

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**CONGELABILIDAD DEL SEMEN DE CHIVOS TRATADOS DE FORMA CRONICA
CON UN AGONISTA DE GnRH O INMUNIZADOS CONTRA GnRH**

por

Madeleine GUERRERO GUTIERREZ

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

MODALIDAD Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2018**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dr. Pedro dos Santos Neto

Segundo miembro (Tutor):

Msc. Julia Giriboni

Tercer miembro:

Dr. Rafael Aragunde

Cuarto miembro:

Dr. Rodolfo Ungerfeld

Quinto miembro:

Dra. Lorena Lacuesta

Fecha:

18/12/2018

Autor:

Madeleine Guerrero Gutiérrez

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primer lugar a Dios, por guiarme a lo largo de mi vida y haberme ayudado a elegir esta carrera, que me brindó la oportunidad de conocer gente maravillosa que hoy en día forman parte de mi vida.

A mi tutora Julia Giriboni por su paciencia dedicación, constancia y apoyo a lo largo de todo el trabajo. Gracias por todo lo que me brindaste y enseñaste.

A mi co-tutores Rodolfo Ungerfeld y Lorena Lacuesta por brindarme su ayuda y tiempo.

A Milton por cuidar tan bien de los animales y ayudarnos siempre.

También a todas las personas que colaboraron en la parte experimental de la tesis.

A las funcionarias de la Biblioteca de la Facultad de Veterinaria.

Agradecerles a la Facultad de Veterinaria y a todos los profesores que contribuyeron en mi formación.

Y en especial dedicarle este trabajo y agradecerle a mi familia y amigos por el apoyo durante todos estos años.

TABLA DE CONTENIDO

PAGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
RESUMEN.....	9
SUMMARY.....	11
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	12
1.1. Control endócrino de la reproducción en pequeños rumiantes machos.....	12
1.1.2 Estacionalidad reproductiva pequeños rumiantes.....	13
1.1.3 Regulación artificial de la capacidad reproductiva.....	13
1.2 Uso de agonistas de GnRH e inmunoneutralización contra GnRH.....	14
1.2.1 Semen fresco.....	15
1.2.2 Semen congelado descongelado.....	17
1.2.3 Plasma seminal.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo general.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. MATERIALES Y METODOS.....	21
3.1 Lugar de estudio y animales.....	21
3.2 Evaluación de semen fresco.....	21
3.3 Congelación de semen.....	22
3.4 Descongelación de semen y evaluación de semen descongelado.....	22
3.5 Análisis estadístico.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Parámetros seminales semen fresco.....	24

4.1.2	Parámetros seminales pre y pos-descongelado.....	26
4.1.3	Parámetros seminales semen descongelado.....	32
5.	DISCUSIÓN.....	33
6.	CONCLUSIONES.....	35
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

FSH	Hormona folículo estimulante
Gcon	Grupo control
Gimp	Grupo implante
GnIH	Hormona inhibidora de gonadotrofina
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
Gvac	Grupo vacuna
HAP	Proteínas con afinidad a la heparina
HOST	Test de incubación en un medio hipo osmótico
LH	Hormona luteinizante
MM	Motilidad espermática de masa
MP	Espermatozoides motiles progresivos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A: Motilidad espermática de masa, B: espermatozoides con motilidad progresiva (MP) (%), C) espermatozoides con morfología normal (%), D) cantidad total de espermatozoides de chivos adultos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH, inmunoneutralizados contra GnRH y chivos no tratados.....25

Figura 2. Espermatozoides con membrana funcional (%) de chivos adultos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH, inmunoneutralizados contra GnRH y chivos no tratados.....26

Figura 3. Calidad de la motilidad en el mes de mayo de chivos adultos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH, inmunoneutralizados contra GnRH y chivos no tratados.....27

Figura 4. Espermatozoides motiles de la muestra de semen fresco en relación al semen fresco con el agregado de diluyente en el mes de mayo de chivos adultos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH, inmunoneutralizados contra GnRH y chivos no tratados.....27

Figura 5. Espermatozoides con motilidad progresiva (MP) de la muestra de semen fresco en relación al semen fresco con el agregado de diluyente en el mes de mayo, de chivos adultos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH, inmunoneutralizados contra GnRH y chivos no tratados.....28

Figura 6. Espermatozoides con morfología normal (%) del semen fresco al tiempo 30 en el mes de noviembre (A) y enero (B) de chivos adultos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH, inmunoneutralizados contra GnRH y chivos no tratados.....29

