



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

Utilización de gonadotrofina coriónica equina para estimular el desempeño
reproductivo de chivos y carneros durante la primavera

Efectos sobre las características testiculares, seminales y el comportamiento sexual

María Florencia Beracochea González

TESIS DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

URUGUAY

2020



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

Utilización de gonadotrofina coriónica equina para estimular el desempeño
reproductivo de chivos y carneros durante la primavera

Efectos sobre las características testiculares, seminales y el comportamiento sexual

María Florencia Beracochea González

Rodolfo Ungerfeld, PhD.

Director de Tesis

Julián Santiago-Moreno, PhD.

Co-director de Tesis

2020

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Jorge Gil, Ph.D.

Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Presidente

Ana J Soler, Ph.D.

Universidad de Castilla – La Mancha, Ciudad Real, España

Iván Cunha Bustamante Filho, Ph.D.

Universidade do Vale do Taquari, Rio Grande do Sul, Brasil



Unidad de Posgrados -Oficina de Posgrados-

ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Doctorado

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Montevideo, 29 de diciembre de 2020

TRIBUNAL: Dr. Jorge Gil (Presidente), Dra. Ana J. Soler, Dr. Iván Cunha Bustamante

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
3.663.262-3	BERACOCHEA GONZÁLEZ, María Florencia	Sobresaliente	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

Dr. Jorge Gil (Presidente)

Dra. Ana J. Soler

Dr. Iván Cunha Bustamante

FIRMA

Firmado
SOLER VALLS ANA
ANA JOSEFA JOSEFA - 07554679
- 07554679F Fecha: 2020.12.29
16:27:22 +01'00

NOTA: Las calificaciones de aprobación de la Defensa de Tesis pueden ser: B.B.B.- 6 o S.S.S.-12

DEDICATORIA

A las dos personitas que me enseñaron a valorar lo realmente importante,

Juanma y Facu

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Rodolfo Ungerfeld por haber sido el tutor de mis tres tesis. Desde 2009, que comencé a participar de los experimentos del laboratorio me ha ido inculcando diferentes herramientas para transitar por el camino de la investigación. Agradezco por su paciencia, enseñanza, constancia y la disposición que tuvo durante todo este proceso. Gracias por brindarme la oportunidad y la confianza de trabajar en lo que me gusta y por su rigurosidad y aportes tanto en las publicaciones como en el manuscrito final de esta tesis. Gracias por comprender que en esta etapa mis tiempos eran otros y por apoyarme para lograr culminarla.

A mi cotutor, Julián Santiago-Moreno, por su amabilidad y apoyo durante mi estadía en Madrid. Agradezco por su paciencia, constancia y enseñanza no sólo durante este proceso sino también como cotutor de mi tesis de maestría. Gracias por sus aportes en la tesis y en los artículos científicos que se desprendieron de la misma.

A Milton por su dedicación y cuidado de los animales, sin su ayuda hubiese sido imposible realizar el trabajo con los chivos.

A Fernando (Pony) por su ayuda brindada en la sanidad de los animales, gracias por estar siempre sin importar la hora.

A María que comenzó a trabajar conmigo en el primer experimento, como parte de su tesis de grado y continuó colaborando durante todo el experimento. Gracias por su dedicación y constancia durante todas las evaluaciones. Además, agradecerle por su ayuda en el segundo experimento, que a pesar de todas las dificultades con las que nos encontramos, siempre estuvo firme para que el trabajo pudiera salir, sin su ayuda hubiese sido muy difícil poderlo culminar.

A Matías, compañero de trabajo y amigo por estar presente y ayudarme siempre que fue necesario. Gracias por su ayuda en el segundo experimento.

A todos los tesisistas de grado y estudiantes que participaron arduamente para que los trabajos culminaran con éxito. Gracias Lucía Acevedo, María Noel Viera, Matías Fiorelli, Gerardo Less, Lanna Trucolo, Belén Varela, Soledad Rodríguez, Lucía Fazzio, María Jesús Frinch, Mercedes

Ferber, por su ayuda durante el proceso experimental, siempre dispuestos a ayudar y con buen humor pese a las largas horas de trabajo que implicaron cada uno de los experimentos.

A todo el grupo de trabajo del INIA, Madrid, especialmente a Cristina Castaño por su hospitalidad y apoyo durante toda mi estadía.

A Guillermo Souza y a todos los trabajadores del campo que de una u otra forma colaboraron en la realización del segundo experimento. Gracias Guillermo por abrirnos las puertas de tu casa, por intentar que pasáramos lo mejor posible durante la estadía en el campo, por las charlas durante las comidas y por permitirnos trabajar con los carneros de tu predio.

A Jorgelina por abrirme la puerta de su casa y hacerme sentir tan cómoda durante mi estadía en Balcarce. Gracias porque a la distancia se logró organizar el tercer experimento y que estuviese todo encaminado al momento de comenzar el trabajo.

A Paula Rodríguez y a su familia por su hospitalidad durante mi estadía en Brasil.

A mi familia por estar siempre, especialmente a Euge por acompañarme en este camino. A Juanma y Facu por enseñarme a valorar lo verdaderamente importante.

A Vale y Mei por su amistad incondicional y por estar siempre que las necesito.

A Patricia Silveira y Julia Giriboni por su ayuda en la medición de la concentración de testosterona.

Agradecer a mis compañeros de trabajo, Matías, María, Julia, Lorena, Juan Pedro, Fernando y Patricia por compartir el día a día y ayudarme cuando fue necesario.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por el financiamiento de este proyecto.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por otorgarme una beca de doctorado.

Al Programa de Movilidad Académica de la Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado por financiarme el viaje y la estadía en Madrid, España.

Al Programa de Movilidad e Intercambio Académico de la CSIC por financiarme el viaje y la estadía en Porto Alegre, Brasil.

Al Programa 720-contrapartida de convenios de la Dirección General de Relaciones y Cooperaciones (Udelar) por financiarme el viaje a Balcarce, Argentina.

ESTRUCTURA DE LA TESIS Y PUBLICACIONES

Esta tesis reúne información generada en tres experimentos (Experimento I, II y III) que dieron lugar a la publicación de tres artículos en revistas científicas internacionales. En la Tesis se presentan los aspectos más destacados de cada publicación. Las publicaciones completas se anexan al final y aparecen citadas en el texto con números romanos de acuerdo al siguiente orden.

Experimento I

Publicación I: 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, 1096–1102.

Publicación II: Beracochea, F., Viera, M.N., Santiago-Moreno, J., Ungerfeld, R., 2020. Treatment of male goats with equine chorionic gonadotrophin during the non-breeding season does not affect their sperm characteristics during the subsequent breeding season. *Tropical Animal Health and Production*, 52, 211–215.

Además, resta por publicar los resultados sobre cómo la eCG influye sobre la morfometría espermática de la cabeza de los espermatozoides. Dicha información fue generada de los muestreos realizados durante la estación no reproductiva y la estación reproductiva. Estos resultados se incluyen en forma primaria en la presente Tesis.

Experimentos II y III

Publicación III: Beracochea, F., Manes, J., Viera, MN., 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*, doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104125

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción y antecedentes.....	1
1.1. Estacionalidad reproductiva de pequeños rumiantes.....	1
1.2. Espermatogénesis y regulación endócrina de la actividad reproductiva en el macho.....	2
1.3. Efecto de la estacionalidad en la reproducción de los machos.....	3
1.4. Importancias de la estacionalidad reproductiva para el productor agropecuario.....	4
1.5. Metodologías utilizadas para mejorar el desempeño reproductivo de los machos durante la estación no reproductiva.....	5
1.6. Gonadotrofina coriónica equina.....	6
2. Hipótesis.....	11
2.1. Hipótesis general.....	11
2.2. Hipótesis específicas.....	11
3. Objetivos.....	12
3.1. Objetivo general.....	12
3.2. Objetivos específicos.....	12
4. Estrategia de investigación.....	13
5. Experimentos.....	17
5.1. Experimento I (Publicación I y II).....	17
5.2. Experimento II (Publicación III).....	27
5.3. Experimento III (Publicación III).....	30
6. Discusión general.....	35
7. Conclusiones.....	42
8. Referencias bibliográficas.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. (a) Concentración sérica de testosterona, y (b) de anticuerpos anti-eCG de chivos adultos tratados (- ■ -) o no (- Δ -) con eCG durante la estación no reproductiva.....	21
Figura 2. (a) Porcentaje de espermatozoides móviles y (b) porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva de muestras seminales colectadas de chivos adultos tratados (- ■ -) o no tratados (--Δ--) con eCG durante la estación no reproductiva.....	24
Figura 3. Concentración sérica de testosterona de carneros adultos tratados con 700 UI de eCG (-Δ-), con 400 UI de eCG (-●-), o no tratados (-■-)......	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto del tratamiento (grupo tratado con eCG vs grupo no tratado), interacción entre el tratamiento y el tiempo (día de colección) y entre el tratamiento y la etapa durante el proceso de criopreservación (semen fresco, luego de adicional el diluyente y luego de la descongelación), de muestras seminales colectadas de chivos tratados (5 dosis: Día 0 = 800 UI, Día 5, 10, 15 y 20 = 500 UI cada día) o no con eCG durante la estación no reproductiva.....	22
Tabla 2. Características morfométricas (tamaño y forma) de la cabeza de los espermatozoides durante la estación no reproductiva y durante la estación reproductiva de chivos tratados (GeCG, 5 dosis: Día 0 = 800 UI, Día 5, 10, 15 y 20 = 500 UI cada día) o no (GCon) con eCG durante la estación no reproductiva.....	26
Tabla 3. Valores de las medias (medias \pm EE), y el efecto entre tratamiento (no tratado o tratados con eCG) y entre raza (Highlander o Texel) de semen fresco, descongelado y de la crioresistencia de carneros tratados con dos dosis de 1000 UI de eCG o no tratados durante la estación no reproductiva.....	33
Tabla 4. Valores de las medias (medias \pm EE), así como el efecto entre tratamiento (no tratado o tratados con eCG) y entre raza (Highlander o Texel) del comportamiento sexual de carneros tratados con dos dosis de 1000 UI de eCG o no tratados durante la estación no reproductiva.....	34

RESUMEN

Los caprinos y los ovinos son especies con reproducción estacional, por lo que durante la estación no reproductiva disminuye la concentración de testosterona, la calidad seminal y el comportamiento sexual. El objetivo de ésta Tesis de Doctorado fue determinar si la administración de gonadotropina coriónica equina (eCG) durante la estación no reproductiva repercute positivamente en el desempeño reproductivo de los chivos y carneros. En base a esto se realizaron tres experimentos. El objetivo del Experimento I fue comparar la concentración sérica de testosterona, algunas características testiculares, y la calidad del semen fresco y descongelado de chivos tratados o no con eCG. Además, determinar si la administración de eCG a chivos durante la estación no reproductiva genera una reacción inmune anti-eCG, y en el caso de generarla, si esta tiene efectos negativos en la concentración de testosterona, en las características testiculares y seminales durante la estación reproductiva siguiente. Un grupo de chivos fue tratado con eCG [grupo GeCG; una dosis de 800 UI de eCG (Día 0) + cuatro dosis de 500 UI, administradas cada 5 días] y un grupo control, no tratado (grupo GCon). Las evaluaciones se realizaron una semana antes de la administración de eCG hasta el día 60 y luego durante la estación reproductiva siguiente desde el Día 91 al 121. La concentración de testosterona (desde el Día 3 al 21: $P < 0,0001$), los anticuerpos anti-eCG (desde Día 12 al 44: $P \leq 0,01$), el porcentaje de espermatozoides móviles (Día 6: $P = 0,006$ y 14: $P = 0,001$), de espermatozoides con motilidad progresiva (Día 6: $P = 0,01$ y 14: $P = 0,002$) y de espermatozoides con membrana funcional (Día 6: $P = 0,02$ y 22: $P = 0,008$) fueron mayores en el GeCG que en los chivos del GCon. A su vez, el porcentaje de espermatozoides móviles luego de la descongelación tendió a ser mayor en el GeCG que en el de GCon ($P = 0,07$). Además, el tratamiento disminuyó el ancho, área y perímetro de la cabeza de los espermatozoides, ($P = 0,02$, $P = 0,01$, $P = 0,03$, respectivamente). El largo de la cabeza de los espermatozoides fue mayor en el GCon que en los chivos del GeCG los Días 41 y 47 ($P = 0,001$ y $P = 0,05$; respectivamente). Si bien durante la siguiente estación reproductiva los chivos todavía presentaban altas concentraciones de anticuerpos anti-eCG ($P = 0,04$), no hubo efectos negativos de haber sido tratados con eCG varios meses antes en la concentración de testosterona, en las características testiculares ni en la calidad del semen fresco y la crioresistencia espermática. El Experimento II tuvo como objetivo comparar la efectividad de administrar diferentes dosis de eCG (400 o 700 UI) durante la estación no

reproductiva en la concentración sérica de testosterona, en algunas características testiculares y en la calidad del semen fresco de carneros. Se utilizaron tres grupos de carneros Merilín: a) tratados con 400 UI de eCG (grupo eCG400); b) tratado con 700 UI de eCG (grupo eCG700); y c) grupo control no tratado (grupo CON). Los dos grupos tratados recibieron tres dosis de eCG administradas cada 6 días. Las evaluaciones se realizaron desde una semana antes de la administración de eCG (Día 0) hasta 24 días de la primer evaluación. El tratamiento modificó la concentración sérica de testosterona ($P < 0,0001$), que fue mayor en el grupo eCG700 que en los grupos eCG400 ($P < 0,001$) y control ($P < 0,0001$). Además, eCG400 tuvo mayor concentración de testosterona que el grupo CON ($P = 0,0002$). Sin embargo, el tratamiento no produjo cambios en las características testiculares y seminales evaluadas. El objetivo del Experimento III fue comparar la respuesta a la administración de eCG en la calidad del semen fresco y descongelado, en el tamaño testicular, así como en el despliegue del comportamiento sexual en carneros de dos razas originadas en latitudes diferentes y por tanto con un patrón estacional diferente. Se utilizaron carneros Highlander (HL) y Texel (TEX), tratados con dos dosis de 1000 UI de eCG (Días 0 y 5) o no tratados. Las evaluaciones se realizaron siete y cinco días antes de la administración de eCG, y luego en forma semanal durante tres semanas. El tratamiento no produjo cambios en las características testiculares y seminales evaluadas. Sin embargo, el tiempo en alcanzar la segunda y tercera eyaculación fue menor en los animales tratados con eCG que en los controles ($P = 0,001$ y $P = 0,02$; respectivamente). En conclusión, la administración de eCG durante la estación no reproductiva estimuló la secreción de testosterona y mejoró la calidad del semen fresco y del semen descongelado de los chivos. Sin embargo, en los carneros sólo acortó el tiempo a la segunda y tercera eyaculación.

