea como hipótesis: la administración de β -NGF en carneros fuera de la estación reproductiva induce cambios en las características del eyaculado y un aumento en la concentración sistémica de testosterona.

6. OBJETIVOS

Objetivos generales de la tesis:

Determinar si la administración exógena de β -NGF heterólogo modifica las características del eyaculado, la calidad seminal y aumenta la concentración sistémica de testosterona de carneros fuera de la estación reproductiva.

Objetivos específicos:

1) Comparar la calidad seminal, características del eyaculado y las concentraciones de testosterona de carneros Corriedale tratados con dosis múltiples de β -NGF fuera de la estación reproductiva (durante octubre-noviembre-diciembre).

2) Determinar en qué momento luego de comenzados los tratamientos es posible visualizar mejoras de la calidad del semen fresco y/o aumentos en las concentraciones de testosterona plasmática.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Animales y mantenimiento

El trabajo de campo se llevó a cabo en las instalaciones de la Unidad Académica Fisiología, en la sede central de la Facultad de Veterinaria, durante los meses de octubre, noviembre y diciembre de 2022. Se utilizaron 18 carneros Corriedale, adultos (3-6 años), propiedad de la Unidad de Fisiología. Los mismos fueron mantenidos en un espacio de aproximadamente 400 m², cercado, con acceso a sombra, área cerrada lateralmente, pero con ventilación, y libre acceso a agua. Además, tenían acceso a un área de similar tamaño para poder pastorear durante tiempo limitado por día (dependiendo del clima, aproximadamente 2 h/día). Los animales eran alimentados con ración para ovinos y fardos de alfalfa seca en cantidad ajustada de acuerdo con el peso para su mantenimiento, ofertada en dos momentos del día. Se controló en forma periódica la presencia de huevos de parásitos gastrointestinales.

7.2. Tratamientos experimentales

Los animales fueron asignados de forma aleatoria a dos grupos experimentales de 9 animales cada uno, homogéneos en cuanto a peso y edad. Mientras que los animales de uno de los grupos permanecieron como controles no tratados (grupo CON), los del grupo G β -NGF recibieron 4 administraciones intramusculares de 1 mg de β -NGF, una cada 5 días (primera administración = Día 0). El β -NGF a utilizar fue aislado y purificado a partir de plasma seminal de llamas, y su efecto biológico fue validado de acuerdo a su capacidad de inducir la ovulación en esta especie. La dosis utilizada en el presente experimento fue la misma empleada en estudios previos en los que indujo la ovulación en ovejas en anestro estacional (Bottino et al., 2021). Además, en un estudio en llamas machos, la misma dosis fue capaz de inducir un pico de LH (Carrasco et al., 2021).

7.3. Colecta de sangre y medición de testosterona

Se colectaron muestras de sangre por venopunción yugular los Días -7 y -5, diariamente desde el Día 0 hasta el Día 20, continuando luego 2 veces por semana hasta alcanzar el Día 58 (Figura 1). Las muestras fueron colectadas sin anticoagulante, se dejaron coagular a temperatura ambiente durante 30 minutos, se centrifugaron y se separó el suero, el que luego fue congelado en tubos eppendorf rotulados a -20 °C hasta la medición de testosterona. La concentración de testosterona en suero fue medida por radioinmunoanálisis utilizando un kit comercial (TESTO-RIA-CT, DAsource ImmunoAssays S.A, Bélgica). Las muestras fueron analizadas en tres ensayos. El límite de detección de cada ensayo fue 0,12 nmol/L; 0,08 nmol/L y 0,11 nmol/L respectivamente. Los coeficientes de variación de intraensayo e interensayo fueron inferiores al 12%.

7.4. Medición de circunferencia escrotal

La circunferencia escrotal fue medida en el diámetro escrotal más ancho. Las mediciones fueron realizadas siempre por el mismo operador, utilizando un escrotímetro, los Días -6, 8, 18, 30 y 58 (Figura 1).

7.5. Colecta de semen

Se colectó semen dos veces antes del inicio del tratamiento (Días -7 y -5), seguida de 5 muestras colectadas a intervalo de 5 días desde el Día 3 hasta el Día 23. Finalmente, se colectaron 5 muestras a intervalo de 7 días desde los Días 30 a 58 (Figura 1). En cada ocasión se colectó semen de todos los animales el mismo día intercalando uno de cada grupo experimental. Para disminuir la contaminación de suciedad de las muestras de semen, el pene fue exteriorizado antes de comenzar la recolección e higienizado utilizando gasas con suero fisiológico.

Se decidió no colectar semen con vagina artificial porque la variación de testosterona puede modificar el comportamiento sexual, y por lo tanto el resultado de la colecta de semen (Gordon, 1997), causando que la propia técnica de colección impacte sobre el resultado. El método utilizado para la colecta de semen consistió de un minuto de masaje ecoguiado de las glándulas anexas (método TUMASG, por sus siglas en inglés), con el fin de reducir posteriormente la cantidad e intensidad de los pulsos eléctricos para lograr la eyaculación (Guerrero-Gutiérrez et al., 2021; Ungerfeld et al., 2015). Adicionalmente, TUMASG es menos estresante y probablemente menos doloroso que la electroeyaculación, y no afecta la calidad del semen (Abril-Sánchez et al., 2017). El TUMASG fue realizado siempre por el mismo operador. Se observaron las glándulas bulbouretrales, las vesículas seminales y las ampollas mediante ultrasonido transrectal en tiempo real utilizando una sonda lineal de 7.5 MHz (United Imaging, modelo IUStar 160 Vet, Ucrania). La sonda también se utilizó para masajear vigorosamente las ampollas, realizando un movimiento hacia adelante y hacia atrás para promover la expulsión del esperma. El procedimiento se repitió de forma continua hasta transcurrido un minuto. Posteriormente, en caso de no eyacular se aplicó la electroeyaculación. Esta se realizó utilizando un electroeyaculador automático con una sonda de 16 × 2,5 cm, equipada con tres electrodos longitudinales (ePORVAC, modelo e325, Argentina). Cuando la sonda fue insertada y colocada en su lugar, se aplicó un voltaje creciente, comenzando con pulsos eléctricos de 4 V, aumentando 1 V después de cada 10 pulsos hasta alcanzar 7 V en caso de no eyacular. Cada pulso duraba de 2 a 3 segundos, con intervalos de 2 segundos entre ellos.

7.6. Evaluación de semen

En todas las colectas se determinó el volumen del eyaculado, concentración, motilidad de masa, y los porcentajes de espermatozoides motiles, con motilidad progresiva, normales y con membrana funcional. Se calculó el total de espermatozoides eyaculados, y partir de este, el total de espermatozoides normales eyaculados y total

de espermatozoides con membrana funcional eyaculados. Las variables que incluyeron los espermatozoides motiles y espermatozoides con motilidad progresiva, tanto su total como su porcentaje, fueron evaluados a partir de las colectas realizadas los Días: -6, 3, 8, 23 y 58 (Figura 1).

La motilidad de masa espermática fue evaluada siempre por el mismo operario en un microscopio óptico con contraste de fase a 40X (Nikon Eclipse E200, China) con platina térmica acoplada (escala 0 a 5). El volumen del eyaculado se evaluó utilizando micropipetas, y la concentración espermática mediante espectrofotometría (SDM1, Minitube, Francia). Luego, el semen se diluyó utilizando un diluyente comercial (Andromed, Minitube, Alemania) y, mediante el uso de un sistema de análisis de semen computarizado (ISAS, Valencia, España), se determinó el porcentaje de espermatozoides motiles y de espermatozoides con motilidad progresiva. Además, se fijaron alícuotas de semen en formol citrato para la determinación del porcentaje de espermatozoides con morfología normal, utilizando un microscopio óptico con contraste de fase a 100X (Nikon Eclipse E200, China). También se determinó el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional mediante el test de hipoosmosis (HOST) (Jeyendran et al., 1984). Para ello se utilizó un microscopio óptico a 100X (Evos XL Core, EE. UU.).