Figura 7. Espermatozoides con membrana funcional (%) del semen fresco al tiempo 90 en el mes de noviembre (A), diciembre (B) y mayo (C) de chivos adultos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH, inmunoneutralizados contra GnRH y chivos no tratados.....30

Figura 8. Espermatozoides motiles del semen descongelado en el mes de mayo de chivos adultos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH, inmunoneutralizados contra GnRH y chivos no tratados.....31

Figura 9. Espermatozoides con motilidad progresiva (MP) en el semen descongelado en el mes de noviembre de chivos adultos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH, inmunoneutralizados contra GnRH y chivos notratados.....32

RESUMEN

Existen diferentes maneras de disminuir la capacidad reproductiva manipulando la secreción y la acción de la GnRH inhibiendo el eje hipotálamo-hipófisis gonadal. El uso crónico de un agonista de GnRH y la inmunoneutralización contra GnRH podrían tener impacto en la calidad del semen y afectar el proceso de congelado-descongelado debido a cambios en la secreción de gonadotropinas y testosterona y también a posibles cambios en la cantidad y composición del plasma seminal. El objetivo del presente estudio fue determinar si el uso de agonistas de GnRH y la inmunoneutralización de la GnRH afectan negativamente la calidad seminal del semen fresco y la crioresistencia seminal en chivos adultos. El ensayo se realizó en un período de 16 meses durante el que se realizaron 7 colecciones de semen. Se utilizaron 23 chivos de Gabón separados en tres grupos: Grupo control (Gcon, n=9), Grupo implante (Gimp, n=7) y Grupo vacuna (Gvac, n=7). En el semen fresco se midió el volumen del eyaculado (mL) y la concentración espermática (espermatozoides/mL), y se determinó mediante evaluación subjetiva la calidad de la motilidad, la motilidad espermática de masa (MM), el porcentaje de espermatozoides motiles, el porcentaje de espermatozoides motiles progresivos (MP), el porcentaje de espermatozoides con morfología normal y el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional. Para las muestras de semen congeladas se evaluaron las mismas variables, con la diferencia que el porcentaje de espermatozoides motiles y MP se evaluaron mediante software *Integrated Semen Analysis System* (ISAS). Los datos del semen fresco fueron comparados para cada momento de colección mediante ANOVA para mediciones repetidas, considerando como efectos principales el tratamiento (implante, vacuna y control) y el tiempo (meses, momentos de colección). Los datos del semen descongelado se compararon mediante ANOVA para mediciones repetidas y se consideró como efectos principales el tratamiento y las etapas de evaluación (T0, T30, T60 y T90). La calidad de la motilidad del semen fresco para el mes de mayo al tiempo 90 descongelado fue mayor en los chivos del Gcon que en los del Gvac ($P= 0,02$), no siendo diferente en los del Gimp. El porcentaje de espermatozoides con morfología normal del semen fresco al tiempo 30 descongelado para los meses de diciembre fue mayor en los chivos del Gcon que en los del Gimp ($P= 0,02$) y tendió a ser mayor en los del Gvac ($P= 0,08$), y en enero fue mayor en los chivos del Gcon que en los del Gvac ($P= 0,02$), no siendo diferente al Gimp. El porcentaje de espermatozoides con membrana funcional no fue diferente entre grupos para ninguno de los momentos de colección pero si hubo interacción entre el grupo y la etapa en los meses de noviembre, diciembre ($P= 0,04$ para ambos momentos) y mayo ($P= 0,02$), siendo mayor en noviembre en el semen fresco de los chivos Gcon que en el del Gvac ($P= 0,005$). En diciembre fue mayor para el semen fresco de los chivos del Gcon que en los del Gvac ($P= 0,0004$); y fue mayor para los chivos del Gimp que los del Gvac ($P= 0,01$). En mayo el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional del semen fresco fue mayor para el Gcon que en los del Gvac ($P= 0,001$) y fue mayor en los del Gimp que en los del Gvac ($P= 0,01$). Se concluyó que el uso crónico de un agonista de GnRH y la inmunoneutralización de la GnRH afectaron negativamente la calidad seminal del semen fresco y del semen congelado-descongelado en chivos

adultos y que la inmunoneutralización de la GnRH afectó en mayor medida la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides con morfología normal y con membrana funcional que el uso crónico de un agonista de GnRH.