SUMMARY

Goats and sheep are species with seasonal reproduction, so during the non-breeding season testosterone concentration, seminal quality, and sexual behavior decrease. The objective of this Thesis was to determine if the administration of equine chorionic gonadotropin (eCG) can stimulate the reproductive performance of bucks and rams during the non-breeding season. Based on this, three experiments were carried designed. The objective of Experiment I was to compare the serum testosterone concentration, some testicular traits, and the quality of fresh and thawed semen of bucks treated or not with eCG. A complementary aim was to determine if eCG administration to bucks during the non-reproductive season induces the production of anti-eCG antibodies, and if those antibodies have negative effects on the concentration of serum testosterone and testicular and seminal traits during the following breeding season. A group of bucks was treated with eCG [group GeCG; one dose of 800 IU of eCG (Day 0) + four doses of 500 IU, administered every 5 days] and an untreated control group (group GCon), and the different responses were recorded since one week before eCG administration until Day 60 and during the subsequent breeding season (Day 91 to Day 121). Treated bucks had greater testosterone concentration (from Day 3 to 21: $P < 0.0001$), anti-eCG titers (from Day 12 to 44: $P \leq 0.01$), percentages of motile spermatozoa (Day 6: $P = 0.006$ and 14: $P = 0.001$), of spermatozoa with progressive motility (Day 6: $P = 0,01$ and 14: $P = 0.002$) and of spermatozoa with functional membrane (Day 6: $P = 0.02$ and 22: $P = 0.008$). Also in frozen-thawed samples, the percentage of motile spermatozoa tended to be greater in GeCG than in GCon bucks ($P = 0.07$). In addition, the treatment decreased the width, area and perimeter of the sperm head ($P = 0.02$, $P = 0.01$, $P = 0.03$, respectively). Sperm head length was greater in sperm collected from GCon than GeCG bucks on Days 41 and 47 ($P = 0.001$ and $P = 0.05$, respectively). Although during the subsequent breeding season the GeCG bucks still had greater titers of anti-eCG antibodies ($P = 0.04$), their reproductive pattern was unaffected. Experiment II aimed to compare the effectiveness of administering different doses of eCG to rams (400 or 700 IU) during the non-breeding season on serum testosterone concentration, on some testicular traits, and on fresh semen quality. Three groups of Merilín rams were used: a) treated with 400 IU of eCG (group eCG400), b) treated with 700 IU eCG (group eCG700); and c) untreated control group (group CON). The two treated groups received three doses of eCG administered, one every 6 days, and the different responses were

recorded since one week before the first eCG administration (Day 0) until Day 24. Testosterone concentration was greater in eCG700 than in eCG400 ($P < 0.001$) and CON rams ($P < 0.0001$). Furthermore, eCG400 had a greater testosterone concentration than the CON rams ($P = 0.0002$). However, the treatment did not modify any testicular trait or seminal quality. The objective of Experiment III was to compare the effects of administering eCG to rams from two breeds originated in different latitudes, and thus, with different seasonal patterns, on the quality of fresh and thawed semen, in testicular size, and in their sexual behaviour. The study was performed with Highlander (HL) and Texel (TEX) rams, that were treated with eCG (two doses of 1000 IU on Days 0 and 5), or not treated. The responses were recorded 7 and 5 days before eCG administration, and then weekly for three weeks. The treatment did not modify the testicular traits or the fresh sperm quality. However, treated rams achieved their second and third ejaculations earlier than control rams ($P = 0.001$ and $P = 0.02$, respectively). In conclusion, the administration of eCG during the non-breeding season stimulated the secretion of testosterone and improved fresh and frozen-thawed semen quality in bucks. However, in rams, this treatment only reduced the time to reach the second and third ejaculation.

1. Introducción y antecedentes

1.1. Estacionalidad reproductiva de pequeños rumiantes

En regiones templadas, como la de Uruguay, la estacionalidad reproductiva de pequeños rumiantes está determinada principalmente por el fotoperiodo. Esto permite que los nacimientos de las crías ocurran en condiciones ambientales más favorables, aumentando la probabilidad de supervivencia de las mismas (ver revisiones: Lincoln & Short, 1980; Malpaux et al., 1996). En este sentido, la variación del período lumínico diario proporciona la señal de mayor importancia para determinar el patrón estacional de cada raza (Yeates, 1949; Goldman, 1999; Malpaux, 2006). La información fotoperiódica se percibe por la retina y se transmite a través de una vía multisináptica que involucra el núcleo supraquiasmático y el ganglio cervical superior, hasta la glándula pineal, donde se modula la secreción de melatonina (Karsch et al., 1984; Malpaux et al., 2001). La melatonina se libera por la noche y, por lo tanto, la duración de la secreción difiere entre días largos y cortos. Esta duración de la secreción de melatonina se procesa y sirve como un mensajero endócrino para sincronizar el estado neuroendócrino de los animales con los cambios estacionales y de esta forma regular la actividad del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal (Karsch et al., 1988; ver revisión: Badness et al., 1993). Esto ocurre porque la melatonina regula la sensibilidad del área premamilar hipotalámica al feed-back negativo de los esteroides gonadales (Malpaux et al., 2002), modulando así la secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) por parte de las neuronas hipotalámicas (Misztal et al., 2002) y estimulando a la adenohipófisis a liberar de forma continua la hormona folículo estimulante (FSH) y de forma pulsátil la hormona luteinizante (LH), las cuales repercuten a nivel gonadal (Hafez, 1989; ver revisión: Tilbrook & Clarke, 2001).

En latitudes como la de Uruguay (30-35 °S), la estación reproductiva de los ovinos y caprinos se produce cuando las horas de luz disminuyen, es decir, durante parte del verano, y todo el otoño. Al disminuir la cantidad de horas de luz, aumenta el tiempo de liberación de melatonina induciendo un cambio en la sensibilidad del hipotálamo y la hipófisis, lo que repercute en un aumento en la actividad sexual (Misztal et al., 2002). Las hembras durante la estación no reproductiva se encuentran en anestro estacional (ausencia de comportamiento estral), limitando que las mismas queden preñadas. Por el contrario, durante la estación no

reproductiva, los machos disminuyen su actividad reproductiva, pero esta no cesa por completo.

1.2. Espermatogénesis y regulación endócrina de la actividad reproductiva en el macho

La espermatogénesis ocurre a través de una serie de procesos que están cuidadosamente regulados por el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. La misma implica la diferenciación de las células germinales masculinas, las espermatogonias, en espermatozoides haploides funcionales (ver revisión: O'Donnell et al., 2001). La espermatogénesis se produce en los túbulos seminíferos de los testículos, en estrecha relación con las células somáticas del epitelio seminífero, las células de Sertoli. Esta comprende 3 fases principales, que incluyen la mitosis de las espermatogonias, la meiosis de los espermatocitos y la espermiogénesis, mediante la cual las espermátidas redondas se convierten en espermátidas alargadas. Cuando se completa el desarrollo de las células germinales, se produce la espermiación, que es cuando las espermátidas maduras se liberan de las células de Sertoli al lumen del tubo seminífero (ver revisión: O'Donnell et al., 2001). En el caso de carneros y chivos la espermatogénesis dura alrededor de 48 días (Cardoso & Queiroz, 1988; França et al., 1999).

Como se mencionó previamente la GnRH es una hormona hipotalámica que desempeña un rol clave en el desarrollo y el mantenimiento de la reproducción (ver revisión: Schneider et al., 2006). Ésta hormona controla la secreción de la FSH y la LH por parte de la adenohipófisis, las cuales son responsables de estimular los testículos (ver revisión: Schneider et al., 2006). Las células de Sertoli, son el blanco de acción de la FSH. Éstas células son las responsables del intercambio metabólico con las células germinales, brindándole un ambiente adecuado para la supervivencia de las espermatogonias (Meachem et al., 2001). La LH actúa sobre las células de Leydig, ubicadas en el intersticio testicular, estimulando la producción de andrógenos, mayormente testosterona.

La testosterona llega mediante difusión a los túbulos seminíferos donde estimula la espermatogénesis (Weinbauer et al., 2010). Se ha demostrado que la testosterona es necesaria no sólo para que ocurra correctamente la espermatogénesis, sino también para la diferenciación de las células de Sertoli (Haywood et al., 2003), se vincula con la producción y calidad espermática, y es necesaria para que se despliegue el comportamiento sexual (Walker, 2009).

Con respecto a ésta última función, la testosterona actúa a nivel del área preóptica del hipotálamo donde a través de la aromatasa se metaboliza a estrógenos para desencadenar el comportamiento sexual (ver revisión: Dominguez & Hull, 2005). Sumado a esto, modificaciones en la concentración de testosterona pueden inducir cambios en la composición del plasma seminal (Palacín et al., 2008; Hedia et al., 2019), beneficiosos para la calidad espermática (Matsuoka et al., 2006), y la metabolización de testosterona a estrógenos (Simpson et al., 1994) puede repercutir en la regulación de la motilidad espermática (Carreau et al., 2007; Casao et al., 2010a). Cabe destacar que la LH y la FSH no sólo ejercen sus efectos sobre la espermatogénesis, sino que también existen receptores de FSH y LH en el epidídimo (Zhang, et al., 1997; Dahia & Rao, 2006), en las vesículas seminales (Tao et al., 1998) y en la próstata (Reiter et al., 1995), por lo que estas hormonas pueden repercutir en parte en la composición final de plasma seminal y por ende en la calidad del eyaculado.

1.3. Efecto de la estacionalidad reproductiva en la reproducción de los machos

Como se mencionó anteriormente, los ovinos y los caprinos presentan estacionalidad reproductiva lo que repercute en variaciones de las características reproductivas a lo largo del año. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el patrón estacional reproductivo varía entre razas de acuerdo con la latitud en la que evolucionó cada una de ellas (Hafez, 1952, ver revisión: Gerlach & Aurich, 2000). En general, las razas de ovinos desarrolladas en la región del Mediterráneo inician su estación reproductiva antes que aquellos ovinos cuyos genotipos evolucionaron en latitudes superiores, y esto se mantiene incluso cuando ambas razas son expuestas al mismo tratamiento fotoperiódico (Martin et al., 1999). En este sentido, en términos generales, en los machos la concentración de testosterona es máxima durante el otoño y mínima durante fines de invierno (Gastel et al., 1995; Sarlós et al., 2013), coincidiendo con las variaciones en las características reproductivas. La calidad seminal, el tamaño testicular, así como la frecuencia de comportamientos sexuales presentan sus máximos valores entre finales de la primavera y otoño (Pérez et al., 1997; Pérez et al., 1998; Ungerfeld, 2012; Giriboni et al., 2017). Las variaciones del tamaño testicular a lo largo del año están correlacionadas con la actividad espermatogénica y la producción espermática (Courrot & Ortavant, 1981; Gastel et al., 1995; Bielli et al., 1997). Además, la motilidad espermática, la cantidad total de

espermatozoides en el eyaculado, así como el porcentaje de espermatozoides normales aumentan durante el verano y otoño (Ungerfeld, 2012; Giriboni et al., 2017). A lo largo del año también existen modificaciones en la composición y concentración de las proteínas y de las hormonas presentes en el plasma seminal (Dominguez et al., 2008; Casao et al., 2010a; 2013). La conjunción de las variaciones previamente mencionadas se traduce en fluctuaciones anuales en el despliegue del comportamiento sexual y en la producción espermática, y por ende en el desempeño reproductivo de los machos, lo que limita los manejos reproductivos que se pueden implementar a lo largo del año.

1.4. Implicancias de la estacionalidad reproductiva para el productor agropecuario

El anestro estacional de las hembras y la disminución de la actividad sexual de los machos determina la cría estacional de ovejas y cabras, lo que restringe los nacimientos a épocas específicas del año. Esto conduce a marcadas variaciones estacionales en la disponibilidad de algunos productos en el mercado (por ejemplo, corderos disponibles para su venta durante todo el año), lo que muchas veces implica cambios en el precio de las ventas a lo largo del año para los productores. En este sentido, para algunos sistemas productivos sería ventajoso sincronizar los nacimientos en un período corto de tiempo que permita mejorar la organización del cuidado de los animales; reducir los períodos improductivos (pubertad, anestro estacional, anestro posparto) y tener la capacidad para programar los nacimientos en épocas específicas del año (por ejemplo, en función de la demanda comercial) (ver revisión: Dardente et al., 2016). Para lograr esas modificaciones la mayoría de los estudios se han centrado en la reproducción de las hembras. Sin embargo, es necesario acompasar esta información con estudios sobre la reproducción del macho. En este sentido, como se mencionó previamente si bien la producción espermática de los machos se mantiene durante todo el año, durante la estación no reproductiva se produce semen de baja calidad, y disminuye la frecuencia de comportamientos de cortejo y cópula frente a una hembra en celo, lo que reduce la probabilidad de que ocurra una copula efectiva. Sumado a esto, la congelación seminal también se ve afectada durante la estación no reproductiva, ya que, al producir semen de menor calidad, en muchos casos el mismo no califica con los estándares mínimos necesarios para que sea apto para su congelación, lo que impide producir semen para comercializarlo congelado en dicho período. Lo anteriormente

mencionado abre la posibilidad de implementar estrategias para mejorar el desempeño reproductivo de los machos que pueda repercutir en la cantidad de hembras que quedan preñadas y en la cantidad de pajuelas por animal/año que se pueden criopreservar y comercializar.

1.5. Metodologías utilizadas para mejorar el desempeño reproductivo de los machos durante la estación no reproductiva

Actualmente se han desarrollado métodos para reducir los efectos negativos de la estacionalidad (ver revisión: Dardente et al., 2016). En este sentido, la manipulación artificial del fotoperiodo, el uso de implantes de melatonina, o la administración de agonistas de GnRH, son algunas de las opciones que existen para estimular la actividad reproductiva durante la estación no reproductiva. Los tratamientos fotoperiódicos de los carneros se basan en la exposición a períodos de días cortos y largos, e induce aumentos del volumen testicular, el total de espermatozoides en el eyaculado y disminución del porcentaje de espermatozoides anormales, los que son similares a lo observado durante la estación reproductiva (Chemineau et al., 1988). Además, los chivos intensifican el comportamiento sexual (Delgadillo et al., 2002; Chasles et al., 2016). Sin embargo, para que éste método sea efectivo se necesita realizar un tratamiento durante 45 días para observar modificaciones transitorias luego de aproximadamente 60 días pos-tratamiento (Chasles et al., 2016).

Los implantes liberadores de melatonina proporcionan información fotoperiódica de días cortos, por lo que, al aplicarlos durante la estación no reproductiva, en días largos, estimula la actividad de los carneros (Fitzgerald & Stellflug, 1991; ver revisión: Rosa & Bryant, 2003). Dicho tratamiento produce un aumento en el tamaño testicular (Palacín et al., 2008), en la concentración de testosterona (Kokolis et al., 2000), en el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (Casao et al., 2010b), en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales (Kaya et al., 2000) y en la actividad secretora de las vesículas seminales (Mokhtar et al., 2016). Además, el tratamiento induce un aumento del porcentaje de espermatozoides móviles y con el ADN íntegro en muestras criopreservadas (Pool et al., 2020). Sin embargo, dichos cambios comienzan a visualizarse recién a partir de los 45 días de colocados los implantes (Kokolis et al., 2000, Casao et al., 2010b), y su eficacia difiere

considerando la raza y el tiempo de tratamiento (Abecia et al., 2007). La administración de un agonista de GnRH durante la estación no reproductiva permite aumentar la concentración de testosterona y mejorar las características seminales de los chivos (Giriboni et al., 2019), pero los efectos son transitorios, de corta duración.

1.6. Gonadotrofina coriónica equina

Una alternativa para estimular la actividad reproductiva durante la estación no reproductiva es la administración de gonadotrofina coriónica equina (eCG). La eCG es una hormona glucoproteica secretada por las células epiteliales trofoblásticas de origen fetal que forman las copas endometriales (ver revisión: Murphy & Martinuk, 1991; Hoppen, 1994). Estas células trofoblásticas invaden el endometrio entre el día 36 y el 38 de gestación, y comienzan a producir eCG aproximadamente dos días después, con una producción máxima entre los días 55 y 70 de gestación. La producción de eCG es continúa hasta aproximadamente el día 110 (con un rango de 100 a 140 días) de gestación, momento en el que las células son eliminadas a consecuencia de una respuesta inmune celular materna (Hoppen, 1994).

La eCG pertenece a la misma familia de hormonas glucoproteicas, igual que la LH, la FSH y la hormona estimulante de la tiroides (TSH). La eCG está formada por dos subunidades, llamadas α y β que se mantienen unidas mediante enlaces no covalentes (Hartree & Renwick, 1992). La estructura proteica primaria de la subunidad β es idéntica a la de la LH equina (eLH) (Guillon & Combarous 1983; Bousfield et al., 2001). Ambas moléculas presentan una extensión del carboxilo terminal de 30 aminoácidos, con la cola muy glucosilada (Sugino et al., 1987). Además, ambas están codificadas por un solo gen (Sherman et al., 1992). En consecuencia, las diferencias en la actividad de unión entre LH y eCG son probablemente atribuibles a diferencias en el tamaño y la estructura de las cadenas de N- y O-glicanos unidas a las cadenas α y β del polipéptido.