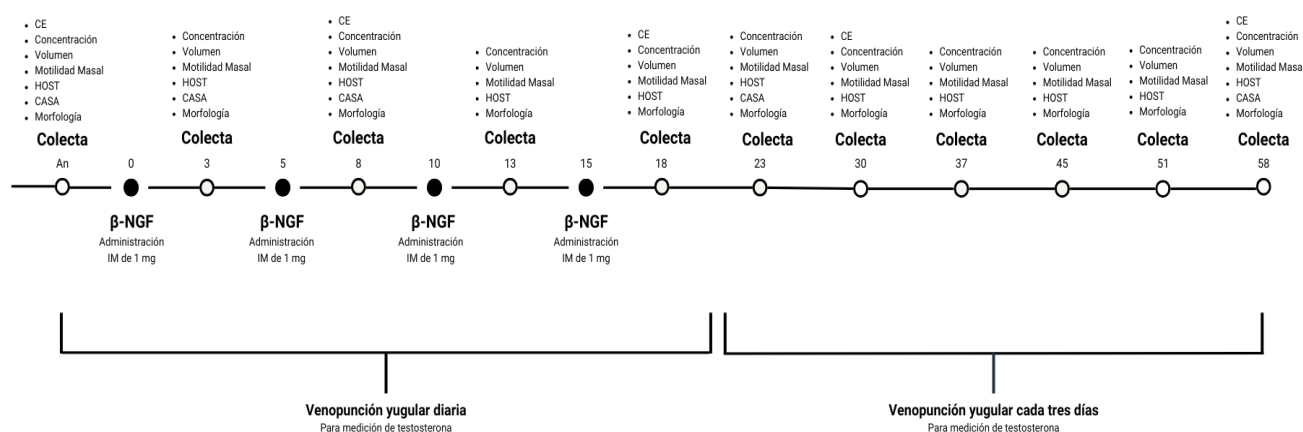


Fig. 1. Cronograma de actividades realizadas durante el ensayo experimental. Se incluyen cuatro administraciones de β -NGF; las colectas de eyaculados con las evaluaciones de concentración, volumen, motilidad masal, membrana funcional a través del test hipoosmótico (HOST), motilidad y motilidad progresiva mediante sistema computarizado (CASA), morfología espermática, y la medición de circunferencia escrotal (CE) en sus respectivos días. También se incluye la obtención de sangre mediante venopunción yugular para la medición de testosterona.

7.7. Análisis estadístico

Se determinó la distribución de los residuos de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk. En todos los casos en que la distribución no fuera normal se la transformó mediante conversiones estándar para este tipo de datos. El total de espermatozoides

con membrana funcional se normalizó mediante raíz cuadrada, y el porcentaje de dicha variable con la función logística inversa (LOGIT). En el caso del porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva se utilizó la potencia. Luego fueron comparadas utilizando un modelo mixto en el software SAS. En el modelo se incluyó el tratamiento, el tiempo como variable repetida y su interacción como efectos principales, utilizando la estructura de covarianza autorregresiva para ajustar las distancias en el tiempo entre diferentes momentos. En los Días -3 y -5 se recopilaban datos para cada variable antes de la primera administración de β -NGF, por lo que se calculó el valor promedio obtenido en ambos momentos y se utilizó para el análisis, siendo presentado como \bar{X} . Los datos se presentan como medias de cuadrados mínimos (MMC) \pm error estándar de la media (EEM). Se consideraron como diferencias significativas aquellas con $P \leq 0,05$, y como tendencias aquellas en que $0,05 < P \leq 0,1$.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan los valores de la MMC y el EEM, los efectos principales de los tratamientos, del tiempo y la interacción entre tratamiento y tiempo de todas las variables de este experimento.

La circunferencia escrotal y la concentración de testosterona variaron únicamente con el tiempo ($P=0,04$ y $P<0,0001$ respectivamente) (Tabla 1). Hubo interacción entre tratamiento y tiempo en la concentración espermática, además de que esta varió con el tiempo ($P=0,02$ y $P=0,0002$ respectivamente; Figura 2), siendo en el día 3 mayor en el grupo CON que en el grupo G β -NGF ($P=0,04$). De forma similar, hubo un efecto del tiempo e interacción en relación al volumen eyaculado, siendo mayor el grupo G β -NGF vs CON el Día 37 ($P=0,04$) y en el grupo CON vs G β -NGF el Día 45 ($P=0,03$). También hubo interacción entre tratamiento y tiempo en el total de espermatozoides eyaculados y el total de espermatozoides normales eyaculados ($P=0,006$ y $P=0,002$ respectivamente, Figura 2): en el Día 37 ambas variables fueron mayores en el G β -NGF que en el grupo CON (respectivamente $P=0,03$ y $P=0,02$). Además, el tiempo modificó ambas variables ($P<0,0001$ para ambos casos) (Tabla 1). El total de espermatozoides motiles y el total de espermatozoides con motilidad progresiva también variaron de acuerdo a la interacción entre tratamiento y tiempo ($P=0,02$ y $P=0,01$ respectivamente) siendo en ambos casos mayor en el grupo G β -NGF que en el grupo CON el Día 23 ($P=0,04$ y $P=0,02$ respectivamente) (Figura 3).

El tratamiento y su interacción con el tiempo no modificaron las variables que serán mencionadas a continuación: porcentaje de espermatozoides normales ($P=0,8$ y $P=0,06$), porcentaje de espermatozoides con membrana funcional ($P=0,5$ y $P=0,4$), porcentaje de espermatozoides motiles ($P=0,3$ y $P=0,9$), porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva ($P=0,8$ y $P=0,2$). En todas estas variables el efecto tiempo fue significativo a excepción del porcentaje de espermatozoides normales (Tabla 1)

Tabla 1

Valores media de mínimos cuadrados y error estándar pooleado, y efecto del tratamiento (sin tratar o tratados con β -NGF), del tiempo y de la interacción entre tratamiento y tiempo, sobre la circunferencia escrotal, la concentración de testosterona, la calidad seminal y características del eyaculado de carneros tratados con cuatro dosis de 1 mg de β -NGF (G β -NGF) o grupo control (CON) no tratados durante la estación no reproductiva. *ns* hace referencia a los valores de p no significativos.

| | Tratamientos | | | P | | |
|--|--------------|----------------|-------------------------|-------------|---------|--|
| | CON | G β -NGF | Error estándar pooleado | Tratamiento | Tiempo | Interacción entre tratamiento y tiempo |
| Circunferencia escrotal (cm) | 29,7 | 29,9 | 0,84 | ns | 0,04 | ns |
| Concentración testosterona (nmol/L) | 4,0 | 4,5 | 0,8 | ns | <0,0001 | ns |
| Concentración espermática (x10 ⁹ /ml) | 1,7 | 1,6 | 0,2 | ns | 0,0002 | 0,02 |
| Volumen eyaculado (mL) | 1,6 | 1,6 | 0,2 | ns | <0,0001 | 0,004 |
| Motilidad de masa (0-5) | 3,2 | 2,9 | 0,4 | ns | 0,0004 | ns |
| Porcentajes | | | | | | |
| Espermatozoides normales | 80,3 | 81,6 | 4,5 | ns | 0,007 | 0,06 |
| Espermatozoides con membrana funcional | 81,6 | 78,7 | 1,5 | ns | <,0001 | ns |
| Espermatozoides motiles | 78,8 | 83,0 | 2,7 | ns | 0,002 | ns |
| Espermatozoides con motilidad progresiva | 49,0 | 49,4 | 1,7 | ns | <,0001 | ns |
| Total espermatozoides / eyaculado x10⁹ | | | | | | |
| Total espermatozoides | 8,0 | 9,4 | 1,8 | ns | <,0001 | 0,006 |
| Espermatozoides normales | 6,7 | 7,7 | 1,6 | ns | <,0001 | 0,002 |
| Espermatozoides con membrana funcional | 6,5 | 7,0 | 0,6 | ns | 0,0003 | 0,01 |
| Espermatozoides motiles | 5,2 | 5,6 | 1,2 | ns | 0,07 | 0,02 |
| Espermatozoides con motilidad progresiva | 3,0 | 3,4 | 0,7 | ns | 0,002 | 0,01 |