SUMMARY

There are different ways to decrease the reproductive capacity by manipulating secretion and action of GnRH by inhibiting the hypothalamic-gonadal pituitary axis. Chronic use of a GnRH agonist and immunoneutralization against GnRH could have an impact on semen quality and affect the freeze-thaw process due to changes in the secretion of gonadotropins and testosterone and also to possible changes in the amount and composition of the seminal plasma. The aim of the present study was to determine whether the use of GnRH agonists and the immunoneutralization of GnRH negatively affect the seminal quality of fresh semen and the seminal chilliness in adult goats. The trial was conducted over a period of 16 months during which 7 collections of semen were performed. We used 23 Gabon goats separated into three groups: Control group (Gcon, n = 9), Implant group (Gimp, n = 7) and Vaccine group (Gvac, n = 7). The volume of the ejaculate (mL) and the sperm concentration (sperm / mL) were measured in the fresh semen, and the motility quality, mass sperm motility (MM), the percentage of motile sperm were determined by subjective evaluation, the percentage of progressive motile sperm (MP), the percentage of sperm with normal morphology and the percentage of sperm with the functional membrane. For the frozen semen samples, the same variables were evaluated, with the difference that the percentage of motile sperm and MP were evaluated using the Integrated Semen Analysis System (ISAS) software. The fresh semen data were compared for each collection moment by means of ANOVA for repeated measurements, considering as main effects the treatment (implant, vaccine, and control) and time (months, collection moments). The data of the thawed semen were compared by means of ANOVA for repeated measurements and the treatment and evaluation stages were considered as main effects (T0, T30, T60, and T90). The quality of the motility of fresh semen for the month of May at time 90 thawed was greater in the goats of the Gcon than in those of the Gvac ($P = 0.02$), not being different in the Gimp. The percentage of spermatozoa with normal morphology of fresh semen at thawing time for the months of December was higher in the Gcon goats than in the Gimp ones ($P = 0.02$) and tended to be higher in those of the Gvac ($P = 0.08$), and in January it was higher in the goats of the Gcon than in those of the Gvac ($P = 0.02$), not being different from the Gimp. The percentage of sperm with functional membrane was not different between groups for any of the moments of collection but there was interaction between the group and the stage in the months of November, December ($P = 0.04$ for both moments) and May ($P = 0.02$), being higher in November in the fresh semen of the Gcon than in that of the Gvac ($P = 0.005$). In December, it was higher for the fresh semen of the Gcon goats than in those of the Gvac ($P = 0.0004$); and it was higher for Gimp goats than those of Gvac ($P = 0.01$). In May, the percentage of sperm with the functional membrane of fresh semen was higher for Gcon than in Gvac ($P = 0.001$) and was higher in Gimp than in Gvac ($P = 0.01$). It was concluded that the chronic use of a GnRH agonist and the immunoneutralization of GnRH negatively affected the seminal quality of fresh semen and frozen-thawed semen in adult goats and that the immunoneutralization of GnRH affected the quality of motility to a greater extent, as well as the percentage of spermatozoa with normal morphology and the functional membrane than the chronic use of a GnRH agonist.

1- INTRODUCCIÓN

1.1. Control endócrino de la reproducción en pequeños rumiantes machos

EL control endócrino de la reproducción está dado principalmente por el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, que regula la secreción de la Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH). Esta hormona es un decapeptido producido por neuronas especializadas del hipotálamo (Hull y Kenigsberg, 1987), que se libera en forma pulsátil cada 30-120 min desde las terminaciones nerviosas de neuronas secretoras hacia el sistema porta hipotálamo-hipofisario, estimulando la biosíntesis y secreción de hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) (Fink, 1988). En consecuencia, la GnRH opera como la vía común final para el control central de la reproducción. La síntesis de GnRH y su subsecuente liberación del hipotálamo están sutilmente controladas por múltiples factores estimuladores e inhibidores (Gojska et al., 2014). La kisspeptina, codificada por el gen *kiss1*, es un péptido neural que estimula la secreción de GnRH (Oakley et al., 2009; Clarke, 2011) y por tanto, indirectamente estimula la liberación de LH y FSH (Ezzat-Ahmed et al., 2009). Por otro lado, la hormona inhibidora de gonadotropina (GnIH) fue identificada como un péptido que inhibe a la GnRH (Tsutsui et al., 2000). En particular, a través de una serie de estudios en ovejas se ha demostrado que ejerce acciones potentes a nivel de la hipófisis para contrarrestar la función de la GnRH en términos de la síntesis y secreción de gonadotrofinas (Smith et al., 2008). El péptido RFRP-3 también conocido como el homólogo de la GnIH puede suprimir directamente la síntesis de GnRH, lo que sugiere que la vía inhibidora mediada por RFRP-3 puede potencialmente anular los efectos estimulantes de kisspeptina sobre la GnRH (Gojska et al., 2014).