La molécula de eCG contiene muchos más carbohidratos y es más voluminosos que la eLH (Bousfield et al., 1996, 2001). Además, la eCG contiene ácido siálico, especialmente unido a la subunidad β , lo que le confiere una vida media prolongada, de 26 h en equinos (Cole et al., 1967), lo que es bastante más largo que la vida media de la FSH y la LH (Vliegenthart et al., 1990; Martinuk et al., 1991). En efecto, la eCG tiene la vida media más larga en la circulación

entre las gonadotropinas (Menzer & Shams, 1979) porque su molécula contiene oligosacáridos altamente sializados (Damm et al., 1990) que reducen el metabolismo en el hígado e impiden la filtración de la eCG en los riñones (Martinuk et al., 1991). De hecho, la eLH se elimina de la circulación seis veces más rápido que la eCG (Smith et al., 1993).

Los receptores de la LH, FSH, TSH y de las gonadotropinas coriónicas pertenecen a una subfamilia de receptores de hormonas glucoproteicas que incluyen siete receptores de dominio transmembrana asociados a proteína G (Dufau, 1998; ver revisión: Ascoli et al., 2002). Por consiguiente, debido a la alta afinidad por los receptores de FSH y LH (Christakos & Bahl, 1979), la eCG puede tener efectos similares a los de la LH y FSH en especies diferentes al equino (Cole et al., 1967; Baker, 1973; Stewart & Allen, 1981). Por ello, se utiliza la eCG en medicina veterinaria para inducir la pubertad, revertir el anestro, en protocolos de superovulación y para aumentar la fertilidad (ver revisiones: Murphy, 2012; De Rensis & López-Gatiús, 2014). Sumado a esto, su larga vida media le confiere importantes ventajas prácticas, ya que evita el manejo reiterado de animales que no son fáciles de manipular. En este sentido, se ha demostrado que existe un modelo de dos compartimentos para determinar la desaparición de la hormona (ver revisión: Murphy & Martinuk, 1991). El primer componente de la curva de desaparición se vincula con la fase de distribución y se caracteriza por la rápida eliminación de la hormona de la circulación. El segundo componente se vincula con la fase de eliminación, es decir el retorno de la hormona de los compartimentos extravasculares y su posterior metabolismo y excreción. La vida media para la fase de distribución es de 0,3 h en ratas, de 3-4 h en la oveja y de 45,6 h en la vaca (ver revisión: Murphy & Martinuk, 1991; Murphy, 2012). La vida media para la fase de eliminación varía de 6 h en ratas a 61 h en la oveja y 121 h en la vaca.

A pesar de que la eCG es frecuentemente utilizada para estimular la actividad ovárica de las hembras (Rahman et al., 2008; ver revisión: De Rensis & López-Gatiús, 2014), existen escasos trabajos sobre las posibles aplicaciones para promover la actividad reproductiva de los machos. Dado que la LH y la FSH son hormonas que estimulan la actividad de las gónadas también en los machos, y que la eCG puede unirse a los receptores de dichas hormonas, la administración de la eCG también podría repercutir positivamente en el desempeño reproductivo de los machos. De hecho, su administración promueve un aumento de la concentración de

testosterona (Hochereau-de-Reviers et al., 1990; Price et al., 1991; Ungerfeld et al., 2014; 2019). Se ha demostrado que la administración de 5 UI de eCG a ratas con la actividad gonadal suprimida estimula un aumento del peso testicular, el diámetro de los testículos, de los túbulos seminíferos, y de la actividad espermatogénica (Patil et al., 1998). A su vez existen algunos trabajos sobre su posible uso terapéutico para tratar problemas reproductivos. La administración de tres dosis de 50 mg de testosterona combinados con 250 UI de eCG (administradas en intervalos de dos semanas) indujo la secreción de testosterona, la actividad de las células de Sertoli, y por ende una mejoría en la calidad seminal en perros con astenozoospermia (baja motilidad espermática) (Kawakami et al., 2000). A su vez, se observó que la administración de una dosis de 5000 UI de eCG permitió producir espermatozoides en forma transitoria en un venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) azoospermico (Ungerfeld, 2013).

La administración de 200 UI de eCG dos veces por semana durante el desarrollo de los corderos determinó un aumento de la cantidad de células intersticiales en el testículo. Además, a las 12 semanas de vida se observaron signos de espermatogénesis temprana, indicados por la presencia de más de una capa celular en el perímetro de los túbulos y la presencia de células mitóticas dentro de los túbulos (Morton et al., 2004). Sin embargo, Ungerfeld & Bielli (2008) no encontraron ninguna mejoría en la producción seminal ni en el desarrollo del comportamiento sexual de los corderos que recibieron 100 UI o 400 UI de eCG/semana. Por el contrario, la administración de eCG (2 dosis diarias de 300 UI durante 20 días) a carneros hipofisectomizados permitió secretar concentraciones de testosterona normales en los túbulos seminíferos, observándose actividad espermatogénica (Courot et al., 1979). Sumado a esto, otros trabajos demostraron que la administración de eCG a carneros (300 UI: Hochereau-de-Reviers et al., 1990; una o dos dosis de 1000 UI: Price et al., 1991; Ungerfeld et al., 2014; 2019; 3000 UI: Price et al., 1991) también estimuló la secreción de testosterona. A su vez, la administración de eCG aumentó la efectividad de los carneros para estimular la ovulación, celos y preñeces en ovejas en anestro (efecto macho) (Ungerfeld et al., 2014).

En función de lo anteriormente mencionado, en la presente Tesis de Doctorado se planteó determinar si la administración de eCG durante la estación no reproductiva, además de aumentar la concentración de testosterona, puede mejorar la calidad seminal, la resistencia de

los espermatozoides a la criopreservación, y el comportamiento sexual de los machos. Al mismo tiempo es necesario considerar que en las hembras la efectividad de la administración de la eCG puede disminuir con la repetición de los tratamientos por la formación de anticuerpos anti-eCG (Bodin et al., 1997; Roy et al., 1999) y/o influyendo en la expresión génica del ovario, alterando su función y eventualmente reduciendo su fertilidad (Sun et al., 2019). Roy et al. (1999) demostraron que una sola inyección de 500 UI de eCG produce aumento inmediato de la concentración de anticuerpos con respuestas inmunes humorales primarias o secundarias. La respuesta inmunitaria secundaria fue más rápida en cabras (Roy et al., 1999) que en gatos inyectados con una dosis 3 veces superior (en relación con su peso) (Swanson et al., 1996). No sólo se ha observado una respuesta inmunitaria diferencial entre especies, sino también entre hembras de la misma raza (Roy et al., 1999). Dichas variaciones se atribuyen a una gran variabilidad en la secreción de inmunoglobulinas después de administrar la eCG, y ésta estaría siendo explicada por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Los genes del CMH de clase II codifican glucoproteínas diméricas implicadas en la presentación de antígenos a las células T, que ayudan a las células B a producir inmunoglobulinas adecuadas (Klein et al., 1983). Los genes de clase II se encuentran entre los genes más polimórficos (Cameron et al., 1990), lo que les confiere a las moléculas del CMH la capacidad de formar complejos con una gran variedad de diferentes péptidos derivados de antígenos. A su vez, los resultados obtenidos después de sucesivos tratamientos con eCG indican que la concentración alta o baja de anticuerpos en plasma es una característica inherente y repetible de cada individuo y demuestran la ocurrencia de diferentes poblaciones de cabras, clasificadas como de respuesta baja, media y alta (Roy et al., 1999). Además, según Clément et al. (2008) la respuesta inmune va a depender de la dosis de eCG y de la cantidad de inyecciones administradas. En el trabajo de Roy et al. (1999) observaron que las hembras que mostraban altas concentraciones de anticuerpos residuales (anticuerpos presentes al momento de inyectar una nueva dosis de eCG) tenían un aumento de LH retrasado o ausente. Por ello, éstos autores sugieren que las inmunoglobulinas anti-eCG deben interferir con los eventos endocrinos y la estimulación ovárica y para ello plantean dos hipótesis. La primera que los anticuerpos anti-eCG secretados podrían exhibir afinidades débiles y podrían interferir solo parcialmente con la hormona. En consecuencia, solo la fracción libre de eCG se uniría a los

receptores ováricos de LH y FSH, lo que disminuiría el efecto de la estimulación y retrasaría la esteroidogénesis folicular. En segundo lugar, los anticuerpos anti-eCG pueden interferir con la LH y/o FSH endógenas, lo que implica bloquear las hormonas propias del animal pese a que no se administre eCG. Por consiguiente, es necesario determinar si la administración de dosis repetidas de eCG también generan anticuerpos anti-eCG en los machos, y de ser así, si éstos influyen negativamente en el desempeño reproductivo posterior de esos machos. Además, se debe considerar que las razas que evolucionaron en latitudes más bajas, presentan menores variaciones en su actividad reproductiva que las originadas en latitudes más septentrionales y al igual que sucede con los implantes de melatonina, su eficacia puede diferir considerando la raza en estudio (Abecia et al., 2007). En este sentido, también es importante comparar la eficacia de la eCG de razas originadas en diferentes latitudes y, por tanto, con diferente patrón estacional reproductivo.

2. Hipótesis

2.1. *Hipótesis general*

La administración de eCG a chivos y carneros durante la estación no reproductiva repercute positivamente en el desempeño reproductivo de los machos.

2.2. *Hipótesis específicas*

- 1) La eCG induce un incremento en la concentración de testosterona, modifica las características testiculares, y mejora las características seminales del semen fresco y descongelado en chivos durante la estación no reproductiva. Además, dicho tratamiento induce la producción de anticuerpos anti-eCG cuya concentración permanece alta durante la siguiente estación reproductiva, lo que repercute negativamente en el desempeño reproductivo.
- 2) La eCG induce un aumento en la concentración de testosterona, modifica las características testiculares, y mejora la calidad del semen fresco en carneros durante la estación no reproductiva, y la respuesta es mayor cuando se administran dosis mayores de eCG.
- 3) La eCG genera una respuesta mayor en carneros de razas menos estacionales.

3. Objetivos

3.1. *Objetivo general*

Determinar si la administración eCG estimula el desempeño reproductivo de los chivos y carneros durante la estación no reproductiva.

3.2. *Objetivos específicos*

- 1) Comparar la concentración sérica de testosterona, algunas características testiculares, y la calidad del semen fresco y descongelado de chivos tratados o no tratados con eCG. Además, determinar si la administración de eCG a chivos durante la estación no reproductiva genera una reacción inmune anti-eCG, y en el caso de generarla, si esta tiene efectos negativos en la concentración de testosterona, en las características testiculares y seminales durante la estación reproductiva siguiente.
- 2) Comparar la efectividad de administrar diferentes dosis de eCG (400 o 700 UI) durante la estación no reproductiva en la concentración sérica de testosterona, en algunas características testiculares y en la calidad del semen fresco de carneros.
- 3) Comparar la respuesta a la administración de eCG en la calidad del semen fresco y descongelado, en el tamaño testicular, así como en el despliegue del comportamiento sexual en carneros de dos razas originadas en latitudes diferentes y por tanto con un patrón estacional diferente.

4. Estrategia de investigación

En la mayoría de los mamíferos de expectativa de vida larga la estacionalidad reproductiva limita el uso de los machos como reproductores durante una parte importante del año. En este sentido, si bien los caprinos y ovinos producen espermatozoides durante todo el año, durante la estación no reproductiva se produce un semen de baja calidad y disminuye el despliegue de comportamientos sexuales, lo que reduce la probabilidad de que ocurra una copula efectiva. Sumado a esto, la congelación seminal también se ve afectada durante dicho período, ya que, al producir semen de menor calidad, el mismo no califica con los estándares mínimos necesarios para que sea apto para su congelación. Es por ello, que la administración de eCG es una posible herramienta para reducir los efectos de la estacionalidad en los machos. En este contexto, la presente Tesis incluyó un primer experimento (Experimento I) en el que se estudió si la administración de eCG a chivos durante la estación no reproductiva produce un aumento en la concentración de testosterona y mejora algunas características testiculares, y la calidad del semen fresco y descongelado. Para este experimento se utilizaron chivos machos de la raza Gabón que, si bien no tienen un patrón reproductivo tan marcado como otras razas, presentan un aumento de la actividad reproductiva (mayor concentración sérica de testosterona y mejor calidad seminal) desde finales de la primavera hasta mediados del otoño (Giriboni et al., 2017). En efecto, dado el conocimiento reproductivo previo, y que se contaba con los animales para realizar el trabajo en Facultad de Veterinaria (Montevideo, Uruguay), se optó por trabajar con esta raza para realizar el Experimento I. Además, se consideró que éstos animales son un buen modelo biológico de una especie estacional que puede ser utilizada en protocolos de investigación de nuevas metodologías reproductivas, y de esta forma ser extrapolados a otras especies. Es importante considerar que las dosis de eCG utilizadas en los trabajos previos realizados en machos fueron definidas en forma arbitraria, en función de las dosis utilizadas en hembras, lo que limitó la decisión de cual dosis sería la más adecuada para este trabajo. Basándose en la información previa, se optó por administrar una dosis inicial de 800 UI de eCG, la cual probablemente fuera alta, por lo que podría repercutir en un aumento de la concentración de testosterona. A su vez, para mantener el efecto en el tiempo se optó por dosis más bajas: 4 dosis más de 500 UI administradas cada una cada 5 días. Además, dado que no existía información previa sobre la repercusión de la administración de eCG sobre la calidad

seminal y por ende si la misma podía repercutir a nivel espermatogénico (formación de los espermatozoides) o posteriormente sobre los espermatozoides formados, es decir aquellos que se encuentran a nivel del epidídimo o sobre la composición del plasma seminal, es que se optó por realizar el experimento durante 60 días. Dicha duración fue determinada en base a que es necesario al menos 48 días para que ocurra un ciclo espermatogénico completo en los chivos (França et al., 1999).

Cómo la eCG se une a los receptores de LH y FSH, estimularía simultáneamente la secreción de testosterona y la espermatogénesis. En base a esto, en este experimento se optó por determinar la concentración de testosterona, algunas características testiculares (circunferencia y ecogenicidad testicular) y la calidad del semen fresco y descongelado. La ecogenicidad testicular se evaluó para determinar la intensidad de pixeles, ya que en carneros tratados con GnRH se observó una disminución aguda en la intensidad de pixeles del testículo, lo que fue interpretado como un incremento en la proporción de fluido testicular probablemente estimulado por la LH (Ungerfeld & Fila, 2011). En forma similar carneros expuestos a hembras en celo disminuyeron su ecogenicidad testicular, al tiempo que aumentaban la concentración sérica de testosterona (Ungerfeld & Fila, 2012).

La administración de la eCG induce la formación de anticuerpos anti-eCG, lo que repercute negativamente en el desempeño reproductivo en cabras y ovejas (Bodin et al., 1997; Roy et al., 1999). Por ello se determinó si el tratamiento realizado a los machos induce la formación de anticuerpos. En el caso que se produjeran anticuerpos tampoco se sabía si los mismos iban a repercutir negativamente en el desempeño reproductivo de los machos y de ser así durante cuánto tiempo. Por ello, se decidió evaluar a los machos luego de tres meses de terminado el tratamiento (durante la siguiente estación reproductiva), para determinar si persistían los anticuerpos anti-eCG, y si esto repercutía negativamente en la concentración de testosterona y en las características testiculares y seminales.

Los resultados positivos que arrojó el primer experimento, impulsaron a realizar dos experimentos más, pero esta vez utilizando como modelo a los carneros, especie con un impacto productivo mayor en nuestro país. Considerando que en el Experimento I los resultados positivos se observaron solamente durante el período en el que se administró la hormona, los animales fueron evaluados durante 4 semanas en el Experimento II y durante 3

semanas en el Experimento III. En el segundo experimento (Experimento II) se compararon dos dosis diferentes de eCG en carneros durante la estación no reproductiva. Aunque como se mencionó, la falta de información previa también limitó la decisión de la dosis a utilizar, considerando los resultados obtenidos, se optó por comparar dos dosis diferentes: 400 UI vs 700 UI de eCG. Para este estudio se utilizaron carneros Merilín, una raza originada en Uruguay en 1943 con el fin de obtener animales que se adaptaran mejor a las condiciones de nuestro medio ambiente (Sociedad uruguaya de criadores de Merilín). El trabajo se realizó en un establecimiento particular, de forma que se trabajó en condiciones productivas estándares en el país. En este caso se determinó la concentración sérica de testosterona y se agregó el registro de otras características testiculares además de las evaluadas en el Experimento I (consistencia, circunferencia y ecogenicidad testicular, así como la hiperemia inguinal y abdominal), además del semen fresco. Las condiciones de trabajo limitaron algunos aspectos, ya que no se contaba con luz eléctrica (se debía utilizar generador eléctrico), con un laboratorio montado en un galpón, y limitación de personal, se optó por no congelar el semen.