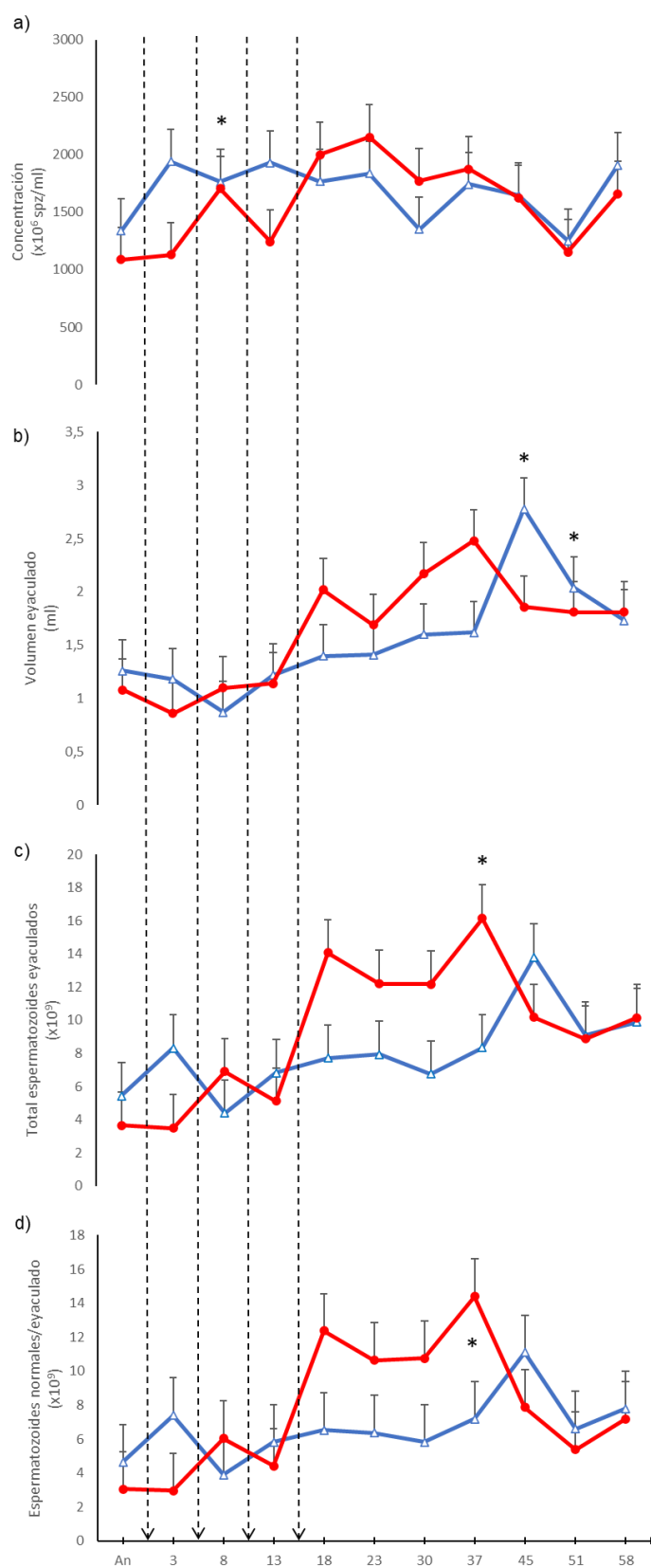


Fig. 2. Concentración espermática (a), volumen del eyaculado (b), total de espermatozoides en el eyaculado (c) y total de espermatozoides normales (d) de carneros tratados con 1 mg de β -NGF (—●—) o no tratados (—Δ—) con β -NGF. Las flechas punteadas indican cada administración de β -NGF (cuatro dosis: Días 0, 5, 10 y 15). An: antes de la administración de β -NGF. * indica diferencias significativas entre ambos grupos los días de colecta.

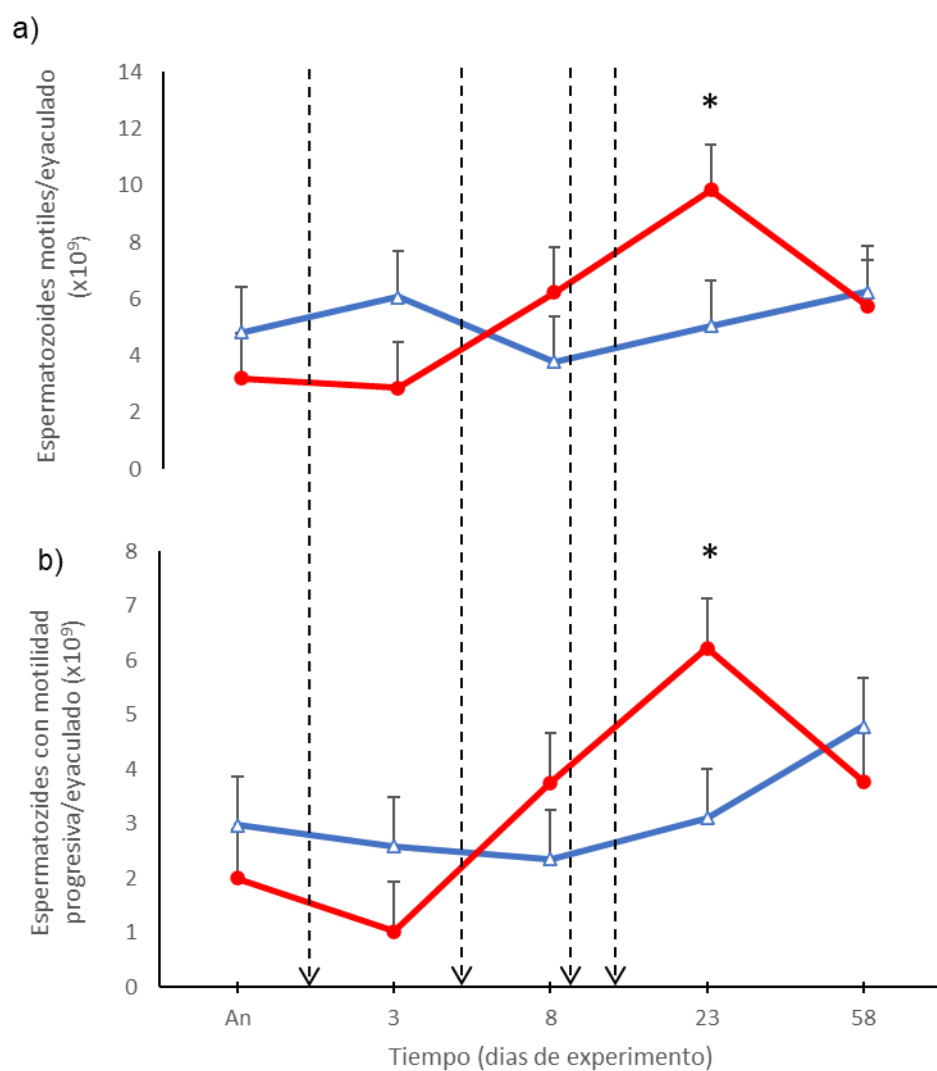


Fig. 3. Espermatozoides motiles (a) y espermatozoides con motilidad progresiva (b) de carneros tratados con 1 mg de β -NGF (-●-) o no tratados (-Δ-) con β -NGF. Las flechas punteadas indican cada administración de β -NGF (cuatro dosis: Días 0, 5, 10 y 15). An: antes de la administración de β -NGF. * indica diferencias significativas entre ambos grupos los días de colecta.

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se observó que la administración de múltiples dosis de β -NGF a carneros fuera de la temporada reproductiva indujo cambios cuantitativos significativos en el eyaculado. Aunque algunos de los resultados obtenidos son similares a los reportados en otras especies tras la administración de β -NGF exógena en experimentos in vitro (Castellini et al., 2019; Jin et al., 2010; Li et al., 2010; Shi et al., 2012), de acuerdo a nuestro conocimiento, hasta la fecha no había evidencias del efecto de β -NGF en la calidad del eyaculado en machos in vivo. Los hallazgos actuales amplían el papel del β -NGF como un mediador relevante en la mejora de varios aspectos de la calidad seminal y características del eyaculado.