La frecuencia de los pulsos de GnRH determina la frecuencia de pulsos de LH (Clarke et al., 2011). Sin embargo, la secreción de FSH parece estar regulada por un mecanismo dual, un mecanismo de control basal constitutivo y otro componente pulsátil (Padmanabhan y McNeilly, 2001). Culler y Vilar (1987) demostraron que la administración combinada de un antagonista de GnRH y la inmunoneutralización de la misma en ratas macho suprime la pulsatilidad de LH por completo, sin abolir la de FSH. Estos descubrimientos proporcionan evidencia sólida en apoyo de la existencia de un mecanismo de secreción de FSH adicional, no dependiente de GnRH (Padmanabhan y McNeilly, 2001).

La LH estimula la producción de testosterona por parte de las células de Leydig, las que se encuentran fuera del túbulo seminífero, en el intersticio testicular. Existe un sistema de retroalimentación negativa sensible entre la secreción de LH y la de testosterona, por lo que aumentos en la concentración de LH son seguidos por aumentos de niveles plasmáticos de testosterona (Bielli, 2002). En los testículos, la testosterona se encuentra en altas concentraciones que se mantienen a través de una proteína ligadora de andrógenos (ABP), y son necesarias para que la espermatogénesis ocurra de manera normal, fundamentalmente para que transcurra correctamente la meiosis de las células germinales (Bielli, 2002). Además, la testosterona es importante para el desarrollo y el mantenimiento del epitelio secretor de los órganos sexuales accesorios (Bielli, 2002) y es responsable de algunas características masculinas, como la agresividad y el crecimiento muscular (Field, 1971; Seideman et al., 1982). La testosterona además puede afectar el metabolismo

de los espermatozoides (Nehring et al., 1974), como su potencial de membrana (Calzada et al., 1988), el transporte molecular a través de la membrana plasmática (Ballesteros et al., 1983) y la fluidez de la misma (Shivaji et al., 1992).

La FSH estimula a las células de Sertoli a secretar estrógenos por conversión intracelular de la testosterona que proviene de la célula de Leydig (Bielli, 2002). El tamaño testicular de un macho se relaciona con el número de células de Sertoli que contenga el testículo (Hochereau-de Reviers et al., 1987) y cada célula de Sertoli se encarga de un número limitado de células germinales para que completen su diferenciación en espermatozoides. En respuesta a la FSH, las células de Sertoli producen la inhibina B, que inhibe la secreción de FSH (Leblond y Clermont, 1952). La FSH también puede estar implicada en la regulación del número de células de Leydig y en la mediación de su maduración (Kerr y Sharpe, 1985) y estimula a las células de Sertoli a producir la proteína ABP. La testosterona producida por las células de Leydig llega hasta el túbulo seminífero por medio de éstas proteínas transportadoras de esteroides sexuales. La FSH es necesaria para iniciar la espermatogénesis en la pubertad, aunque una vez iniciada no parece ser esencial para el mantenimiento de la misma.

1.1.2 Estacionalidad reproductiva en pequeños rumiantes

Las razas de ovinos y caprinos de latitudes templadas muestran variaciones estacionales de la actividad reproductiva, las que son controladas principalmente por cambios fotoperiódicos anuales (Chemineau y Delgadillo, 1993). El periodo de exposición diaria de luz regula la liberación de la hormona melatonina, secretada por la glándula pineal (Chemineau et al., 2007). Dicha hormona es liberada en mayor cantidad durante las horas de oscuridad (Hoffmann et al., 1981), estimulando la liberación de kisspeptina y la consecuente estimulación de GnRH, aumentando así la secreción de gonadotrofinas (Malpaux et al., 1997; Vanecek, 1998). Para el hemisferio Sur, en la época que va del 21 diciembre al 21 de junio, el aumento en la actividad sexual se asocia con el aumento de horas en la liberación de melatonina tanto en hembras como en machos (Delgadillo et al., 1999). La estacionalidad se refleja claramente en cambios en el comportamiento, dimensiones testiculares (masa y volumen), gametogénesis y secreción de hormonas (concentraciones séricas de LH y testosterona) (Land, 1973; Schanbacher y Lunstra, 1976). Sarlós et al. (2013) registraron en ovinos con un ciclo reproductivo fuertemente estacional valores mínimos de las características reproductivas (circunferencia escrotal, nivel de testosterona en plasma sanguíneo, volumen del eyaculado, concentración espermática y porcentaje de espermatozoides con morfología normal) en invierno y valores máximos a fines del verano y en otoño. Las condiciones ambientales y otros factores como la temperatura, la nutrición y el contacto con animales del otro sexo, interactúan con el sistema endógeno estimulando o inhibiendo los mecanismos fisiológicos de la reproducción (Rosa y Bryant, 2003).