El tercer experimento (Experimento III) se diseñó considerando que no existe información sobre la relación del patrón estacional de la raza con la respuesta a la eCG. En este experimento se comparó la efectividad de la eCG sobre el semen fresco y descongelado, así como en el comportamiento sexual de los carneros en dos razas originadas en diferentes latitudes y, por tanto, con un patrón estacional diferente. La dosis de eCG utilizada en este experimento (1000 UI) se definió considerando los resultados del experimento II y en base al estudio previo de Ungerfeld et al. (2019). El estudio incluyó dos razas originarias de diferentes latitudes, Texel (TEX) y Highlander (HL) y se realizó en INTA (Balcarce, Argentina). Brevemente, la raza TEX se originó en Holanda (52°7' N) y se introdujo en Argentina en 1977 (Ceballos & Villa, 2017). Esta raza tiene una marcada estacionalidad reproductiva, con una estación reproductiva corta (Colas et al., 1986). Por otro lado, la raza HL se originó en Nueva Zelanda (40°54' S) a partir del cruce de Landrace finlandesa (50%), Romney Marsh (25%) y Texel (25%), y se introdujo en la Estación Experimental donde se realizó el estudio (INTA-Balcarce, Argentina) en 2011. Aunque no existen estudios publicados sobre su patrón estacional en este ambiente, considerando las razas que lo originaron, y la información inédita generada en INTA hasta ese momento, se asumió que esta raza tiene una estación reproductiva de mayor duración que la

raza TEX. En este sentido, considerando que el tratamiento se aplicaría más cerca del inicio de la estación reproductiva de los HL en comparación con los TEX que se encontrarían en un período de inactividad reproductiva más profundo, se esperaba una mejor respuesta al tratamiento en los carneros HL. En este trabajo además de la medición de circunferencia escrotal y de evaluar la calidad del semen fresco y descongelado, se evaluó el comportamiento sexual de los machos frente a una hembra en celo.

5. Experimentos

5.1. Experimento I (Publicación I y II)

Administración de eCG a chivos durante la estación no reproductiva y el impacto de dicho tratamiento durante la siguiente estación reproductiva

Objetivo específico

Comparar la concentración sérica de testosterona, las características testiculares, y la calidad del semen fresco y descongelado de chivos tratados o no tratados con eCG. Además, determinar si la administración de eCG a chivos durante la estación no reproductiva genera una reacción inmune anti-eCG, y en el caso de generarla, si esta tiene efectos negativos en la concentración de testosterona, en las características testiculares y seminales durante la estación reproductiva siguiente.

Materiales y métodos

Animales y su manejo

El Experimento I fue realizado en la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay (34°54' S), entre los meses de octubre y marzo. El manejo de los animales y el protocolo experimental fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Veterinaria (Universidad de la República, Montevideo, Uruguay). Se utilizaron 19 chivos adultos de la raza Gabón, que fueron adjudicados a 2 grupos experimentales: un grupo control (GCon; n = 9), que no recibió tratamiento alguno, y un grupo que fue tratado con eCG (GeCG; n = 10). Los chivos GeCG recibieron una dosis inicial de 800 UI (Novormon, Syntex, Argentina) (Día 0) seguida de 4 dosis de 500 UI administradas cada 5 días. El trabajo experimental tuvo lugar durante la estación no reproductiva (octubre-diciembre; Giriboni et al., 2017), desde el Día -14 al Día 60 y durante la siguiente estación reproductiva (febrero-marzo), desde el Día 91 (comenzando a contabilizar después de la última administración de eCG) al Día 121.

Evaluaciones realizadas durante la estación no reproductiva

Se colectaron muestras sanguíneas diariamente desde el Día -6 al Día 60. La concentración sérica de testosterona y de anticuerpos anti-eCG se midió a partir de muestras colectadas cada 3 y 4 días respectivamente. Desde el Día -3 hasta el Día 60, se midió el tamaño testicular cada 3 días y se realizaron ecografías longitudinales de los testículos cada 3-5 días para determinar la intensidad de pixeles de las imágenes obtenidas de acuerdo a Ungerfeld & Fila (2011) y con ello determinar la ecogenicidad testicular. El aumento de ecogenicidad testicular se vincula con una mayor relación de parénquima testicular/líquido, y una menor ecogenicidad se relaciona con una mayor proporción de líquido en el testículo. Se colectó semen semanalmente desde el Día -14 al Día 56 mediante electroeyaculación. Se evaluaron los siguientes parámetros seminales: volumen del eyaculado, concentración espermática, total de espermatozoides en el eyaculado, motilidad de masa (escala 0 - 5), porcentaje de espermatozoides móviles y con motilidad progresiva, así como el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales, con su acrosoma íntegro y con membrana funcional. Las muestras seminales colectadas los días -7, 6, 22, 32 y 47 fueron criopreservadas utilizando un diluyente comercial (AndroMed, Minitübe, Tiefenbach, Alemania). Luego de la descongelación, se evaluó el porcentaje de espermatozoides móviles y con motilidad progresiva, el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro y con membrana funcional.

Evaluaciones realizadas durante la estación reproductiva

Se midió el tamaño testicular semanalmente desde el Día 91 al 119. Las ecografías longitudinales testiculares se realizaron semanalmente desde el Día 94 al 120. Se colectaron muestras sanguíneas cada 3 días desde el Día 91 al 121 para determinar la concentración de testosterona. La concentración de anticuerpos anti-eCG fue determinada en muestras colectadas los Días 91 y 97. Se colectaron muestras seminales semanalmente desde el Día 91 al Día 119 mediante electroeyaculación, y las muestras del Día 97 y 112 fueron criopreservadas utilizando el mismo diluyente utilizado durante la estación no reproductiva. Se evaluaron las mismas características del semen fresco y descongelado evaluadas durante la estación no reproductiva.

Además, se calculó el *ratio* de crioresistencia espermática (CR) como el valor después de la descongelación X 100/valor antes de la congelación.

Evaluación morfológica de la cabeza de los espermatozoides

Se determinaron las variables morfológicas de la cabeza de los espermatozoides de todas las muestras seminales colectadas durante la estación no reproductiva y durante la estación reproductiva. Para ello, se realizaron frotis con 10 μ L de semen, se los dejó secar, se los sumergió en alcohol metílico (Metanol para el análisis ACS, Dorwil Química Analítica, Buenos Aires, Argentina) durante 5 s y fueron almacenados hasta su determinación. La evaluación morfológica de la cabeza de los espermatozoides se realizó en el Departamento de Reproducción Animal del Instituto de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Madrid, España), donde los frotis fueron teñidos con Hemacolor (Merck) y analizados con un sistema asistido por computadora denominado ASMA. Para ello, se utilizó el módulo de morfometría de un sistema comercial (Sperm-Class Analyser, SCA, Microptic, Barcelona, España). El dispositivo estaba equipado con un microscopio Nikon (Labophot-2, Tokio, Japón), y una cámara de video Sony (CCD AVC-D7CE; Sony Corporation, Tokio, Japón) conectada a un procesador Pentium 950 MHz. Se midieron cuatro dimensiones de la cabeza de cada espermatozoide (total, 100 espermatozoides por muestra): longitud (L), ancho (An), área (A) y perímetro (P). Se calcularon cinco valores de forma a partir de esas dimensiones: elíptica (L/An), rugosidad ($4\pi A/P^2$), elongación [(L - An)/(L + An)], y regularidad ($\pi LAn/4A$).

Análisis estadístico

La concentración de testosterona y de anticuerpos anti-eCG, las características testiculares y del semen fresco y las morfológicas fueron comparadas con un modelo mixto, considerando el tratamiento (GeCG vs GCon), el tiempo (fechas de cada muestreo), así como su interacción como efectos principales. El animal fue considerado como un factor aleatorio dentro de cada grupo. Las características del semen registradas durante la criopreservación también fueron comparadas con un modelo mixto, considerando el tratamiento (GeCG vs GCon), la etapa de evaluación (semen fresco, después de agregar el diluyente, luego de la descongelación), tiempo (fecha de cada muestreo), la interacción entre tratamiento y etapa y entre tratamiento y tiempo.

El animal también fue considerado como un factor aleatorio dentro de cada grupo. Cuando se colectó más de un dato de la misma variable antes del Día 0, se utilizó la media de esos datos para los análisis, lo que se presenta como AeCG. Para el análisis de la circunferencia escrotal, la intensidad de pixeles, el porcentaje de espermatozoides con morfología normal, con membrana funcional, y con acrosoma íntegro en semen fresco, así como el porcentaje de espermatozoides móviles y con morfología normal del semen descongelado, el valor AeCG se incluyó como covariable. Los datos se presentan como media de mínimos cuadrados \pm EE. Se consideró diferencia significativa cuando $P \leq 0,05$ y tendencia cuando $0,05 > P \geq 0,1$.

Resultados

A continuación, se presentan los resultados más relevantes del Experimento I.

Estación no reproductiva (Publicación I)

La concentración de testosterona fue mayor en el GeCG que en el GCon ($P < 0,0001$; Figura 1a). Existió una interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P < 0,0001$): desde el Día 3 al Día 21 la concentración de testosterona fue mayor en el GeCG que en el GCon ($P < 0,0001$; Figura 1a). Sin embargo, en el Día 39 y 45 el GCon tendió a tener mayor concentración de testosterona que el GeCG ($P = 0,09$ y $P = 0,08$; respectivamente) y presentó mayor concentración de la hormona en el Día 60 ($P = 0,04$) (Figura 1a). La concentración de anticuerpos anti-eCG fue mayor en el GeCG que en el GCon ($P < 0,0001$; Figura 1b). Existió una interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P < 0,0001$; Figura 1b): desde el Día 12 al 44 la concentración de anticuerpos anti-eCG fue mayor en el GeCG que en el GCon ($P = 0,01$; Figura 1b). Los efectos principales del tratamiento, de la interacción entre tratamiento y tiempo y entre tratamiento y etapa del semen fresco y descongelado se presentan en la Tabla 1.

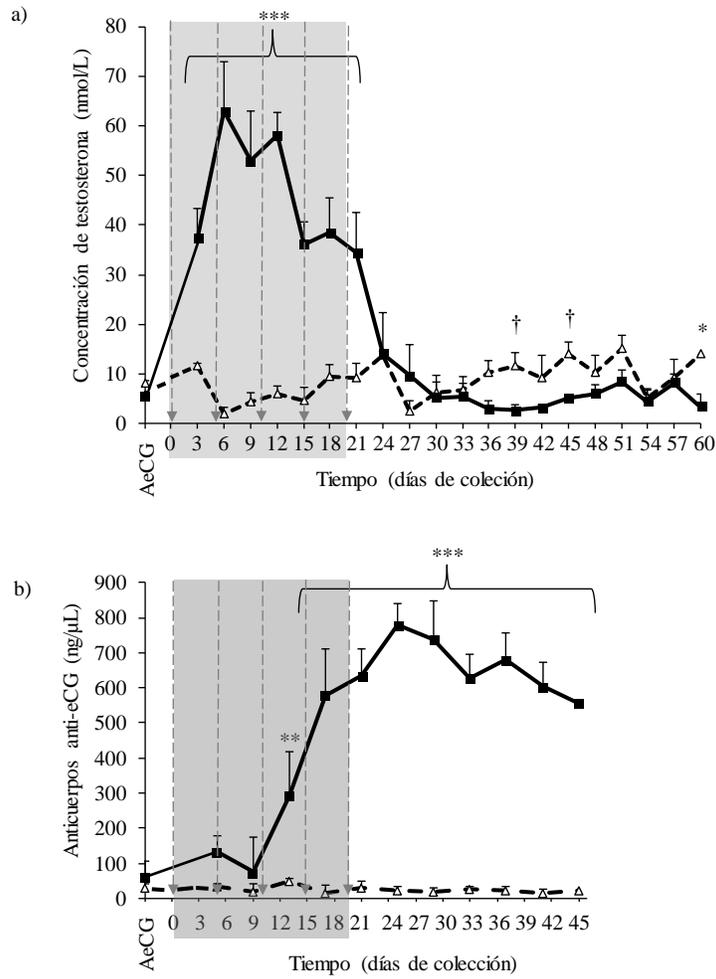


Figura 1. (a) Concentración sérica de testosterona, y (b) de anticuerpos anti-eCG de chivos adultos tratados (- ■ -) o no (- △ -) con eCG durante la estación no reproductiva. Día 0 = primer día de la administración de eCG. La barra gris representa el período de administración de la eCG y las flechas punteadas indican cada administración de eCG (5 dosis: Día 0 = 800 UI, Día 5, 10, 15 y 20 = 500 UI cada día). AeCG: antes de administrar la eCG. * $P < 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P < 0,001$ y †: $0,05 > P \leq 0,1$.

Tabla 1. Efecto del tratamiento (grupo tratado con eCG vs grupo no tratado), interacción entre el tratamiento y el tiempo (día de colección) y entre el tratamiento y la etapa durante el proceso de criopreservación (semen fresco, luego de adicional el diluyente y luego de la descongelación), de muestras seminales colectadas de chivos tratados (5 dosis: Día 0 = 800 UI, Día 5, 10, 15 y 20 = 500 UI cada día) o no con eCG durante la estación no reproductiva.

Características seminales	Semen fresco		Semen congelado-descongelado		
	Tratamiento	Interacción entre tratamiento y tiempo	Tratamiento	Interacción entre tratamiento y etapa	Interacción entre tratamiento y tiempo
Concentración seminal	ns	0,04	-	-	-
Total espermatozoides/eyaculado	ns	ns	-	-	-
Motilidad de masa	ns	0,01	-	-	-
Espermatozoides móviles	ns	0,003	0,07	ns	ns
Espermatozoides con motilidad progresiva	ns	0,007	ns	ns	ns
Espermatozoides con membrana funcional	ns	0,0003	ns	ns	0,09
Espermatozoides con morfología normal	ns	ns	ns	ns	ns
Espermatozoides con acrosoma íntegro	ns	ns	ns	ns	0,02

Nota: ns, no significativo.

La concentración espermática fue mayor en los chivos del GeCG que en el GCon en el Día 54 ($2215,4 \pm 298,3 \times 10^6$ espermatozoides/mL vs $759,0 \pm 314,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL; $P = 0,001$). El porcentaje de espermatozoides móviles y el de espermatozoides con motilidad progresiva del semen fresco fue mayor en el GeCG que en el GCon en el Día 6 ($P = 0,006$ y $P = 0,01$; respectivamente) (Figura 2a y 2b; respectivamente). En el Día 14, ambas características fueron mayores en el GeCG que en los chivos del GCon ($P = 0,001$ y $P = 0,002$; respectivamente) (Figura 2a y 2b; respectivamente). El porcentaje de espermatozoides móviles luego de la descongelación tendió a ser mayor en los chivos del GeCG que en los del GCon ($32,0 \pm 1,5\%$ vs $27,9 \pm 1,6\%$; $P = 0,07$). El porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro luego de la descongelación fue mayor en el GCon que en los chivos del GeCG en los Días 22 y 47 ($74,9 \pm 1,9\%$ vs $69,2 \pm 1,7\%$; $P = 0,03$ y $78,4 \pm 1,8\%$ vs $73,2 \pm 1,7\%$; $P = 0,04$; respectivamente).