La administración de β -NGF no modificó las concentraciones plasmáticas de testosterona en ningún momento del periodo experimental. Más aún, durante todo el periodo de administración se midieron en forma diaria sin registrar ningún tipo de efecto por esta vía. En camélidos, la administración intramuscular de β -NGF provocó un incremento leve en los niveles de testosterona, a pesar de haber inducido un aumento de hasta seis veces en las concentraciones plasmáticas de LH, superando incluso la respuesta observada tras la administración de GnRH (Carrasco et al., 2021). En dicho experimento no se evidenciaron cambios en los niveles de testosterona del grupo tratado con β -NGF y si una disminución en el grupo control. Las células de Leydig adultas son las responsables de la producción de testosterona en el testículo, a partir de la estimulación de LH. Estas células derivan de células madre de Leydig y atraviesan cuatro etapas de diferenciación: células madre, progenitoras, inmaduras y adultas (Chen et al., 2009). El β -NGF ha demostrado desempeñar un papel importante en la regulación del desarrollo de estas células, promoviendo la proliferación y diferenciación de estadios inmaduros (Zhang et al., 2013). Además, en especies como la rata (Li et al., 2005), el humano (Müller et al., 2006) y el conejo (Maranesi et al., 2015), se ha evidenciado la expresión de receptores de β -NGF en células de Leydig adultas, lo que sugiere una posible acción directa del factor sobre la esteroidogénesis. No obstante, el único estudio disponible en carneros hasta la fecha indica que la expresión de β -NGF y su receptor TrkA es marcadamente baja en el testículo, sin evidencias de su localización en células de Leydig (Mercati et al., 2024), lo que pone en duda un posible efecto directo en esta especie. En cualquier caso, este resultado es importante para interpretar los cambios seminales, dado que los mismos se deberían haber producido por alguna vía independiente de la acción de la testosterona.

De haber existido un efecto exclusivamente sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, este se habría manifestado recién en la última colecta (Día 58), dado que la activación hormonal tradicional estimula principalmente la espermatogénesis completa. La testosterona es indispensable para al menos cuatro procesos clave durante la espermatogénesis: el mantenimiento de la barrera hematotesticular, la progresión meiótica, la adhesión entre células de Sertoli y espermátidas, y la liberación de los espermatozoides. En ausencia de señalización androgénica, la espermatogénesis se

detiene en la meiosis, con escaso desarrollo de células germinales hasta el estadio de espermátidas haploides y sin formación de espermátidas elongadas (Smith & Walker, 2014). Sin embargo, en este experimento los efectos positivos sobre las variables seminales se evidenciaron desde el Día 37, anticipándose al tiempo esperado si sólo dependieran de cambios sistémicos en testosterona. Este adelanto sugiere que el impacto observado en las características del eyaculado fue independiente de modificaciones significativas en los niveles plasmáticos de testosterona, lo que coincide con estudios previos donde la administración exógena de β -NGF no alteró estas concentraciones (Carrasco et al., 2021). En este contexto, es posible que la administración de β -NGF haya ejercido un efecto local directo, ya sea a nivel testicular o epididimario.

Cabe destacar que, de todas las variables analizadas, los efectos detectados fueron en aquellas referidas a totales de espermatozoides y no a proporciones. Es decir que, si bien la calidad seminal se mantuvo estable, aumentó la cantidad de espermatozoides por eyaculado. Esta observación permite plantear un posible efecto del β -NGF sobre las células germinales, estimulando su proliferación mitótica o la supervivencia celular a lo largo del proceso espermatogénico. Por un lado, Onoda et al. (1991) demostraron que la actividad mitogénica de las células germinales se reduce significativamente al bloquear el factor de crecimiento nervioso mediante un anticuerpo específico, lo que sugiere un rol importante del β -NGF en la regulación del desarrollo germinal. Además, la presencia de receptores para β -NGF en células germinales de carneros ha sido confirmada recientemente (Mercati et al., 2024), lo que refuerza la hipótesis de una acción directa sobre la línea germinal. Por otro lado, no puede descartarse que los efectos del β -NGF sobre la espermatogénesis se ejerzan de manera indirecta, a través de su acción sobre las células de Sertoli. Se ha demostrado que estas células cumplen múltiples funciones esenciales en el proceso espermatogénico, como el soporte y la nutrición de las células germinales en desarrollo, la compartimentalización del túbulo seminífero mediante uniones estrechas que generan un ambiente protegido y especializado, la liberación de espermátidas tardías hacia la luz tubular y la secreción de fluido, proteínas y factores de crecimiento (França et al., 2004). En cabras, las células de sertoli demostraron ser susceptibles al tratamiento con β -NGF generando un aumento en la viabilidad, proliferación y el contenido de ATP, además de reducir su apoptosis (Lv et al., 2022b). Por lo tanto, es posible plantear un efecto similar en carneros, apoyando la hipótesis de que el β -NGF actúe como modulador indirecto de la espermatogénesis mediante su influencia sobre las células de Sertoli.

Considerando que el ciclo completo de la espermatogénesis en carneros dura aproximadamente 47 días (Ortavant, 1958), la aparición de efectos significativos desde el día 37 sugiere que NGF pudo estar modulando etapas avanzadas de la espermatogénesis, aumentando la tasa de supervivencia de las células espermatogénicas, además de que podría intervenir durante la maduración epididimaria, procesos críticos para la funcionalidad y morfología del espermatozoide.

hecho, se ha demostrado que el epidídimo es un órgano muy sensible a factores locales y hormonales, que pueden influir directamente en la maduración espermática (Sullivan & Mieusset, 2016). Esta interpretación adquiere mayor validez al observar que se incrementó el número de espermatozoides móviles y con motilidad progresiva en el grupo tratado con β -NGF en comparación con el grupo control. Es posible que la acción del β -NGF exógeno potencie este proceso, ya sea mediante un efecto local sobre el epitelio epididimario o mediante una acción directa sobre los espermatozoides. De hecho, Mercati et al. (2024) demostraron la presencia tanto del β -NGF como de sus receptores TrkA y p75NTR en las tres regiones del epidídimo del carnero —cabeza, cuerpo y cola—, órgano donde los espermatozoides adquieren su competencia funcional, incluida la capacidad de movimiento progresivo. Durante su tránsito epididimario, los espermatozoides experimentan una progresiva modificación en el patrón de movimiento: inicialmente presentan una asimetría en el batido del flagelo en la región proximal, que evoluciona hacia una propagación simétrica de ondas a lo largo del flagelo en las regiones más distales, lo cual permite el establecimiento de la motilidad progresiva (Dacheux & Dacheux, 2013). Además, Stabile et al. (2023) demostraron la presencia de los receptores de β -NGF en la cola de espermatozoides maduros humanos, sugiriendo un posible papel directo del β -NGF en la regulación de la funcionalidad flagelar. Posteriormente esta localización específica se determinó en carneros, concretamente los receptores TrkA se encontraron en cabeza y cola de espermatozoides (Meilán et al., 2025), lo que podría explicar al menos parcialmente el efecto positivo observado en la motilidad espermática en el presente estudio.

Sin embargo, también debe considerarse que el aumento en el número total de espermatozoides podría deberse a una mayor eficiencia en el transporte epididimario, lo que favorecería una liberación más eficiente del contenido almacenado, sin implicar necesariamente un incremento en la tasa de producción espermatogénica. En este sentido, estudios han señalado que el epidídimo no solo participa en la maduración de los espermatozoides, sino que también regula su liberación y concentración (Sullivan & Mieusset, 2016). La maduración de los espermatozoides ocurre en la cabeza y el cuerpo del epidídimo, y requiere entre 2 y 5 días, tiempo suficiente para que los espermatozoides adquieran su potencial fertilizante (França et al., 2005). Luego, los espermatozoides son mantenidos, almacenados y transportados a través en la cola epididimaria durante un período de 6 a 14 días (Amann et al., 1993). Por lo tanto, sería importante en futuros estudios incorporar análisis histológicos de las diferentes regiones epididimarias para esclarecer los efectos del β -NGF en dicho órgano.