1.1.3 Regulación artificial de la capacidad reproductiva

Existen diferentes maneras de disminuir la capacidad reproductiva manipulando la acción de la GnRH en la hipófisis (Fraser, 1982): 1) evitando que la GnRH llegue a sus receptores en la hipófisis, mediante inmunoneutralización, 2) ejerciendo efectos inhibitorios utilizando agonistas de la GnRH administrados de forma crónica y 3)

bloqueando los receptores de GnRH por antagonistas químicos de GnRH. El uso de esteroides sexuales (moléculas derivadas del colesterol) son una alternativa para la disminución de la capacidad reproductiva ya que actúan reduciendo las concentraciones de andrógenos a través de una inhibición de la secreción y liberación de gonadotropinas por la hipófisis (Romagnoli, 2006). El control de la GnRH es ventajoso en relación al uso de esteroides como método de contracepción, ya que estos últimos dejan residuos en los tejidos animales. Por lo tanto, resulta necesario continuar con las investigaciones sobre el control de la actividad reproductiva a través del uso de la GnRH (Valiente et al., 2007).

La manipulación de la acción de la GnRH es una alternativa para la contracepción debido a que ejerce efectos inhibitorios reversibles en la reproducción, siendo exitosa en varios grupos animales como perros (Cavitt et al., 1988; Lacoste et al., 1989; Vickery et al., 1989; Valiente et al., 2007), carneros (Lincoln et al., 1986; Caraty et al., 1990), cerdos (Xue et al., 1994), monos (Vickery et al., 1980) y toros (Kesler et al., 1999; Jago et al., 1997). La necesidad de utilizar la contracepción química en animales de compañía se basa en que la utilización de técnicas quirúrgicas en animales callejeros es poco práctica y costosa, mientras que en criaderos la importancia de la contracepción radica en la reversibilidad de la técnica (Valiente et al., 2007). En los rumiantes, la utilización de la inmunoneutralización de la GnRH permite alcanzar un mejor desarrollo corporal mejorando de esta manera las características cárnicas del ganado, pudiendo realizarse en la etapa postpuberal (Jago et al., 1997).

1.2 Uso de agonistas de GnRH e inmunoneutralización de la GnRH

Los agonistas de GnRH se desarrollaron por sustitución de 2 aminoácidos (posiciones 6 y 10) en la molécula original (Karten y River, 1986), dando lugar a una molécula con una acción que supera 200 veces a la de la molécula original (Tarlatis y Bili, 2004). Unos de los problemas prácticos en el uso de agonistas fue el de administrar regularmente aplicaciones subcutáneas por periodos prolongados de tiempo con el fin de mantener su efecto. Así surgió el desarrollo de compuestos de liberación lenta, fácilmente administrables en forma intramuscular o de implantes subcutáneos (Weckerman y Harzmann, 2004). Cuando los mismos son administrados de forma prolongada producen una acción farmacológica “anti reproductiva o de esterilización química”, debido a la desensibilización de los receptores de GnRH (Vickery y McRae, 1989). Los agonistas en sus formulaciones de administración prolongada brindan una supresión reversible de las funciones reproductivas por periodos variables de tiempo (Vickery y McRae et al., 1989; Trigg et al 2001; Corrada et al., 2005). La inhibición del eje gonadal con agonistas de GnRH induce la liberación inicial de gonadotropinas, llamado “efecto flare up” antes de la desensibilización (Wright et al., 2001). En perros machos, la administración de un agonista de GnRH que proveía una liberación diaria de 100 a 200 mg de la droga causó un aumento temporario de la concentración de testosterona plasmática por unos pocos días, seguido por una disminución de los valores de testosterona durante aproximadamente 150 días. En corderos, la administración continua de agonistas de GnRH durante 16 semanas antes del inicio esperado de la pubertad suprimió la secreción de LH y FSH, retrasó el crecimiento testicular y el crecimiento