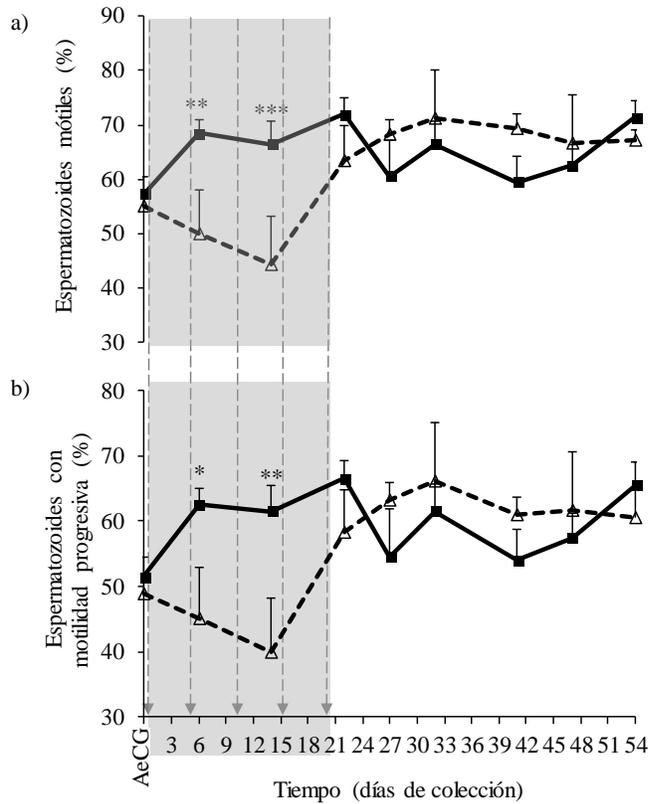


Figura 2. (a) Porcentaje de espermatozoides móviles y (b) porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva de muestras seminales colectadas de chivos adultos tratados (- ■ -) o no tratados (--Δ--) con eCG durante la estación no reproductiva. Día 0 = primer día de administración de eCG. La barra gris indica el período de la administración de eCG, las flechas punteadas indican el momento de cada administración de eCG (5 dosis: Día 0 = 800 UI, Días 5, 10, 15 and 20 = 500 UI cada día). * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; P*** $\leq 0,001$ y †: $0,05 > P \leq 0,1$.

Resultados estación reproductiva (Publicación II)

La concentración de anticuerpos anti-eCG fue mayor en los chivos del GeCG que en el GCon ($181,7 \pm 61,3$ ng/ μ L vs $31,2 \pm 10,7$ ng/ μ L; respectivamente, $P = 0,04$). Sin embargo, el tratamiento no modificó la concentración de testosterona, el tamaño y el fluido testicular, las características de semen fresco o descongelado, ni la CR.

Resultados de morfometría espermática (datos no publicados)

Durante la estación no reproductiva, la longitud de la cabeza de los espermatozoides tendió a ser mayor en el GCon que en el GeCG (Tabla 2). Hubo interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P = 0,04$): la longitud de la cabeza de los espermatozoides fue mayor en el GCon que en el GeCG los Días 41 y 47 ($7,78 \pm 0,11 \mu\text{m}$ vs $7,29 \pm 0,10 \mu\text{m}$; $P = 0,001$ y $7,96 \pm 0,11 \mu\text{m}$ vs $7,66 \pm 0,10 \mu\text{m}$; $P = 0,05$; respectivamente). El tratamiento modificó el ancho, área y perímetro de la cabeza de los espermatozoides, siendo mayor en el GCon que en el GeCG (Tabla 2), pero no hubo interacción entre el tratamiento y el tiempo. El tratamiento no modificó la forma elíptica, la rugosidad, la elongación ni la regularidad. Hubo interacción entre el tratamiento y el tiempo en la forma elíptica y en la elongación ($P = 0,01$ para ambas variables): siendo mayor en el GCon que en el GeCG el Día 41 ($2,00 \pm 0,02$ vs $1,92 \pm 0,02$; $P = 0,02$; $0,33 \pm 0,005$ vs $0,31 \pm 0,005$; $P = 0,02$; respectivamente). Además, existió interacción entre tratamiento y tiempo en la rugosidad ($P = 0,008$): siendo más rugosa la cabeza de los espermatozoides del GeCG que la del GCon en el Día 41 ($0,79 \pm 0,004$ vs $0,78 \pm 0,004$; $P = 0,01$). La regularidad de la cabeza de los espermatozoides tendió a presentar una interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P = 0,07$). Durante la siguiente estación reproductiva, el tratamiento anterior no modificó ninguna característica de tamaño o forma de los espermatozoides (Tabla 2). Tampoco hubo interacción entre tratamiento y tiempo.

Tabla 2. Características morfométricas (tamaño y forma) de la cabeza de los espermatozoides durante la estación no reproductiva y durante la estación reproductiva de chivos tratados (GeCG, 5 dosis: Día 0 = 800 UI, Día 5, 10, 15 y 20 = 500 UI cada día) o no (GCon) con eCG durante la estación no reproductiva.

Características morfométricas	Estación no reproductiva			Estación reproductiva		
	GCon	GeCG	P	GCon	GeCG	P
<i>Tamaño</i>						
Longitud (μm)	7,92 \pm 0,06	7,77 \pm 0,06	0,09	8,57 \pm 0,06	8,55 \pm 0,06	ns
Ancho (μm)	4,04 \pm 0,02	3,97 \pm 0,02	0,02	4,52 \pm 0,02	4,51 \pm 0,02	ns
Área (μm^2)	26,57 \pm 0,23	25,63 \pm 0,23	0,01	32,08 \pm 0,30	31,88 \pm 0,28	ns
Perímetro (μm)	20,56 \pm 0,12	20,17 \pm 0,11	0,03	22,52 \pm 0,12	22,44 \pm 0,11	ns
<i>Forma</i>						
Elíptica	1,97 \pm 0,02	1,96 \pm 0,02	ns	1,89 \pm 0,01	1,89 \pm 0,01	ns
Rugosidad	0,79 \pm 0,003	0,79 \pm 0,003	ns	0,79 \pm 0,002	0,79 \pm 0,002	ns
Elongación	0,32 \pm 0,004	0,32 \pm 0,004	ns	0,31 \pm 0,004	0,31 \pm 0,003	ns
Regularidad	0,95 \pm 0,0003	0,94 \pm 0,0003	ns	0,95 \pm 0,0003	0,95 \pm 0,0003	ns

Nota: ns, no significativo.

5.2. Experimento II (Publicación III)

Administración de diferentes dosis de eCG a carneros durante la estación no reproductiva

Objetivo específico

Comparar la efectividad de administrar diferentes dosis de eCG (400 o 700 UI) durante la estación no reproductiva en la concentración sérica de testosterona, en las características testiculares y en la calidad del semen fresco de carneros.

Materiales y métodos

Animales y su manejo

El experimento II se realizó en un predio particular en el Departamento de Paysandú, Uruguay (32°21' S) durante el mes de setiembre. El manejo de los animales y el protocolo experimental fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Veterinaria (Universidad de la República, Montevideo, Uruguay). Se utilizaron 27 carneros Merilín divididos en 3 grupos: un grupo que fue tratado con 400 UI de eCG (eCG400, n = 10), otro grupo con 700 UI de eCG (eCG700; n = 8), y un tercer grupo que no recibió tratamiento (CON; n = 9). A los carneros tratados se les administró en total 3 dosis de eCG, cada una con un intervalo de 6 días.

Evaluaciones realizadas

Las evaluaciones comenzaron 5 días antes de la primera administración, y continuaron durante 1 mes (Días -4, -1, 3, 6, 9, 12, 15, 22; considerando el Día 0 como el día de la primera dosis de eCG). Se colectaron muestras sanguíneas para determinar la concentración sérica de testosterona y muestras seminales. Se midió el tamaño testicular y se determinó la consistencia testicular (escala 1- 5, siendo 1 flácido y 5 muy firme) y la hiperemia inguinal (interior de las patas traseras) y abdominal (inmediatamente por encima del escroto) (escala 1- 5, siendo 1: pálido, 2: rosado, 3: rojo, 4: muy rojo y 5: morado) según Pérez-Clariget et al. (1998). Los

valores medios de los datos recogidos de la hiperemia de las dos regiones (abdomen e ingle) se calcularon y utilizaron para el análisis estadístico.

Análisis estadístico

Los datos fueron comparados mediante un modelo mixto considerando los tratamientos (eCG400, eCG700 o CON) y la interacción entre tratamiento y tiempo como efectos principales. El animal fue considerado como un factor aleatorio dentro de cada grupo. Cuando se colectó más de un dato de la misma variable antes del Día 0, se utilizó la media de esos datos para los análisis, la que se presenta como AeCG. Los datos se presentan como media de mínimos cuadrados \pm EE. Se consideró diferencia significativa cuando $P \leq 0,05$ y tendencia cuando $0,05 > P \geq 0,1$.

Resultados

El tratamiento modificó la concentración de testosterona ($P < 0,0001$), siendo mayor en el grupo eCG700 en comparación con los carneros del grupo eCG400 y CON ($P < 0,0001$; Figura 3). Además, eCG400 presentó mayor concentración de testosterona que los carneros CON ($P = 0,0002$; Figura 3). Hubo interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P < 0,0001$): la concentración de testosterona fue mayor en el grupo eCG700 que en el eCG400 desde el Día 3 al 15 ($P < 0,03$; Figura 3), y fue mayor que en el grupo CON en los Días 3, 6, 9, y 15 ($P < 0,04$; Figura 3). Además, el grupo eCG400 mostró mayor concentración de testosterona que el grupo CON en los Días 3, 9 y 15 ($P < 0,0001$; Figura 3).

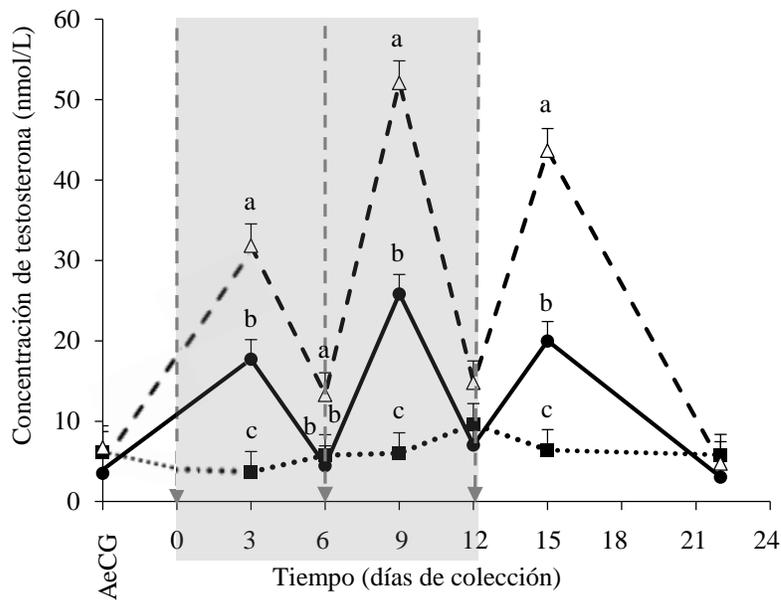


Figura 3. Concentración sérica de testosterona de carneros adultos tratados con 700 UI de eCG (-Δ-), con 400 UI de eCG (-●-), o no tratados (-■-). Día 0: primera administración de eCG. La barra gris indica el período de la administración de eCG, y las flechas punteadas indican los momentos en que se administró cada dosis de eCG (3 dosis: día 0, 6 y 12). AeCG: antes de administrar la eCG. Diferencias entre grupos ($P \leq 0,05$) en el mismo día son presentadas con diferentes letras. En el punto que corresponde a AeCG, y en los Días 12 y 22 no existieron diferencias significativas en el mismo tiempo entre grupos.

El tratamiento hormonal sólo modificó el volumen seminal ($P < 0,02$): siendo mayor en el grupo eCG700 que en los carneros del grupo eCG400 ($2,4 \pm 0,2$ mL vs $1,7 \pm 0,2$ mL; $P = 0,02$; respectivamente) y CON ($2,4 \pm 0,2$ mL vs $1,6 \pm 0,2$ mL; $P = 0,01$; respectivamente).

5.3. Experimento III (Publicación III)

Administración de eCG durante la estación no reproductiva a carneros de dos razas originadas en diferentes latitudes

Objetivo específico

Comparar la respuesta a la administración de eCG en la calidad del semen fresco y descongelado, en el tamaño testicular, así como en el despliegue del comportamiento sexual en carneros de dos razas originadas en latitudes diferentes y por tanto con un patrón estacional diferente.

Materiales y métodos

Animales y su manejo

El tercer experimento se realizó durante el mes de noviembre en la Estación Experimental Agropecuaria Balcarce del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Balcarce, Argentina) (37°50' S). El manejo de los animales y el protocolo experimental de este trabajo fue aprobado por el Comité Internacional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE INTA CeRBAS). Se utilizaron carneros adultos de dos razas diferentes, originadas en dos regiones diferentes: 15 Highlander (HL; raza poco estacional) y 17 Texel (TEX; raza muy estacional). De estos, 8 HL y 9 TEX recibieron 2 dosis de 1000 UI de eCG (Novormon, Syntex, Uruguay) (HLeCG y TEXeCG) en el Día 0 y 5, el resto permaneció como grupo control (CON).

Evaluaciones realizadas

Se midió el tamaño testicular y se colectó semen mediante electroeyaculación 7 y 5 días antes de la administración de eCG, y luego en forma semanal durante tres semanas. Se midió el volumen del eyaculado y se determinó la concentración espermática y se calculó el total de espermatozoides en el eyaculado. También se determinó el porcentaje de espermatozoides móviles, con motilidad progresiva, con membrana funcional (test de endosmosis) e integra (tinción de eosina-nigrosina). Las muestras seminales se diluyeron con Tris, ácido cítrico,

glucosa, yema de huevo (10%) y glicerol (7%) y se congelaron a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se calculó la CR de la misma forma que en el Experimento I. Se realizaron tests de comportamiento sexual frente a una hembra con celo inducido (utilizando una esponja intravaginal conteniendo 60 mg de medroxiprogesterona durante 6 días, el día previo a realizar el test se retiró la esponja y se le administró 0,1 mg de benzoato de estradiol i/m cada 12 h) los Días -3, 3, 8 y 17 (se consideró el día 0 como el día en que se administró la primera dosis de eCG). Para ello se enfrentó a cada macho individualmente a una hembra, y durante 20 min se registró la cantidad de olfateos anogenitales, flehmen, acercamientos laterales, intentos de monta, montas, montas con eyaculación, así como los tiempos de las montas con eyaculación. Todos los tests fueron realizados intercalando animales de los diferentes tratamientos.

Análisis estadístico

Los datos fueron comparados mediante un modelo mixto en base a un arreglo factorial 2×2 , considerando el tratamiento (tratados o no con eCG), la raza (HL vs TEX) y la interacción entre tratamiento con eCG y la raza entre el tratamiento con eCG y el tiempo como efectos principales. Cuando se colectó más de un dato de la misma variable antes del Día 0, se utilizó la media de esos datos para los análisis, la que se presenta como AeCG. Los datos se presentan como media de mínimos cuadrados \pm EE. Se consideró diferencia significativa cuando $P \leq 0,05$ y tendencia cuando $0,05 > P \geq 0,1$.

Resultados

Los valores de las medias de las características del semen fresco, descongelado, y la CR, así como los efectos principales del tratamiento, raza, la interacción entre tratamiento y raza y entre tratamiento y tiempo de todas las variables se presenta en la Tabla 3. A continuación se presentan sólo los resultados más relevantes que dieron diferencias significativas. El volumen seminal y el total de espermatozoides en el eyaculado fueron mayores en los carneros HL que en los TEX (Tabla 3). La motilidad de masa tendió a ser mayor en los carneros no tratados que en los tratados con eCG (Tabla 3). Además, hubo interacción entre el tratamiento con eCG y el tiempo: la motilidad de masa fue mayor en los carneros no tratados que en los tratados con eCG en el Día 7 ($2,3 \pm 0,3$ vs $1,5 \pm 0,3$; respectivamente, $P = 0,03$). Hubo una interacción entre el

tratamiento y la raza en el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva: éste tendió a ser mayor en los carneros TEX control que en los TEXeCG ($69,8 \pm 2,1\%$ vs $64,8 \pm 1,9\%$; $P = 0,09$), y en los TEX control que en los HL control ($69,8 \pm 2,1\%$ vs $64,1 \pm 2,1\%$; $P = 0,06$). El porcentaje de espermatozoides con membrana funcional fue mayor en los carneros TEX que en los HL (Tabla 3). Hubo interacción entre el tratamiento y el tiempo (Tabla 3) en el porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra: ésta fue mayor en los carneros CON en comparación con los tratados con eCG en el Día 2 ($78,4 \pm 3,6\%$ vs $66,1 \pm 3,4\%$; $P = 0,01$).