Se observó un mayor porcentaje de espermatozoides eyaculados con morfología normal en el grupo tratado con β -NGF en comparación con el grupo control. Este hallazgo sugiere que el β -NGF podría favorecer la mejora en la calidad morfológica del eyaculado, posiblemente a través de un mecanismo selectivo. Una de las hipótesis que se plantea es que el β -NGF induce la eliminación de espermatozoides

defectuosos mediante la activación del receptor p75NTR, cuya expresión se ha asociado con procesos apoptóticos. En este sentido, Stabile et al. (2023) reportaron niveles elevados de ARNm de p75NTR en muestras de semen humano clasificadas como infértiles, lo que sugiere una posible relación entre este receptor y la calidad espermática. Asimismo, Li et al. (2010) demostraron que la adición de β -NGF a muestras de semen bovino in vitro incrementó significativamente el porcentaje de espermatozoides que presentan apoptosis tardía. Estos antecedentes respaldan la posibilidad de que el β -NGF pueda contribuir a la eliminación de espermatozoides anómalos, favoreciendo así una población espermática con menor presencia de anomalías. En este sentido, diversos estudios en toros y carneros han evidenciado una correlación positiva entre la morfología espermática normal y la fertilidad, mientras que ciertas alteraciones, especialmente en la forma de la cabeza, se han asociado negativamente con la capacidad fecundante del macho (Makhzoomi et al., 2008; Martínez-Rodríguez et al., 2015, Phillips et al., 2004;). Esto abre interesantes posibilidades para testar la capacidad fertilizante de estos espermatozoides.

Se observaron incrementos significativos en el volumen del eyaculado en el grupo tratado con β -NGF, lo cual refuerza la hipótesis de una estimulación directa del factor sobre la secreción de las glándulas accesorias. El plasma seminal resulta de la secreción combinada de los testículos, epidídimos y glándulas accesorias, aunque estudios en carneros han demostrado que aproximadamente el 90% del fluido proveniente de la rete testis es reabsorbido antes de llegar a la cabeza epididimaria (Veeramachaneni et al., 1990), lo que confirma que testículos y epidídimos aportan escaso volumen al eyaculado final. En consecuencia, se reconoce que la mayor parte del plasma seminal deriva de las glándulas accesorias, cuyas secreciones inducen una reducción significativa del contenido proteico espermático y permiten la incorporación de proteínas específicas que modulan su funcionalidad (Pini et al., 2016). La importancia de estas glándulas se ve reforzada por estudios como el de Faulkner et al. (1968), quienes demostraron que la vesiculectomía en toros conlleva una disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles, normales y viables, características coincidentes con las mejoradas en el grupo tratado con β -NGF en el presente experimento. En carneros, se ha descrito que existe una alta expresión de los receptores de β -NGF en las vesículas seminales, seguidas por la próstata, las ampollas del conducto deferente y la glándula bulbouretral (Mercati et al., 2024), lo cual, junto con la evidencia de que estas glándulas son responsables del volumen y la provisión de nutrientes esenciales al plasma seminal (Fernández-Fuertes, 2023), permite suponer que el β -NGF podría actuar mejorando la funcionalidad del medio espermático a través de su acción directa sobre estas estructuras.

En el presente estudio se utilizó una dosis de 1 mg de β -NGF por aplicación, lo cual permitió detectar efectos positivos sobre características del eyaculado. No obstante, estos resultados abren interrogantes sobre la existencia de un posible efecto dosis-dependiente o un efecto acumulativo. Los cambios fisiológicos se manifestaron

significativamente a partir de la cuarta aplicación, con aumentos tanto en el número total de espermatozoides eyaculados como en el total de formas morfológicamente normales. Este patrón de respuesta permite postular dos mecanismos no excluyentes: por un lado, que el β -NGF ejerza un efecto acumulativo, en el cual la exposición repetida induce una respuesta progresiva en el tejido testicular y/o en las glándulas accesorias. Por otro lado, es posible que la dosis utilizada haya sido suficiente para inducir cambios biológicos relevantes, pero que requiere un tiempo sostenido de acción para generar respuestas observables. Futuras investigaciones podrían incluir la evaluación de distintos esquemas de dosificación, tanto en frecuencia como en cantidad administrada, y analizar los efectos locales del β -NGF sobre el testículo y el epidídimo así como su impacto sobre la secreción de LH y otros ejes hormonales aún no evaluados, con el fin de comprender mejor la naturaleza temporal y acumulativa de su acción. En línea con estos resultados, otros estudios han documentado una respuesta biológica al β -NGF dependiente de la dosis administrada (Jin et al., 2010; Stuart et al., 2014; Tanco et al., 2011), lo que subraya la necesidad de explorar diferentes concentraciones y esquemas de aplicación para comprender mejor su mecanismo de acción. Asimismo, sería de gran interés profundizar en el análisis histológico testicular y epididimario para determinar si los efectos observados responden a una mayor eficiencia espermatogénica, a una mejora en la maduración y transporte epididimario, o a ambos procesos.

9. CONCLUSIONES

La administración intramuscular de β -NGF a carneros Corriedale fuera de la estación reproductiva aumentó significativamente la cantidad total de espermatozoides por eyaculado, incluyendo los normales, motiles y con motilidad progresiva, así como el volumen del eyaculado. Sin embargo, para registrar estos efectos tuvieron que darse cuatro dosis de β -NGF, por lo que es posible que los efectos dependan de una administración repetida. Estos efectos no fueron mediados por la testosterona dado que no se modificó su concentración. Estos resultados abren interesantes posibilidades para la utilización práctica del β -NGF en manejos andrológicos en animales de producción.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril-Sánchez, S., Freitas-de-Melo, A., Beracochea, F., Damián, J., Giriboni, J., Santiago-Moreno, J., & Ungerfeld, R. (2017). Sperm collection by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands is less stressful than electroejaculation without altering sperm characteristics in conscious goat bucks. *Theriogenology*, 98, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.05.006>
- Adams, G. P., & Ratto, M. H. (2012). Ovulation-inducing factor in seminal plasma: A review. *Animal Reproduction Science*, 136(3), 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.004>
- Adams, G. P., Ratto, M. H., Huanca, W., & Singh, J. (2005). Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biology of Reproduction*, 73(3), 452–457. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.040097>
- Amann, R. P., Hammerstedt, R. H., & Veeramachaneni, D. N. R. (1993). The epididymis and sperm maturation: A perspective. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(4), 361–381. <https://doi.org/10.1071/RD9930361>
- Angeletti, R. H., & Bradshaw, R. A. (1971). Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: Amino acid sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(10), 2417–2420. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.10.2417>
- Barboni, B., Mattioli, M., Gioia, L., Turriani, M., Capacchietti, G., Berardinelli, P., & Bernabò, N. (2002). Preovulatory rise of NGF in ovine follicular fluid: Possible involvement in the control of oocyte maturation. *Microscopy Research and Technique*, 59(6), 516–521. <https://doi.org/10.1002/jemt.10230>
- Beracochea, F., Manes, J., Viera, M. N., Santiago-Moreno, J., & Ungerfeld, R. (2020). Administration of equine chorionic gonadotrophin (eCG) to rams to improve the reproductive performance during the non-breeding season. *Livestock Science*, 240, 104125. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104125>
- Beracochea, F., Viera, M. N., Acevedo, L., Santiago-Moreno, J., & Ungerfeld, R. (2018). Equine chorionic gonadotropin (eCG) improves bucks' semen quality during the nonbreeding season. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(5), 1096–1102. <https://doi.org/10.1111/rda.13235>
- Berndtson, W. E., & Gabel, S. (1988). Spermatogenesis and epididymal maturation in the ram. En *Reproduction in Domestic Animals* (pp. 241–254). Academic Press.
- Bielli, A., Pedrana, G., Gastel, M. T., Castrillejo, A., Moraña, A., Lundeheim, N., Forsberg, G., & Rodríguez-Martínez, H. (1999). Influence of grazing management on the seasonal change in testicular morphology in Corriedale rams. *Animal Reproduction Science*, 56(2), 93–105. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00060-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00060-2)
- Bogle, O. A., Carrasco, R. A., Ratto, M. H., Singh, J., & Adams, G. P. (2018). Source and localization of ovulation-inducing factor/nerve growth factor in male reproductive

- tissues among mammalian species. *Biology of Reproduction*, 99(6), 1194–1204. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy111>
- Bogle, O. A., Ratto, M. H., & Adams, G. P. (2011). Evidence for the conservation of biological activity of ovulation-inducing factor in seminal plasma. *Reproduction*, 142(2), 277–283. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0157>
- Bogle, O. A., Ratto, M. H., & Adams, G. P. (2012). Ovulation-inducing factor (OIF) induces LH secretion from pituitary cells. *Animal Reproduction Science*, 133(1–2), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.06.003>
- Bottino, J. (2020). *Efecto de la cópula y el factor de crecimiento neurológico β sobre la fase folicular y ovulación en ovejas* [Tesis de maestría, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República]. Colibrí. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/29089>
- Bottino, J. P., Pérez-Clariget, R., Rodriguez, M. G. K., Ratto, M., & Ungerfeld, R. (2021). Multiple matings modify the estrous length, the moment of ovulation, and the estradiol and LH patterns in ewes. *Animal Reproduction*, 18(3), e20210045. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021-0045>
- Bravo, P. W. (1994). Reproductive endocrinology of llamas and alpacas. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 10(2), 265–273. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30598-5](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30598-5)
- Bravo, P. W. (2002). *The reproductive process of South American camelids*. University of Utah.
- Bravo, P. W., Fowler, M. E., Stabenfeldt, G. H., & Lasley, B. (1990). Endocrine responses in the llama to copulation. *Theriogenology*, 33(4), 891–899. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(90\)90552-K](https://doi.org/10.1016/0093-691X(90)90552-K)
- Carrasco, R. A., Pezo, S., & Adams, G. P. (2021). Evidence for the LH-releasing pathway of seminal plasma NGF in male camelids. *Theriogenology*, 164, 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.01.007>
- Carrasco, R. A., Singh, J., & Adams, G. P. (2016). The dynamics of trkA expression in the bovine ovary are associated with a luteotrophic effect of ovulation-inducing factor/nerve growth factor (OIF/NGF). *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0183-5>
- Carrasco, R. A., Singh, J., Ratto, M. H., & Adams, G. P. (2020). Neuroanatomical basis of the nerve growth factor ovulation–induction pathway in llamas. *Biology of Reproduction*, 104(3), 578–588. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz222>
- Castellini, C., Mattioli, S., Di Bosco, A., Collodel, G., Pistilli, A., Stabile, A. M., Macchioni, L., Mancuso, F., Luca, G., & Rende, M. (2019). In vitro effect of nerve growth factor on the main traits of rabbit sperm. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0536-z>

- Chalmel, F., Com, E., Lavigne, R., Hernio, N., Teixeira-Gomes, A., Dacheux, J., & Pineau, C. (2014). An integrative omics strategy to assess the germ cell secretome and to decipher Sertoli-germ cell crosstalk in the mammalian testis. *PLoS ONE*, 9(8), e104418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104418>
- Chen, H., Ge, R., & Zirkin, B. R. (2009). Leydig cells: From stem cells to aging. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 306(1–2), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.01.023>
- Cheng, C. Y., Wong, E. W., Yan, H. H., & Mruk, D. D. (2009). Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: New insights and advances. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 315(1–2), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.08.004>
- Concannon, P., Hodgson, B., & Lein, D. (1980). Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulations. *Biology of Reproduction*, 23(1), 111–117. <https://doi.org/10.1095/biolreprod23.1.111>
- Crispo, M., Santos-Neto, P. C. D., Vilariño, M., Mulet, A. P., De León, A., Barbeito, L., & Menchaca, A. (2016). Rapid communication: Nerve growth factor influences cleavage rate and embryo development in sheep. *Journal of Animal Science*, 94(10), 4447–4451. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0756>
- D'Occhio, M. J., & Suttie, J. M. (1992). The role of pineal gland and melatonin in reproduction in male domestic ruminants. *Animal Reproduction Science*, 30(1–3), 135–155. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(92\)90123-Y](https://doi.org/10.1016/0378-4320(92)90123-Y)
- Dacheux, J.-L., & Dacheux, F. (2013). New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*, 147(2), R27–R42. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0420>
- Dissen, G. A., Hill, D. F., Costa, M. E., Dees, C. W. L., Lara, H. E., & Ojeda, S. R. (1996). A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. *Endocrinology*, 137(1), 198–209. <https://doi.org/10.1210/endo.137.1.8536639>
- Druart, X., Rickard, J., Mactier, S., Kohnke, P., Kershaw-Young, C., Bathgate, R., Gibb, Z., Crossett, B., Tsikis, G., Labas, V., Harichaux, G., Grupen, C., & de Graaf, S. (2013). Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *Journal of Proteomics*, 91, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.031>
- Evans, G., & Robinson, T. J. (1980). Reproductive potential and endocrinological responses of sheep kept under controlled lighting. II. Pituitary and gonadal responses of ewes and rams to six-monthly light cycle. *Animal Reproduction Science*, 3(1), 39–56. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(80\)90060-1](https://doi.org/10.1016/0378-4320(80)90060-1)
- Fernandez-Baca, S., Madden, D. H. L., & Novoa, C. (1970). Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. *Reproduction*, 22(2), 261–267. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0220261>
- Fernandez-Fuertes, B. (2023). Review: The role of male reproductive tract secretions in ruminant fertility. *Animal*, 17, 100773. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100773>

- Ferraguti, G., Fanfarillo, F., Tarani, L., Blaconà, G., Tarani, F., Barbato, C., Minni, A., Ralli, M., Francati, S., Greco, A., Petrella, C., & Fiore, M. (2022). NGF and the male reproductive system: Potential clinical applications in infertility. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13127. <https://doi.org/10.3390/ijms232113127>
- Forcada Miranda, F., Abecia Martínez, A., Casao Gascón, A., & Vázquez, I. (2009, March). *Interacciones ambientales sobre la reproducción en ovino* [Ponencia] 2^{do} Congreso Internacional en Ciencias Veterinarias y Zootecnia, Universidad de Zaragoza.
- Fournier-Delpech, S., Colas, G., Courot, M., Ortavant, R., Brice, G., Cornu, C., Guérin, Y., & Lebreton, Y. (1979). Epididymal sperm maturation in the ram: Motility, fertilizing ability and embryonic survival after uterine artificial insemination in the ewe. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, 19(3A), 597–605. <https://doi.org/10.1051/rnd:19790505>
- França, L. R., Avelar, G. F., & Almeida, F. F. (2004). Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, 63(2), 300–318.
- França, L. R., Hess, R. A., Dufour, J. M., Hofmann, M. C., & Griswold, M. D. (2016). The Sertoli cell: One hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*, 4(2), 189–212. <https://doi.org/10.1111/andr.12165>
- Gajardo, G., Ulloa-Leal, C., Valderrama, X., Paiva, L., & Ratto, M. (2021). Heterologous beta-nerve growth factor (β -NGF) given at the LH surge enhances luteal function in dairy heifers. *Domestic Animal Endocrinology*, 77, 106645.
- Garcia-Garcia, R. M., Del Mar Masdeu, M., Rodriguez, A. S., Millan, P., Arias-Alvarez, M., Sakr, O. G., Bautista, J. M., Castellini, C., Lorenzo, P. L., & Rebollar, P. G. (2017). β -nerve growth factor identification in male rabbit genital tract and seminal plasma and its role in ovulation induction in rabbit does. *Italian Journal of Animal Science*, 17(2), 442–453. <https://doi.org/10.1080/1828051x.2017.1382315>
- Gastel, M. T., Bielli, A., Pérez, R., López, A., Castrillejo, A., Tagle, R., Franco, J., Laborde, D., Forsberg, M., & Rodriguez-Martinez, H. (1995). Seasonal variations in testicular morphology in Uruguayan Corriedale rams. *Animal Reproduction Science*, 40(1-2), 59-75
- Gordon, I. (1997). *Controlled reproduction in sheep and goats*. CAB International.
- Guerrero-Gutiérrez, M., Ungerfeld, R., Kako Rodriguez, M. G., Santiago-Moreno, J., & Giriboni, J. (2021). Using transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands for buck semen collection yields semen with greater cryoresistance than electroejaculation alone during the breeding season. *Theriogenology*, 172, 142–149.
- Gundoğan, M., & Demirci, E. (2003). Monthly changes in some reproductive parameters and in testosterone and thyroxine values of rams throughout one year under continental climate conditions. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 110(11), 450–453.