Luego de la descongelación el porcentaje de espermatozoides móviles tendió a ser mayor en los carneros TEX que en los HL (Tabla 3). Además, existió una interacción entre tratamiento y tiempo: el porcentaje de espermatozoides móviles tendió a ser mayor en los carneros tratados con eCG que en los carneros CON en el Día 7 ($50,8 \pm 3,7\%$ vs $40,7 \pm 3,7\%$, $P = 0,06$). El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y con membrana funcional fue mayor en los carneros TEX que en los HL (Tabla 3). Existió una interacción entre los tratamientos y el tiempo en la CR del porcentaje de espermatozoides móviles (Tabla 3): éste fue mayor en carneros tratados que en los CON en el Día 7 ($72,7 \pm 4,6\%$ vs $56,4 \pm 4,6\%$, respectivamente; $P = 0,01$). La CR del porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva tendió a ser mayor en los carneros TEX que en los HL (Tabla 3). Además, hubo una interacción entre los tratamientos y el tiempo (Tabla 3): éste fue mayor en los carneros tratados que en los CON en el Día 7 ($65,1 \pm 4,6\%$ vs $49,9 \pm 4,6\%$; respectivamente; $P = 0,01$). La CR del porcentaje de espermatozoides con la membrana íntegra tendió a ser mayor en los carneros tratados con eCG que en los CON (Tabla 3).

Los valores de las medias de los comportamientos sexuales, así como los efectos principales entre tratamientos y raza se presentan en la Tabla 4. A continuación se presentan sólo los resultados más relevantes que dieron diferencias significativas. Hubo mayor cantidad de olfateos anogenitales en los carneros TEX que en los HL (Tabla 4). El tiempo necesario para lograr la primera eyaculación fue menor en los carneros HL que en los TEX (Tabla 4). Los carneros tratados con eCG realizaron su segunda y tercera eyaculación antes que los carneros CON (Tabla 4). Existió una interacción entre los tratamientos y el tiempo en el tiempo necesario para producir la tercera eyaculación: carneros tratados con eCG tuvieron su tercera eyaculación antes que los carneros CON en el Día 16 ($714,5 \pm 129,9$ s vs $1131,7 \pm 160,4$ s; $P = 0,05$).

Tabla 3. Valores de las medias (medias \pm EE), y el efecto entre tratamiento (no tratado o tratados con eCG) y entre raza (Highlander o Texel) de semen fresco, descongelado y de la crioresistencia de carneros tratados con dos dosis de 1000 UI de eCG o no tratados durante la estación no reproductiva.

Característica	No tratado	Tratado	P Tratamiento	HL	TEX	P Razas
<i>Semen fresco</i>						
Volumen (mL)	1,2 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	ns	1,4 \pm 0,1	1,1 \pm 0,09	0,009
Concentración (mL)	1,8 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1	ns	1,8 \pm 0,1	1,6 \pm 0,1	ns
Total de espermatozoides/eyaculado (x10 ⁶)	2416,9 \pm 304,6	2520 \pm 292,1	ns	2911,9 \pm 307,9	2025,1 \pm 288,5	0,04
Motilidad masal (0-5)	2,5 \pm 0,2	2,2 \pm 0,1	0,1	2,3 \pm 0,2	2,3 \pm 0,1	ns
Espermatozoides móviles (%)	70,0 \pm 1,5	69,3 \pm 1,4	ns	68,3 \pm 1,5	70,7 \pm 1,4	ns
Espermatozoides con motilidad progresiva (%)	66,9 \pm 1,5	66,3 \pm 1,4	ns	65,9 \pm 1,5	67,3 \pm 1,4	ns
Espermatozoides con membrana funcional (%)	70,0 \pm 1,7	66,6 \pm 1,6	ns	65,6 \pm 1,7	70,9 \pm 1,6	0,03
Espermatozoides con membrana íntegra (%)	79,9 \pm 1,9	79,3 \pm 1,8	ns	79,6 \pm 1,9	79,6 \pm 2,8	ns
<i>Semen descongelado</i>						
Espermatozoides móviles (%)	42,2 \pm 1,8	41,9 \pm 1,8	ns	40,5 \pm 1,8	44,1 \pm 1,8	0,1
Espermatozoides con motilidad progresiva (%)	35,2 \pm 1,7	34,5 \pm 1,7	ns	32,1 \pm 1,7	37,5 \pm 1,7	0,03
Espermatozoides con membrana funcional (%)	33,3 \pm 1,4	33,7 \pm 1,4	ns	30,4 \pm 1,5	36,6 \pm 1,4	0,005
Espermatozoides con membrana íntegra (%)	34,2 \pm 2,4	39,5 \pm 2,3	0,1	35,7 \pm 2,4	37,9 \pm 2,3	ns
<i>Crioresistencia</i>						
Espermatozoides móviles (%)	59,6 \pm 2,2	60,0 \pm 2,2	ns	58,3 \pm 2,2	61,3 \pm 2,2	ns
Espermatozoides con motilidad progresiva (%)	51,9 \pm 2,3	52,5 \pm 2,2	ns	49,8 \pm 2,2	54,5 \pm 2,3	0,1
Espermatozoides con membrana funcional (%)	48,1 \pm 2,0	50,4 \pm 2,0	ns	47,4 \pm 2,0	51,0 \pm 2,0	ns
Espermatozoides con membrana íntegra (%)	43,4 \pm 3,1	49,7 \pm 3,0	0,1	46,2 \pm 3,1	46,8 \pm 3,0	ns

Nota. P: *p* valor. HL: carneros highlander. TEX: carneros texe. ns: no significativo. Tratamientos*Razas: interacción entre tratamientos y razas. Tratamientos*Tiempo: interacción entre tratamientos y tiempo.

Tabla 4. Valores de las medias (medias \pm EE), así como el efecto entre tratamiento (no tratado o tratados con eCG) y entre raza (Highlander o Texel) del comportamiento sexual de carneros tratados con dos dosis de 1000 UI de eCG o no tratados durante la estación no reproductiva.

	No tratado	Tratado	HL	TEX	Tratamientos	Razas	Tratamientos*Razas	Tratamientos*Tiempo
<i>Cantidad de comportamientos sexuales</i>								
Olfateo anogenital	19,1 \pm 1,5	17,6 \pm 1,5	14,1 \pm 1,5	22,7 \pm 1,4	ns	0,0003	ns	0,02
Montas (sin eyaculación)	12,4 \pm 4,1	12,0 \pm 3,9	13,9 \pm 4,2	10s,4 \pm 3,8	ns	ns	ns	0,0005
Acercamientos laterales	47,9 \pm 17,9	72,1 \pm 16,9	47,6 \pm 18,3	72,5 \pm 16,6	ns	ns	ns	ns
Flehmen	2,1 \pm 0,9	2,4 \pm 0,9	1,5 \pm 0,9	2,9 \pm 0,9	ns	ns	ns	ns
Montas con eyaculación	16,5 \pm 8,0	2,6 \pm 7,5	3,8 \pm 8,1	15,3 \pm 7,4	ns	ns	ns	ns
Intentos de monta	3,5 \pm 0,8	3,9 \pm 0,7	3,6 \pm 0,8	3,7 \pm 0,7	ns	ns	ns	0,09
<i>Tiempo en alcanzar la eyaculación</i>								
Primera eyaculación	167,7 \pm 25,0	143,7 \pm 23,9	120,4 \pm 25,1	191,1 \pm 23,9	ns	0,05	ns	ns
Segunda eyaculación	567,3 \pm 44,9	353,2 \pm 41,1	448,1 \pm 45,2	472,4 \pm 40,9	0,001	ns	ns	ns
Tercera eyaculación	750,1 \pm 54,1	590,5 \pm 40,7	703,8 \pm 46,9	636,8 \pm 48,8	0,02	ns	ns	0,02

Nota. P: *p* valor. HL: carneros highlander. TEX: carneros texel. ns: no significativo. Tratamientos*Razas: interacción entre tratamientos y razas. Tratamientos*Tiempo: interacción entre tratamientos y tiempo.

6. Discusión general

Si bien hasta la fecha se había demostrado que los tratamientos con eCG inducen aumentos en la concentración de testosterona y mejoran el comportamiento sexual de los machos de varias especies (Hochereau-de-Reviere et al., 1990; Price et al., 1991; Ungerfeld et al., 2014; 2019), éstos son los primeros trabajos en los que se demostró que la administración eCG también mejora las características seminales de los chivos durante la estación no reproductiva. A partir de los resultados de esta Tesis se demostró que la administración de eCG a chivos durante la estación no reproductiva induce un aumento en la concentración sérica de testosterona y mejora la calidad tanto del semen fresco como del descongelado (Experimento I). Sin embargo, la administración de eCG a carneros, al menos en las condiciones utilizadas en el Experimento II y III no produjeron efectos positivos de alto impacto en su estado reproductivo. Aunque hubo aumentos importantes en la secreción de testosterona, en carneros (Experimento II) no se observaron efectos positivos en las características testiculares ni en la calidad seminal (Experimento II y III). Sin embargo, aunque los resultados obtenidos en chivos son alentadores y podrían abrir perspectivas interesantes sobre el uso de eCG para mejorar el desempeño reproductivo de los machos durante la estación no reproductiva, la falta de resultados en carneros hace tomar estos resultados con cautela. En este sentido, se recomienda probar otros protocolos de administración hormonal, incluyendo posibles modificaciones en las dosis e intervalos utilizados en estos estudios con el fin de mejorar la calidad seminal de los machos, o por el contrario, descartar su uso si la misma no produce buenos resultados.

En concordancia con la primera hipótesis planteada en esta Tesis, la administración de cinco dosis de eCG a chivos durante la estación no reproductiva aumentó la concentración de testosterona, y de los anticuerpos anti-eCG, además de mejorar ciertas características seminales. En base a esto, y considerando que los chivos tienen importantes cambios reproductivos estacionales, incluyendo la calidad del semen (Chemineau & Delgadillo, 1993), el tratamiento realizado con eCG podría utilizarse de manera efectiva para prolongar los períodos del uso de chivos como reproductores o prolongar los periodos de colección seminal en el año. En este sentido, el tratamiento con eCG aumentó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, que es una de las variables más vinculada con la fertilidad (Leboeuf et al., 2000). Por

otro lado, hay que tener en cuenta que los resultados positivos se observaron solo en algunos parámetros y requirieron la administración repetida de eCG, por lo que sería importante realizar estudios con más animales, modificaciones en las dosis e intervalos utilizados en este estudio, y evaluar los resultados de fertilidad del semen mejorado.

Como era de esperar, la concentración sérica de testosterona aumentó inmediatamente después de la primera administración de eCG y se mantuvo elevada durante todo el período de administración de la hormona en forma similar a lo que había sido reportado durante períodos más cortos en carneros (Ungerfeld et al., 2014; 2019). Más aún, la concentración de testosterona alcanzó valores similares, o incluso mayores que los reportados para esta raza durante la estación reproductiva (Giriboni et al., 2017). Además, como ocurre en las cabras (Roy et al., 1999), la administración de eCG indujo una alta concentración de anticuerpos anti-eCG. Sin embargo, a pesar de que la concentración de anticuerpos aún seguía elevada luego de 3 meses de realizado el tratamiento y que se ha demostrado que los tratamientos con eCG se asocian con una disminución en la fertilidad en las cabras (Drion et al., 2001), no hubo efectos negativos relacionados con la presencia de anticuerpos anti-eCG en la concentración de testosterona, en las características testiculares, o en la calidad del semen fresco o su CR durante la siguiente estación reproductiva. Esto es extremadamente alentador, ya que sugiere que el tratamiento con eCG podría utilizarse para mejorar las características reproductivas de los chivos durante la estación no reproductiva, sin ningún efecto negativo sobre estas características reproductivas al menos durante la siguiente estación reproductiva.

Se debe resaltar que la respuesta positiva a la administración de eCG se observó muy rápido luego de la primera administración, y también terminó inmediatamente después de la administración de la última dosis. Dicha respuesta positiva no sólo se observó en el semen fresco, sino que luego de la criopreservación algunas variables espermáticas tendieron a ser mayores en los chivos tratados con la hormona. Esto último puede estar relacionado con el menor tamaño de la cabeza de los espermatozoides encontrado en los machos que fueron tratados con eCG, ya que en otras especies, como el ciervo rojo, se demostró que los machos caracterizados por producir un semen más resistente a la congelación producen espermatozoides de menor tamaño (Esteso et al., 2006). Sin embargo, esto no solo no fue ratificado en carneros, sino que las muestras seminales que resistieron mejor la congelación fueron aquellas con

mayores dimensiones de la cabeza de los espermatozoides (Martínez-Fresneda et al., 2019). A su vez, dado que la espermatogénesis en chivos requiere aproximadamente 48 días (França et al., 1999), pero la respuesta fue inmediata, el efecto principal de la eCG parece haber ocurrido a nivel epididimario, donde se encuentran almacenados los espermatozoides en el epidídimo, o tras el contacto con el plasma seminal durante la eyaculación. Por tanto, es probable que el tratamiento influyera a nivel del funcionamiento epididimario y/o de la composición del plasma seminal. El hecho de no sostener los resultados positivos luego de finalizado el tratamiento implica que probablemente no hubo efectos benéficos en el proceso espermatogénico. El aumento en las concentraciones de testosterona puede haber desencadenado cambios en la composición plasmática seminal beneficiosa para la calidad espermática (Matsuoka et al., 2006), haciéndolos más resistentes a un proceso de criopreservación. También es posible que los estrógenos producidos a partir de la testosterona secretada por los testículos (Shayu & Rao, 2006) pueda haber mejorado la motilidad del semen (Carreau et al., 2007). Además, como los espermatozoides de algunas especies tienen receptores de andrógenos y estrógenos (Jin et al., 2005; Solakidi et al., 2005), es posible que estas hormonas promuevan directamente la motilidad de los espermatozoides. Además, la eCG podría haber actuado directamente en el epidídimo (Zhang et al., 1997; Dahia & Rao, 2006), las vesículas seminales (Tao et al., 1998), las glándulas bulbouretrales y la próstata (Reiter et al., 1995) actuando a través de los receptores para FSH y LH de estos órganos, modificando la composición del plasma seminal, y repercutiendo en la calidad seminal.

La disminución del tamaño de la cabeza de los espermatozoides en el GeCG puede estar relacionado con la concentración de testosterona. En este sentido, se ha observado que en chivos luego de la inducción de bajas concentraciones de testosterona, aumentan las dimensiones morfométricas de la cabeza de los espermatozoides (Flores-Gil et al., 2020). Esto concuerda con lo observado en este trabajo, en que luego de un aumento de testosterona, disminuyeron las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides. Por el contrario, en carneros al final de la estación reproductiva, es decir luego de un aumento de la concentración de testosterona, aumentó el área de la cabeza de los espermatozoides (Martínez-Fresneda et al., 2019). En los trabajos referidos la información se recabó a largo plazo, luego de un ciclo espermatogénico completo, por lo que la testosterona pudo haber influido durante todas sus etapas, incluyendo la

espermiogénesis. En el Experimento I de esta tesis, las diferencias se observaron entre los 41 y 47 días luego de comenzado el tratamiento, lo cual corresponde aproximadamente a la cantidad de días necesarios para que ocurra un ciclo espermatogénico (aproximadamente 48 días de acuerdo a França et al., 1999). Sin embargo, hay que tener presente que luego de la formación de los espermatozoides, los mismos deben madurar en el epidídimo, lugar donde también van a ser almacenados (Robaire et al., 2006), y donde también actúan los andrógenos (Robaire et al., 2006; revisión: Robaire & Hamzeh, 2011), modificando el ambiente en el que maduran los espermatozoides. El tiempo durante el que los espermatozoides transitan por el epidídimo puede variar en función de la especie y la frecuencia de las eyaculaciones, pero es siempre mayor a 10 días (Robaire et al., 2006). En base a esto y a que la espermiogénesis en los chivos dura aproximadamente 15 días (França et al., 1999), es de esperar que los espermatozoides colectados los Días 41 y 47 hallan estado influenciados por el aumento de testosterona mientras se encontraban en esta etapa. A su vez, dada la escasa literatura encontrada sobre la temática y los resultados contradictorios que se desprenden de los trabajos citados en chivos y carneros se puede también especular que la disminución de testosterona observada luego de culminado el tratamiento, mientras los espermatozoides se encontraban en el epidídimo no serían la principal causa que explique las diferencias observadas. Sin embargo, se debe considerar que la concentración de testosterona los Días 39 y 45 tendió a ser mayor en el GeCG, lo cual también pudo haber incidido en el tamaño espermático. En síntesis, está información sienta bases para plantear nuevos trabajos dirigidos en forma específica a entender mejor la relación entre los momentos en que varía la concentración de testosterona y el tamaño de la cabeza de los espermatozoides.