- Hafez, E. S. E. (1952). Studies on the breeding season and reproduction of the ewe. *The Journal of Agricultural Science*, 42, 13–265.
- Hofmann, H., & Unsicker, K. (1982). The seminal vesicle of the bull. *European Journal of Biochemistry*, 128(2–3), 421–426.
- Jeyendran, R. S., Van Der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction*, 70(1), 219–228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>
- Jin, W., Tanaka, A., Watanabe, G., Matsuda, H., & Taya, K. (2010). Effect of NGF on the motility and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development*, 56(4), 437–443. <https://doi.org/10.1262/jrd.09-219n>
- Jones, E. E., Bain, J. B., & Odell, W. D. (1976). Postcoital luteinizing hormone release in male and female rabbits as determined by radioimmunoassay. *Fertility and Sterility*, 27(7), 848–852.
- Julio-Pieper, M., Lara, H. E., Bravo, J. A., & Romero, C. (2006). Effects of nerve growth factor (NGF) on blood vessels area and expression of the angiogenic factors VEGF and TGF-beta1 in the rat ovary. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4(1), 1–9.
- Levi-Montalcini, R., & Angeletti, P. U. (1968). Nerve growth factor. *Physiological Reviews*, 48(3), 534–569.
- Li, C., Sun, Y., Yi, K., Ma, Y., Sun, Y., Zhang, W., & Zhou, X. (2010). Detection of nerve growth factor (NGF) and its specific receptor (TrkA) in ejaculated bovine sperm, and the effects of NGF on sperm function. *Theriogenology*, 74(9), 1615–1622. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.033>
- Li, C., Watanabe, G., Weng, Q., Jin, W., Furuta, C., Suzuki, A. K., Kawaguchi, M., & Taya, K. (2005). Expression of nerve growth factor (NGF), and its receptors TrkA and p75 in the reproductive organs of the adult male rats. *Zoological Science*, 22(8), 933–937. <https://doi.org/10.2108/zsj.22.933>
- Li, C., Zheng, L., Wang, C., & Zhou, X. (2010). Absence of nerve growth factor and comparison of tyrosine kinase receptor A levels in mature spermatozoa from oligoasthenozoospermic, asthenozoospermic and fertile men. *Clinica Chimica Acta*, 411(19–20), 1482–1486. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.06.002>
- Lincoln, G. A. (1976). Secretion of LH in rams exposed to two different photoperiods. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47(2), 351–353.
- Lincoln, G. A. (1977). Changes in pituitary responsiveness to luteinizing hormone releasing hormone in rams exposed to artificial photoperiod. *Journal of Endocrinology*, 73(3), 519–527.
- Lincoln, G. A. (1978). The temporal relationship between plasma levels of FSH and LH in the ram. *Journal of Reproduction and Fertility*, 53(1), 31–37.

- Lincoln, G. A. (1984). Central effect of photoperiod on reproduction in the ram revealed by the use of a testosterone clamp. *Journal of Endocrinology*, 103(2), 233–241.
- Lincoln, G. A., & Short, R. V. (1980). Seasonal breeding: Nature's contraceptive. *Recent Progress in Hormone Research*, 36, 1–52.
- López, A., Regueiro, M., Castrillejo, A., & Pérez-Clariget, R. (2011). La época del año y el plano nutricional y su influencia sobre la morfología espermática en carneros Corriedale en pastoreo. *Veterinaria (Montevideo)*, 47(182), 15–21. <https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/182>
- Luo, J., Yang, Y., Zhang, T., Su, Z., Yu, D., Lin, Q., Chen, H., Zhang, Q., Xiang, Q., Xue, W., Ge, R., & Huang, Y. (2018). Nasal delivery of nerve growth factor rescues hypogonadism by up-regulating GnRH and testosterone in aging male mice. *EBioMedicine*, 35, 295–306.
- Lv, D., Zhao, M., Ni, J., Liu, W., Ren, Y., Zhu, D., & Hu, J. (2022b). NGF regulates Sertoli cell growth and prevents LPS-induced junction protein damage via PI3K/AKT/NFκB signaling. *Theriogenology*, 195, 138–148.
- Makhzoomi, A. K. A., Lundeheim, N., Håård, M., & Rodríguez-Martínez, H. (2008). Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. *Theriogenology*, 70(4), 682–691. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.049>
- Malpoux, B., Chemineau, P., & Pelletier, J. (1993). Melatonin and reproduction in sheep and goat. In H. S. Yu & R. J. Reiter (Eds.), *Melatonin: Biosynthesis, physiological effects and clinical application* (pp. 253–287). CRS Press.
- Maranesi, M., Zerani, M., Leonardi, L., Pistilli, A., Arruda-Alencar, J., Stabile, A., Rende, M., Castellini, C., Petrucci, L., Parillo, F., Moura, A., & Boiti, C. (2015). Gene expression and localization of NGF and its cognate receptors NTRK1 and NGFR in the sex organs of male rabbits. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(6), 918–925.
- Martínez-Rodríguez, C., Alvarez, M., López-Urueña, E., Gomes-Alves, S., Anel-López, L., Tizado, J. E., Anel, L., & De Paz, P. (2015). Head morphology of ram spermatozoa is associated with their ability to migrate in vitro and correlates with fertility. *Reproduction Fertility and Development*, 28(11), 1825. <https://doi.org/10.1071/rd15022>
- Mercati, F., Guelfi, G., Martí, J. I., Dall'Aglio, C., Calleja, L., Caivano, D., Marenzoni, M. L., Capaccia, C., Anipchenko, P., Palermo, F. A., Cocci, P., Rende, M., Zerani, M., & Maranesi, M. (2024). Seasonal variation of NGF in seminal plasma and expression of NGF and its cognate receptors NTRK1 and p75NTR in the sex organs of rams. *Domestic Animal Endocrinology*, 89, 106877.
- Müller, D., Davidoff, M. S., Bargheer, O., Paust, H.-J., Pusch, W., Koeva, Y., Ježek, D., Holstein, A. F., & Middendorff, R. (2006). The expression of neurotrophins and their receptors in the prenatal and adult human testis: Evidence for functions in Leydig cells. *Histochemistry and Cell Biology*, 126(2), 199–211.

- Nishimura, H., & L'Hernault, S. W. (2017). Spermatogenesis. *Current Biology*, 27(18), R988–R994.
- Oduwole, O. O., Peltoketo, H., & Huhtaniemi, I. T. (2018). Role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis. *Frontiers in Endocrinology*, 9, Article 1.
- Onoda, M., Pflug, B., & Djakiew, D. (1991b). Germ cell mitogenic activity is associated with nerve growth factor-like protein(s). *Journal of Cellular Physiology*, 149(3), 536–543. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041490324>
- Ortavant, R. (1958). *Le cycle spermatogénétique chez le bélier* [Tesis doctoral inédita]. University of Paris.
- Parthipan, S., Selvaraju, S., Somashekar, L., Arangasamy, A., Sivaram, M., & Ravindra, J. P. (2017). Spermatozoal transcripts expression levels are predictive of semen quality and conception rate in bulls (*Bos taurus*). *Theriogenology*, 98, 41–49.
- Patterson, J. C., & Childs, G. V. (1994). Nerve growth factor and its receptor in the anterior pituitary. *Endocrinology*, 135(4), 1689–1696.
- Pelletier, J., & Ortavant, R. (1975). Photoperiodic control of LH release in the ram. *European Journal of Endocrinology*, 78(3), 435–441. <https://doi.org/10.1530/acta.0.0780435>
- Pérez-Clariget, R., Forsberg, M., López, A., & Castrillejo, A. (1998a). Effects of nutrition on seasonal changes in scrotal circumference, testosterone and pituitary responsiveness to exogenous GnRH in Corriedale rams. *Small Ruminant Research*, 29, 61–69.
- Pérez-Clariget, R., Forsberg, M., Rodríguez-Martínez, H. (1998b). Seasonal variation in live weight, testes size, testosterone, LH secretion, melatonin and thyroxine in Merino and Corriedale rams in a subtropical climate. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 39, 33–47.
- Pérez-Clariget, R., López, A., Castrillejo, A., Bielli, A., Gastel, T., Laborde, D., Tagle, R., Queirolo, D., Franco, J., Forsberg, M., & Rodríguez-Martínez, H. (1997a). Reproductive seasonality of Corriedale rams under extensive rearing conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 38, 109–117.
- Perkins, A., Fitzgerald, J. A., & Price, E. O. (1992). Luteinizing hormone and testosterone response of sexually active and inactive rams. *Journal of Animal Science*, 70(7), 2086–2093. <https://doi.org/10.2527/1992.7072086x>
- Phillips, N., McGowan, J., Johnston, S., & Mayer, D. (2003). Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. *Animal Reproduction Science*, 81(1–2), 47–61. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.10.003>
- Pineau, C., Syed, V., Bardin, C. W., Jégou, B., & Cheng, C. Y. (1993). Germ cell-conditioned medium contains multiple factors that modulate the secretion of testins, clusterin, and transferrin by Sertoli cells. *Andrology*, 14(2), 88–98.