Los resultados del Experimento II no confirman la hipótesis planteada para este experimento, ya que la administración de 400 o 700 UI de eCG no mejoraron el desempeño reproductivo de los machos. Además, tampoco hubo diferencias de acuerdo a la dosis administrada. Si bien se produjo un aumento de la concentración de testosterona, no se observaron efectos positivos sobre las características reproductivas evaluadas. Esto podría ser parcialmente explicado por el intervalo de administración de las dosis de eCG. En efecto, mientras que en el Experimento I se obtuvieron efectos positivos administrando la hormona cada 5 días, en éste la misma se administró cada 6 días. Si bien la frecuencia de administración se definió de acuerdo con el

período en el cual se puede detectar en la sangre de los rumiantes (aproximadamente 10 días, Menzer & Schams, 1979; ver revisión: Murphy & Martinuk, 1991; Murphy, 2012), es posible que los tiempos de metabolización de la eCG difieran entre carneros y chivos, aunque no fue posible encontrar bibliografía al respecto. De hecho, mientras que en los chivos la concentración de testosterona permaneció elevada durante todo el tratamiento, en este estudio en carneros aumentó y disminuyó en varias ocasiones. En la misma dirección, en los estudios previos en los que la administración de eCG fue efectiva para mejorar el desempeño reproductivo de los carneros, la administración de la hormona se realizó cada 4 días (Ungerfeld et al., 2014, 2019). Aunque las disminuciones en las concentraciones de testosterona pueden tener diferentes explicaciones, desafortunadamente, no hay estudios que comparen la farmacocinética de la eCG en estas especies, ni específicamente en machos.

A diferencia del Experimento I en el cual hubo efectos positivos del tratamiento con eCG sobre la motilidad espermática de los chivos, en el Experimento II el tratamiento con eCG no modificó las características seminales evaluadas, lo que estaría indicando que la estimulación no fue suficiente para producir efectos positivos sobre el semen de éstos carneros. Sin embargo, antes de descartar el posible uso de eCG en carneros, sería interesante realizar estudios administrando la hormona más cerca del inicio de la estación reproductiva o al final de la misma para determinar si es posible prolongar el período del año en el que se puede obtener semen de mejor calidad.

Los resultados del Experimento III no confirman en forma clara la tercera hipótesis, en la que se planteaba que la administración de eCG generaría efectos más claros en los carneros de razas menos estacionales. En este sentido, aunque el estudio se realizó a mediados de primavera cuando es de esperar que los machos produzcan semen de mala calidad (Colas et al., 1986; información no publicada generada en INTA, Balcarce), los carneros tenían un porcentaje llamativamente alto de espermatozoides móviles (la motilidad era de ~ 70%). Es posible que este resultado inesperado limitó el impacto positivo de la eCG, ya que la mejora debería ser muy alta para lograr diferencias significativas. Sumado a esto, los carneros HL no presentaron mejores resultados que los TEX, y más aún, algunas características evaluadas fueron mejores en los TEX que en los HL. En este sentido, se recomienda testear la hormona en otras razas de las que se tenga mayor información sobre su estacionalidad reproductiva con el fin de administrar la

hormona previo a que las características seminales de los machos comiencen a mejorar y de esa forma determinar si el tratamiento funciona o no en los carneros.

Los pocos efectos positivos que generó la administración de eCG sobre el comportamiento sexual de los carneros van en la misma dirección que lo reportado por Ungerfeld et al. (2019). Sin embargo, mientras que en este último se observaron efectos positivos en la fase de cortejo (Fabre-Nys, 2010), en el presente estudio, la eCG disminuyó el tiempo en el cual se produjeron la segunda y la tercera monta. Esta diferencia puede estar relacionada con la experiencia sexual de los carneros, ya que en el trabajo de Ungerfeld et al. (2019) los machos utilizados no tenían experiencia previa, y, por lo tanto, estaban aprendiendo a cortejar a las hembras, mientras que en este estudio eran carneros experimentados. Los carneros con experiencia sexual anterior pueden saltar eventos de cortejo ya que pueden reconocer fácilmente la receptividad de las ovejas, aumentando así su efectividad en la actividad de apareamiento (Simitzis et al., 2006), y por tanto es esperable que los efectos sean mayores en estos comportamientos. En este sentido, aunque la calidad del esperma no se modificó, obtener eyaculados en menor tiempo puede ser importante en carneros utilizados para producción de semen o en programas de inseminación. Sin embargo, para este uso, queda por determinar si la administración repetida de eCG no afecta su efectividad, como sucede en las cabras (Drion et al., 2001), ya que una fuerte respuesta inmune podría perjudicar el desempeño reproductivo de los machos.

En síntesis, los resultados de ésta Tesis aportan información sobre los efectos de administrar eCG para mejorar el potencial reproductivo de los machos durante la estación no reproductiva. Si bien la administración de eCG produjo resultados alentadores en chivos, antes de llegar a una conclusión definitiva, es importante descartar claramente que su uso reiterado pudiera generar efectos negativos. También resta por determinar si los tratamientos repetidos con eCG, durante varias estaciones no reproductivas, tienen algún efecto a largo plazo en los patrones reproductivos de los chivos. Además, dada la falta de resultados positivos en carneros, se debería evaluar si la administración de eCG genera respuestas diferentes de acuerdo a la especie o la raza utilizada, así como el tiempo de administración y dosis para determinar si con esas modificaciones genera buenos resultados en carneros, o si el tratamiento solo tiene efectos positivos en algunas especies como los chivos. En este sentido, cabe destacar que tanto la estacionalidad reproductiva como la respuesta a los tratamientos fotoperiódicos y/o a los

implantes de melatonina utilizados para mejorar las características reproductivas parecen tener un fuerte componente genético, lo que produce variaciones en los resultados en función de la raza en estudio (D'Occhio et al., 1984; Poulton & Robinson, 1987; Gómez-Brunet et al., 2008). Si bien, dichas variaciones se pueden explicar parcialmente en ovejas por el control genético que de la concentración de melatonina plasmática (Zarazaga et al., 1998), es posible que el tratamiento con eCG también produzca modificaciones diferentes en carneros de diferente raza. En base a ello, y antes de descartar su potencial uso sería importante determinar si existe variabilidad genética en la respuesta al tratamiento.

7. Conclusiones

» La administración de cinco dosis (una de 800 UI + 4 de 500 UI) de eCG a chivos de Gabón durante la estación no reproductiva estimuló la secreción de testosterona y mejoró la calidad del semen fresco y posiblemente el semen descongelado durante el período en que se administró la eCG. Sin embargo, los resultados positivos solo se observaron en algunas características seminales y en forma transitoria durante el período de administración de eCG.

» La administración de eCG a chivos indujo la formación de anticuerpos anti-eCG, que permanecieron presentes incluso durante la estación reproductiva siguiente. Sin embargo, no se observaron efectos negativos en el estado reproductivo de los chivos tratados en la concentración de testosterona, en las características testiculares ni en la calidad del semen fresco, descongelado o en su crioresistencia.

» La administración de tres dosis de 400 o 700 UI de eCG a carneros Merilín durante la estación no reproductiva aumentó la concentración de testosterona, pero no modificó las características testiculares y seminales estudiadas.

» La administración de dos dosis de 1000 UI de eCG a carneros Texel y Highlander no aumentó la circunferencia testicular ni la calidad del semen fresco y descongelado. Sin embargo, los carneros tratados con eCG alcanzaron su segunda y tercera eyaculación en un tiempo más corto que los no tratados.

8. Referencias bibliográficas

- Abecia, J.A., Valares, J.A., Forcada, F., Palacin, I., Martin, S., Martino, A., 2007. The effect of melatonin on the reproductive performance of three sheep breeds in Spain. *Small Ruminant Research*, 69, 10–16.
- Ascoli, M., Fanelli, F., Segaloff, D.L., 2002. The lutropin/chorionic gonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocrine Reviews*, 23, 141–174
- Badness, T.J., Powers, J.B., Hastings, M.H., Bittman, E.L., Goldman, B.D., 1993. The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *Journal of Pineal Research*, 15, 161–190.
- Baker, A.A., 1973. Ovum transfer in the cow. *Australian Veterinary Journal*, 49, 424–426.
- Bielli, A., Gastel, T., Pérez, R., López, A., Castrillejo, A., Regueiro, M., Forsberg, M., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H., 1997. Influence of nutrition on seasonal variations in testicular morphology and function in Corriedale rams. *Journal of Reproduction and Development*, 43, 171–180.
- Bodin, L., Drion, P.V., Remy, B., Brice, G., Cognié, Y., Beckers, J.F., 1997. Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronization. *Reproduction Nutrition Development*, 37, 651–660.
- Bousfield, G.R., Butnev, V.Y., Butnev, V.Y., 2001. Identification of twelve O-glycosylation sites in equine chorionic gonadotropin beta and equine luteinizing hormone beta by solid-phase Edman degradation. *Biology of Reproduction*, 64, 136–147.
- Bousfield, G.R., Butnev, V.Y., Gotschall, R.R., Baker, V.L., Moore, W.T., 1996. Structural features of mammalian gonadotropins. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 125, 3–19.
- Cardoso, F.M., Queiroz, G.F., 1988. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and daily sperm production of Brazilian hairy rams. *Animal Reproduction Science*, 17, 77–84.

- Carreau, S., Silandre, D., Bois, C., Bouraima, H., Galeraud-Denis, I., Delalande, C., 2007. Estrogens: a new player in spermatogenesis. *Folia Histochemica Cytobiologica*, 45, 5–10.
- Casao, A., Cebrián, I., Asumpção, M.E., Pérez-Pé, R., Abecia, J.A., Forcada, F., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T., 2010a. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8, 59.
- Casao, A., Vega, S., Palacín, I., Pérez-Pé, R., Laviña, A., Quintín, F.J., Sevilla, E., Abecia, J.A., Cebrián-Pérez, J.A., Forcada, F., Muiño-Blanco, T., 2010b. Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in Rasa Aragonesa rams. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 425–432.
- Casao, A., Pérez-Pé, R., Abecia, J.A., Forcada, F., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.Á., 2013. The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidant defense system of Rasa Aragonesa rams. *Animal Reproduction Science*, 138, 168–174.
- Ceballos, D, Villa, M, 2017. Evaluación y características de la raza Texel. Ganadería. 53. https://inta.gob.ar/sites/default/files/evaluacion_y_caracteristicas_de_la_raza_texel.pdf.
- Chasles, M., Chesneau, D., Moussu, C., Delgadillo, J.A., Chemineau, P., Keller, M., 2016. Sexually active bucks are efficient to stimulate female ovulatory activity during the anestrus season also under temperate latitudes. *Animal Reproduction Science*, 168, 86–91.
- Chemineau, P., Delgadillo, J.A., 1993. Neuroendocrinología de la reproducción en el caprino, [Reproductive neuroendocrinology in goats]. *Revista Científica*, 3, 113–121.

- Chemineau, P., Pelletier, J., Guerin, Y., Colas, G., Ravault, J.P., Toure, G., Almeida, G., Thimonier, J., Ortavant, R., 1988. Photoperiodic and melatonin treatments for the control of seasonal reproduction in sheep and goats. *Reproduction Nutrition Development*, 28, 409–422.
- Christakos, S., Bahl, O.P., 1979. Pregnant mare serum gonadotropin, Purification and physicochemical, biological, and immunological characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 254, 4253–4261.
- Clément, M.T., Lebas, F., Beckers, J.F., Drion, P.V., 2008. Evolution of anti-eCG antibodies in response to eCG doses and number of injections. Relationship with productivity of rabbit does. *Animal*, 2, 746–751.
- Colas, G., Guerin, Y., Lemaire, Y., Montassier, Y., Despierres, J., 1986. Seasonal variation in the testis diameter and sperm morphology in the Vendean ram and Texel ram. *Reproduction, Nutrition, Development*, 26, 863–875.
- Cole, H.H., Bigelow, M., Finkel, J., Rupp, G.R., 1967. Biological half-life of endogenous PMS following hysterectomy and studies on losses in urine and milk. *Endocrinology*, 81, 927–930.
- Courot, M., Hochereau-de-Reviere, M.T., Monet-Kuntz, C., Locatelli, A., Pisselet, C., Blanc, M.R., Dacheux, J.L., 1979. Endocrinology of spermatogenesis in the hypophysectomized ram. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 26, 165–173.
- Courot, M., Ortavant, R., 1981. Endocrine control of spermatogenesis in the ram. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 30, 47–60.

- Dardente, H., Lomet, D., Robert, V., Decourt, C., Beltramo, M., Pellicer-Rubio, M.T., 2016. Seasonal breeding in mammals: From basic science to applications and back. *Theriogenology*, 86, 324–332.
- De Rensis, F., López-Gatius, F., 2014. Use of equine chorionic gonadotrophin to control reproduction of the dairy cow: a review. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 177–182.
- Dahia, C.L., Rao, A.J., 2006. Demonstration of follicle-stimulating hormone receptor in cauda epididymis of rat. *Biology of Reproduction*, 75, 98–106.
- Damm, J.B.L., Hard, K., Kamerling, J.P., van Dedem, G.W.K., Vligenthart, J.F.G., 1990. Structure determination of the major N- and O-linked carbohydrate chains of the Beta subunit from equine chorionic gonadotropin. *European Journal of Biochemistry*, 189, 175–183.
- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Véliz, F.G., Hernández, H., Duarte, G., Vielma, J., Poindron, P., Chemineau, P., Malpoux, B., 2002. Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. *Journal of Animal Science*, 80, 2780–2786.
- D’Occhio M.J, Schanbacher B.D, Kinder J.E, 1984. Profiles of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone and prolactin in rams of diverse breeds: effects of contrasting short (8L:16D) and long (16L:8D) photoperiods. *Biology of Reproduction*, 30, 1039–1054.
- Dominguez, J.M., Hull, E.M., 2005. Dopamine, the medial preoptic area, and male sexual behaviour. *Physiology & Behavior*, 86, 356–368.

- Dominguez, M.P., Falcinelli, A., Hozbor, F., Sanchez, E., Cesari, A., Alberio, R.H., 2008. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*, 69, 564–573.
- Drion, P.V., Furtoss, V., Baril, G., Manfredi, E., Bouvier, F., Pougard, J.L., Brtnrlas, D., Caugnon, P., McNamara, E.M., Remy, B., Sulon, J., Brckers, J.F., Bodin, L., Leboeuf, B., 2001. Four years of induction/synchronization of estrus in dairy goats: effect on the evolution of eCG binding rate in relation with the parameters of reproduction. *Reproduction Nutrition Development*, 41, 401–412.
- Dufau, M.L., 1998. The luteinizing hormone receptor. *Annual Review of Physiology*, 60, 461–496.
- Esteso, M., Fernández-Santos, M.R., Soler, A.J., Quintero-Moreno, A., Garde, J.J., 2006. Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. *Journal of Andrology*, 27, 662–670.
- Fabre-Nys, 2010. Mating behavior. En: Encyclopedia of behavioral neuroscience, 2. Koob, G.F., Le Moal, M., Thompson, R.F. Oxford University Press, USA, pp. 178–185.
- Fitzgerald, J.A., Stellflug, J.N., 1991. Effects of melatonin on seasonal changes in reproduction of rams. *Journal of Animal Science*, 69, 264–275.
- Flores-Gil, V.N., de la Blanca, M.M., Velázquez, R., Toledano-Díaz, A., Santiago-Moreno, J., López-Sebastián, A., 2020. Influence of testosterone administration at the end of the breeding season on sperm cryoresistance in rams (*Ovis aries*) and bucks (*Capra hircus*). *Domestic Animal Endocrinology*, in press.