- Ratto, M. H., Delbaere, L. T., Leduc, Y. A., Pierson, R. A., & Adams, G. P. (2011). Biochemical isolation and purification of ovulation-inducing factor (OIF) in seminal plasma of llamas. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9(1), 24.
- Ratto, M. H., Huanca, W., Singh, J., & Adams, G. P. (2005). Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1), 29.
- Ratto, M. H., Huanca, W., Singh, J., & Adams, G. P. (2006). Comparison of the effect of ovulation-inducing factor (OIF) in the seminal plasma of llamas, alpacas, and bulls. *Theriogenology*, 66(5), 1102–1106.
- Ratto, M. H., Leduc, Y. A., Valderrama, X. P., Van Straaten, K. E., Delbaere, L. T. J., Pierson, R. A., & Adams, G. P. (2012). The nerve of ovulation-inducing factor in semen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(37), 15042–15047.
- Robaire, B., Hinton, B., & Orgebinchrist, M. (2006). The epididymis. En J. D. Neill (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (3^a ed., Vol. 1, pp. 1071–1148). Elsevier.
- Rocco, M. L., Soligo, M., Manni, L., & Aloe, L. (2018). Nerve growth factor: Early studies and recent clinical trials. *Current Neuropharmacology*, 16(10), 1455–1465.
- Saeednia, S., Bahadoran, H., Amidi, F., Asadi, M. H., Najji, M., Fallahi, P., & Nejad, N. A. (2015). Nerve growth factor in human semen: Effect of nerve growth factor on the normozoospermic men during cryopreservation process. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 18(3), 292–299.
- Salas, C., Julio-Pieper, M., Valladares, M., Pommer, R., Vega, M., Mastronardi, C., Kerr, B., Ojeda, S. R., Lara, H. E., & Romero, C. (2006). Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(6), 2396–2403. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1925>
- Sari, L. M., Zampini, R., Argañaraz, M. E., Carretero, M. I., Fumuso, F. G., Barraza, D. E., Ratto, M., & Apichela, S. A. (2018). Expression of β -NGF and high-affinity NGF receptor (TrKA) in llama (*Lama glama*) male reproductive tract and spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 85(12), 934-944.
- Seidl, K., Buchberger, A., & Erck, C. (1996). Expression of nerve growth factor and neurotrophin receptors in testicular cells suggest novel roles for neurotrophins outside the nervous system. *Reproduction Fertility and Development*, 8(7), 1075- 1087.
- Setchell, B. P. (1991). Male reproductive organs and semen. En P. T. Cupps (Ed.), *Reproduction in Domestic Animals* (pp. 221–249). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-057109-6.50011-2>
- Shi, C., Lin, K., Xu, X., Zhang, S., Wang, N., & Fan, M. (2012). Evidence for the involvement of NGF in human sperm motility. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 5(9), 534–541. <https://doi.org/10.4236/jbise.2012.59066>

- Silva, M., Niño, A., Guerra, M., Letelier, C., Valderrama, X., Adams, G., & Ratto, M. (2011). Is an ovulation-inducing factor (OIF) present in the seminal plasma of rabbits? *Animal Reproduction Science*, 127(3–4), 213–221.
- Silva, M., Paiva, L., & Ratto, M. H. (2020). Ovulation mechanism in South American camelids: The active role of β -NGF as the chemical signal eliciting ovulation in llamas and alpacas. *Theriogenology*, 150, 280–287.
- Silva, M., Recabarren, M., Recabarren, S., Adams, G., & Ratto, M. (2012). Ovarian estradiol modulates the stimulatory effect of ovulation-inducing factor (OIF) on pituitary LH secretion in llamas. *Theriogenology*, 77(9), 1873–1882.
- Smith, L. B., & Walker, W. H. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 30, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.02.012>
- Sofikitis, N., Giotitsas, N., Tsounapi, P., Baltogiannis, D., Giannakis, D., & Pardalidis, N. (2008). Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 109(3–5), 323–330.
- Squillacioti, C., De Luca, A., Paino, S., Langella, E., & Mirabella, N. (2009). Effects of castration on the expression of the NGF and TrkA in the vas deferens and accessory male genital glands of the rat. *European Journal of Histochemistry*, 53(4), 29. <https://doi.org/10.4081/ejh.2009.e29>
- Stabile, A. M., Pistilli, A., Moretti, E., Bartolini, D., Ruggirello, M., Rende, M., Castellini, C., Mattioli, S., Ponchia, R., Tripodi, S. A., & Collodel, G. (2023). A possible role for nerve growth factor and its receptors in human sperm pathology. *Biomedicines*, 11(12), 3345. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11123345>
- Stuart, C. C., Vaughan, J. L., Kershaw-Young, C. M., Wilkinson, J., Bathgate, R., & De Graaf, S. P. (2014). Effects of varying doses of β -nerve growth factor on the timing of ovulation, plasma progesterone concentration and corpus luteum size in female alpacas (*Vicugna pacos*). *Reproduction Fertility and Development*, 27(8), 1181–1186.
- Sullivan, R., & Miesusset, R. (2016). The human epididymis: Its function in sperm maturation. *Human Reproduction Update*, 22(5), 574–587. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw015>
- Tanco, V. M., Ratto, M. H., Lazzarotto, M., & Adams, G. P. (2011). Dose-response of female llamas to ovulation-inducing factor from seminal plasma. *Biology of Reproduction*, 85(3), 452–456.
- Tribulo, P., Bogle, O., Mapletoft, R., & Adams, G. (2014). Bioactivity of ovulation inducing factor (or nerve growth factor) in bovine seminal plasma and its effects on ovarian function in cattle. *Theriogenology*, 83(9), 1394–1401. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.014>
- Ulloa-Leal, C., Bogle, O., Adams, G., & Ratto, M. (2014). Luteotrophic effect of ovulation-inducing factor/nerve growth factor present in the seminal plasma of llamas.

- Ungerfeld, R. (2012). Seasonal reproductive patterns and effectiveness as teasers (ram effect) of Corriedale and Milchschaf rams. *Animal Production Science*, 52(11), 1036–1041.
- Ungerfeld, R., López-Sebastián, A., Estes, M., Pradiee, J., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Labrador, B., & Santiago-Moreno, J. (2015). Physiological responses and characteristics of sperm collected after electroejaculation or transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands in anesthetized mouflons (*Ovis musimon*) and Iberian ibexes (*Capra pyrenaica*). *Theriogenology*, 84(7), 1067–1074. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.009>
- Zhao, X., Li, X., & Chen, B. (2001). Isolation of ovulation-inducing factors in the seminal plasma of Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) by DEAE-cellulose chromatography. *Reproduction in Domestic Animals*, 36(3–4), 177–181.
- Zhang, L., Wang, H., Yang, Y., Liu, H., Zhang, Q., Xiang, Q., Ge, R., Su, Z., & Huang, Y. (2013). NGF induces adult stem Leydig cells to proliferate and differentiate during Leydig cell regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 436(2), 300–305. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.05.098>
- Zhang, H., Wang, Y., Zhang, J., Wang, L., Li, Q., Sheng, X., Han, Y., Yuan, Z., & Weng, Q. (2015). Testicular expression of NGF, TrkA and p75 during seasonal spermatogenesis of the wild ground squirrel (*Citellus dauricus* Brandt). *European Journal of Histochemistry*, 59(3). <https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2522>