- França, L.R., Becker-Silva, S.C., Chiarini-Garcia, H., 1999. The length of the cycle of seminiferous epithelium in goats (*Capra hircus*). *Tissue and Cell*, 31, 274–280.
- Gastel, T., Bielli, A., Perez, R., Lopez, 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, 59–75.
- Gerlach, T., Aurich, J.E., 2000. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Animal Reproduction Science*, 58, 197–213.
- Guillon, F., Combarous, Y., 1983. Purification of equine gonadotropins and comparative study of their acid-dissociation and receptor-binding specificity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 755, 229–236.
- Giriboni, J., Lacuesta, L., Ungerfeld, R., 2017. Continuous contact with females in estrus throughout the year enhances testicular activity and improves seminal traits of male goats. *Theriogenology*, 87, 284–289.
- Giriboni, J., Gökdal, Ö., Eren, V., Yaralı, E., Santiago-Moreno, J., Ungerfeld, R., 2019. Daily administration of a GnRH analogue enhances sperm quality in bucks during the non-breeding season. *Animal Reproduction Science*, 200, 43–50.
- Goldman, B.D., 1999. The circadian timing system and reproduction in mammals. *Steroids*, 64, 679–685.
- Gómez-Brunet, A., Santiago-Moreno, J., del Campo, A., Malpoux, B., Chemineau, P., Tortonese, D.J., Gonzalez-Bulnes, A., López-Sebastián, A., 2008. Endogenous circannual cycles of ovarian activity and changes in prolactin and melatonin secretion in wild and domestic female sheep maintained under a long-day photoperiod. *Biology of Reproduction*, 78, 552–562.

- Hafez, E.S., 1952. Studies on the breeding season and reproduction of the ewe Part I. The breeding season in different environments Part II. The breeding season in one locality. *The Journal of Agricultural Science*, 42, 189–231.
- Hafez, E.S.E., 1989. Estudios del semen, En: Reproducción e inseminación artificial en animales 5ª, Ed, México, DF., Edición Interamericana S.A, pp. 205–226.
- Hartree, A.S., Renwick, A.G., 1992. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochemical Journal*, 287, 665.
- Haywood, M., Spaliviero, J., Jimenez, M., King, N.J., Handelsman, D.J., Allan, C.M., 2003. Sertoli and germ cell development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle-stimulating hormone alone or in combination with testosterone. *Endocrinology*, 144, 509–517.
- Hochereau-de Reviers, M.T., Copin, M., Seck, M., Monet-Kuntz, C., Cornu, C., Fontaine, I., Perreau, C., Elsen, J.M., 1990. Stimulation of testosterone production by PMSG injection in the ovine male: effect of breed and age and application to males carrying or not carrying the “F” Booroola gene. *Animal Reproduction Science*, 23, 21–32.
- Hoppen, H.O., 1994. The equine placenta and equine chorionic gonadotrophin—An overview. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 102, 235–243.
- Jin, W., Arai, K.Y., Watanabe, G., Suzuki, A.K., Takahashi, S., Taya, K., 2005. The stimulatory role of estrogen on sperm motility in the male golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Andrology*, 26, 478–484.
- Kawakami, E., Hori, T., Tsutsui, T., 2000. Changes in plasma testosterone and testicular transferrin concentration, testicular histology and semen quality after treatment of

- testosterone-depot plus PMSG to 3 dogs with asthenozoospermia. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62, 203–206.
- Karsch, F.J., Bittman, E.L., Foster, D.L., Goodman, R.L., Legan, S.J., Robinson, J.E., 1984. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Proceedings of the 1983 Laurentian Hormone Conference*. Academic Press, pp. 185–232.
- Karsch, F.J., Malpoux, B., Wayne, N.L., Robinson, J.E., 1988. Characteristics of the melatonin signal that provide the photoperiodic code for timing seasonal reproduction in the ewe. *Reproduction Nutrition Development*, 28, 459–472.
- Kaya, A., Baspinar, N., Yildiz, C., Kurtoglu, F., Ataman, M.B., Haliloglu, S., 2000. Influence of melatonin implantation on sperm quality, biochemical composition of the seminal plasma and plasma testosterone levels in rams. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 151, 1143–1146.
- Kokolis, N., Theodosiadou, E., Tsantarliotou, M., Rekkas, C., Goulas, P., Smokovitis, A., 2000. The effect of melatonin implants on blood testosterone and acrosin activity in spermatozoa of the ram. *Andrologia*, 32, 107–114.
- Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62, 113–141.
- Lincoln, G.A., Short, R.V., 1980. Seasonal breeding: nature's contraceptive. In Proceedings of the 1979. *Laurentian Hormone Conference*. Academic Press, pp. 1-52.
- Malpoux B., 2006. Seasonal regulation of reproduction in mammals, En: Neill JD (ed.), Knobil and Neill's Physiology of reproduction, 3a ed, Amsterdam, Elsevier, pp. 2231–2281.
- Malpoux, B., Migaud, M., Tricoire, H., Chemineau, P., 2001. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *Journal of Biological Rhythms*, 16, 336–347.

- Malpoux, B., Tricoire, H., Mailliet, F., Daveau, A., Migaud, M., Skinner, D.C., Pelletier, J., Chemineau, P., 2002. Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrine mechanisms using the sheep as a model. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, 59, 167–179.
- Malpoux, B., Viguie, C., Skinner, D.C., Thiery, J.C., Pelletier, J., Chemineau, P., 1996. Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. *Animal Reproduction Science*, 42, 109–117.
- Meachem, S., Von Schonfeldt, V., Schlatt, S., 2001. Spermatogonia: stem cells with a great perspective. *Reproduction*, 121, 825–834.
- Martin, G.B., Tjondronegoro, S., Boukhliq, R., Blackberry, M.A., Briegel, J.R., Blache, D., Adams, N.R., 1999. Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of endogenous rhythms by photoperiod. *Reproduction, Fertility and Development*, 11, 355–366.
- Martínez-Fresneda, L., O'Brien, E., Velázquez, R., Toledano-Díaz, A., Martínez-Cáceres, C.M., Tesfaye, D., Schellander, K., García-Vázquez, F.A., Santiago-Moreno, J., 2019. Seasonal variation in sperm freezability associated with changes in testicular germinal epithelium in domestic (*Ovis aries*) and wild (*Ovis musimon*) sheep. *Reproduction, Fertility and Development*, 31, 1545–1557.
- Matsuoka, T., Imai, H., Asakuma, S., Kohno, H., Fukui, Y., 2006. Changes of fructose concentrations in seminal plasma and glucose and testosterone concentrations in blood plasma in rams over the course of a year. *Journal of Reproduction and Development*, 52, 805–810.

- McLachlan, R.I., Wreford, N.G., O'donnell, L., De Kretser, D.M., Robertson, D.M., 1996. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *Journal of Endocrinology*, 148, 1–9.
- Menzer C., Schams D., 1979. Radioimmunoassay for PMSG and its application to *in-vivo* studies. *Journal of Reproduction and Fertility*, 55, 339–345.
- Misztal, T., Romanowicz, K., Barcikowski, B., 2002. Melatonin-a modulator of the GnRH/LH axis in sheep. *Reproductive Biology*, 2, 267–275.
- Mokhtar, D.M., Abd-Elhafeez, H.H., Abou-Elmagd, A., Hassan, A.H., 2016. Melatonin administration induced reactivation in the seminal gland of the soay rams during non-breeding season: An ultrastructural and morphometrical study. *Journal of Morphology*, 277, 231–243.
- Morton, K.M., Maxwell, W.M.C., Evans, G., 2004. The effect of PMSG administration on the growth and development of the reproductive tract of prepubertal ram lambs. *Proceedings of the 15th Congress on Animal Reproduction*, Porto Seguro, Brazil, pp. 233.
- Martinuk, S.D., Manning, A.W., Blak, W.D., Murphy, B.D., 1991. Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological activity of equine chorionic gonadotrophin *in vivo*. *Biology of Reproduction*, 45, 508–604.
- Murphy, B.D., Martinuk., S.D., 1991. Equine chorionic gonadotrophin. *Endocrine Reviews*, 12, 27–44.
- Murphy, B.D, 2012. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Animal Reproduction*, 9, 223–230.

- O'Donnell, L., Robertson, K.M., Jones, M.E., Simpson, E.R., 2001. Estrogen and Spermatogenesis, *Endocrine Reviews*, 22, 289–318.
- Palacín, I., Abecia, J.A., Forcada, F., Casao, A., Cebrián, J.Á., Muiño, T., Palacios, C., Pontes, J.M., 2008. Effects of exogenous melatonin treatment on out-of-season ram fertility. *Italian Journal of Animal Science*, 7, 199–206.
- Patil, S.R., Sonar, A., Londonkar, R., Patil, S.R., Patiu, S.B., 1998. Efficacy of exogenous gonadotropins maintenance of spermatogenesis treated albino rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 42, 509–514.
- Pérez, R.C., Forsberg, M., Rodriguez-Martinez, H., 1998. 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, 35–47.
- Pérez, R., Lopez, A., Castrillejo, A., Bielli, A., Laborde, D., Gastel, T., Tagle, R., Queirolo, D., Forsberg, M., Rodríguez-Martínez, H., 1997. Reproductive seasonality of Corriedale rams under extensive rearing conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 38, 109–117.
- Pérez-Clariget, R., Bermúdez, J., Andersson, H., Burgueño, J., 1998. Influence of nutrition on testicular growth in Corriedale rams during spring. *Reproduction Nutrition Development*, 38, 529–538.
- Pool, K.R., Rickard, J.P., Tumeth, E., de Graaf, S.P., 2020. Treatment of rams with melatonin implants in the non-breeding season improves post-thaw sperm progressive motility and DNA integrity. *Animal Reproduction Science*. In press.
- Poulton, A.L., Robinson, T.J., 1987. The response of rams and ewes of three breeds to artificial photoperiod. *Reproduction*, 79, 609–626.

- Price, C.A., Hudson, N.L., McNatty, K.P., 1991. Plasma LH, FSH and testosterone concentrations in adult rams which were homozygous carriers or non-carriers of the Booroola fecundity gene. *Reproduction*, 91, 267–275.
- Rahman, A.N.M.A., Abdullah, R.B., Wan-Khadijah, W.E., 2008. Estrus synchronization and superovulation in Goats: A Review. *Journal of Biological Sciences*, 8, 1129–1137.
- Reiter, E., McNamara, M., Closset, J., Hennen, G., 1995. Expression and functionality of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor in the rat prostate. *Endocrinology*, 136, 917–923.
- Robaire, B., Hamzeh, M., 2011. Androgen action in the epididymis. *Journal of Andrology*, 32, 592–599.
- Robaire, B., Hinton, B.T., Orgebin-Crist, M.C., 2006. The epididymis. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Academic Press, pp. 1071–1148.
- Rosa, H.J.D., Bryant, M.J., 2003. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*, 48, 155–171.
- Roy, F., Maurel, M.C., Combes, B., Vaiman, D., Cribiu, E.P., Lantier, I., Pobel, T., Delétang F., Combarous, Y., Guillou, F., 1999. The negative effect of repeated equine chorionic gonadotropin treatment on subsequent fertility in Alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. *Biology of Reproduction*, 60, 805–813.
- Sarlós, P., Egerszegi, I., Balogh, O., Molnár, A., Cseh, S., Rátky, J., 2013. Seasonal changes of scrotal circumference, blood plasma testosterone concentration and semen characteristics in Racka rams. *Small Ruminant Research*, 111, 90–95.

- Schneider, F., Tomek, W., Gründker, C., 2006. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: a review. *Theriogenology*, 66, 691–709.
- Shayu, D., Rao, A.J. 2006. Expression of functional aromatase in the epididymis: role of androgens and LH in modulation of expression and activity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 249, 40–50.
- Sherman, G.B., Wolfe, M.W., Farmerie, T.A., Clay, C.M., Threadgill, D.S., Sharp, D.C., Nilson, J.H., 1992. A single gene encodes the beta-subunits of equine luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *Molecular Endocrinology*, 6, 951–959.
- Simitzis, P.E., Deligeorgis, S.G., Bizelis, J.A., 2006. Effect of breed and age on sexual behaviour of rams. *Theriogenology*, 65, 1480–1491.
- Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W, Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C.R., Michael, M.D., Mendelson, C.R., Bulun, S.E., 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Reviews*, 15, 342–355.
- Smith, P.L., Bousfield, G.R., Kumar, S., Fiete, D., Baenziger, J.U., 1993. Equine lutropin and chorionic gonadotropin bear oligosaccharides terminating with SO₄-4-GalNAc and Sia alpha 2, 3Gal, respectively. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 795–802.
- Smith, L.B., Walker, W.H., 2014. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 30, 2–13.
- Solakidi, S., Psarra, A.G., Nikolaropoulos, S., Sekeris, C.E., 2005. Estrogen receptors α and β (ER α and ER β) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ER β and AR in mitochondria of the midpiece. *Human Reproduction*, 20, 3481–3487.

- Stewart, F., Allen, W.R., 1981. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. *Journal of Reproduction and Fertility*, 62, 527–536.
- Sun, S., Liu, S., Luo, J., Chen, Z., Li, C., Loo, J.J., Cao, Y., 2019. Repeated pregnant mare serum gonadotropin-mediated oestrous synchronization alters gene expression in the ovaries and reduces reproductive performance in dairy goats. *Reproduction in Domestic Animals*, 54, 873–881.
- Sugino, H., Bousfield, G.R., Moore, W.T., Ward, D.N., 1987. Structural studies on equine glycoprotein hormones. Amino acid sequence of equine chorionic gonadotropin beta-subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 8603–8609.
- Tao, Y.X., Lei, Z.M., Rao, C.V., 1998. Seminal vesicles are novel sites of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin—receptor gene expression. *Journal of Andrology*, 19, 343–347.
- Tilbrook, A.J., Clarke, I.J., 2001. Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biology of Reproduction*, 64, 735–742.
- Ungerfeld, R., 2012. Seasonal reproductive patterns and effectiveness as teasers (ram effect) of Corriedale and Milchschaaf rams. *Animal Production Science*, 52, 1036–1041.
- Ungerfeld, R., 2013. Treatment with an equine chorionic gonadotrophin single dose restored spermatozoa production in an azoospermic pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) male: A case report. *Reproductive Medicine and Biology*, 12, 65–68.
- Ungerfeld, R., Bielli, A., 2008. No change detected in body weight, scrotal circumference, semen characteristics and sexual behaviour during the development of prepubertal Milchschaaf lambs after weekly administration of eCG. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 400–402.

- Ungerfeld, R., Fila, D., 2011. Testicular fluid content evaluated by ultrasound image computer-assisted analysis increases with small-dose multiple GnRH injections in rams. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 720–723.
- Ungerfeld, R., Fila, D., 2012. Testicular fluid content and scrotal surface temperature increase with rams' sexual activity. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, e56–e58.
- Ungerfeld, R., Clemente, N., Bonjour, L., Orihuela, A., 2014. Equine chorionic gonadotrophin administration to rams improves their effectiveness to stimulate anoestrous ewes (the “ram effect”). *Animal Reproduction Science*, 149, 194–198.
- Ungerfeld, R., Clemente, N., Orihuela, A., 2019. Treatment with eCG courtship behavior in rams during the breeding and non-breeding seasons. *Animal Production Science*, 59, 865–869.
- Vliegenthart, J.F.G., Kamerling, J.P., Damm, J.B.L., Hård, K., van Dedem, G.W.K., Boer, W.D., 1990. Differences in structure of carbohydrate chains of human and equine chorionic gonadotropins. *Glycoprotein hormones: Structure, Synthesis and Biologic Function*, 123–136.
- Weinbauer, G.F., Luetjens, C.M., Simoni, M., Nieschlag, E., 2010. Physiology of testicular function. In *Andrology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 11–59.
- Walker, W.H., 2009. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids*, 74, 602–607.
- Yeates, N.T.M., 1949. The breeding season of the sheep with particular reference to its modification by artificial means using light. *The Journal of Agricultural Science*, 39, 1–43.

Zarazaga, L.A., Malpoux, B., Bodin, L., Chemineau, P., 1998. The large variability in melatonin blood levels in ewes is under strong genetic influence. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 274, E607–E610.

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