de los epidídimos, e inhibió el desarrollo del comportamiento sexual (Tilbrook et al., 1993). Se ha demostrado que el efecto supresor de los agonistas en la función testicular se revirtió dentro de las 8 semanas siguientes al cese del tratamiento (Tilbrook et al., 1993). En los últimos años, el estudio del uso crónico de agonistas de GnRH se ha centrado en el uso de la deslorelina, un super-agonista de GnRH sintético, 7 veces más potente que la GnRH endógena (Padula, 2005). La estimulación prolongada de receptores de GnRH utilizando la deslorelina lleva a una desensibilización de los mismos (Navarro y Schober, 2012), lo que resulta en una falla en la síntesis o una carencia en la liberación de gonadotrofinas, induciendo infertilidad temporaria en los animales tratados (Junaidi, 2007). En un estudio realizado con perros tratados con implantes subcutáneos de deslorelina se obtuvieron concentraciones plasmáticas de LH y testosterona indetectables después de los 21 y 27 días respectivamente y el volumen testicular cayó un 35 % con respecto a los valores pre tratamiento. Las características del semen se recuperaron por completo 60 semanas después de haber sido implantado (Junaidi et al., 2003).

Por otro lado, la inmunoneutralización de la GnRH consiste en estimular una respuesta inmune que genere altos títulos de anticuerpos para bloquear la molécula, y por ende la secreción de LH, FSH y hormonas esteroideas, induciendo la detención de la gametogénesis y atrofia gonadal. La unión a anticuerpos neutraliza la GnRH evitando que se difunda a través de las paredes de los capilares, debido al tamaño del complejo hormona-anticuerpo o enmascarando el sitio de unión del receptor en la molécula de GnRH (Thompson, 2000). Se ha observado que la inmunoneutralización de la GnRH disminuye los niveles de LH y FSH en toros y corderos (Jeffcoate et al., 1982; Jago et al., 1997). En carneros se demostró que la gametogénesis y el comportamiento reproductivo se podían suprimir mediante inmunización pasiva contra GnRH por el aumento de títulos de anticuerpos anti-GnRH y disminución de las concentraciones de testosterona (Lincoln y Fraser, 1979, Shakurai et al., 1997). La subsecuente disminución de secreción de testosterona lleva a una atrofia gonadal y disminuye la función reproductiva (Arimura et al., 1973; Adams et al., 1996; Miller et al., 2000). Han et al. (2017) concluyeron que los efectos de la inmunización activa contra la GnRH redujo consistentemente la síntesis de GnRH del hipotálamo debido a una deficiencia de testosterona que altera la señalización de testosterona-kisspeptina-GnRH. Por lo tanto, los anticuerpos contra GnRH evitan la cascada normal de secreción de hormona que se requiere para la regulación gonadal y la producción de gametos (Talwar, 1985).

1.2.1 Semen fresco y su evaluación

El semen es el líquido descargado por el macho durante el acto sexual. Es una suspensión de células espermáticas cuyo volumen y concentración varía según las especies (Arthur, 1991). El plasma seminal es el medio en el que se encuentran los espermatozoides (La Falcì et al., 2002) y contiene abundantes carbohidratos, proteínas y aminoácidos, enzimas, vitaminas hidrosolubles, minerales y una capacidad tampón alta, siendo esencial para mantener la vitalidad de los espermatozoides. Su producción depende de la concentración de gonadotrofinas y testosterona. La FSH y la LH son fundamentales para iniciar y mantener la función reproductiva (Clarke, 2011). Por lo tanto, la manipulación de las gonadotrofinas, sea

potenciando, simulando o inhibiendo su secreción, puede, de manera general, modificar la composición del plasma seminal.

Por otro lado, la testosterona es el principal regulador hormonal de la espermatogénesis (Sofikitis et al., 2008). En la mayoría de las especies de rumiantes salvajes, el patrón de secreción de testosterona muestra un ritmo estacional estrechamente relacionado con el ciclo reproductivo (Goeritz et al., 2003; Toledano-Díaz et al., 2007). La variación estacional en la concentración sérica de testosterona y di-hidro-testosterona se asocia con variaciones en la cantidad de fructosa (Borque y Vázquez, 1999; Matsuoka et al., 2006), ácido cítrico (Borque y Vázquez, 1999), lactato deshidrogenasa, sodio y potasio (Zamiri et al., 2010; Farshad et al., 2012), actividad de la inhibina (Miyamoto et al., 1987) y las concentraciones de melatonina y de la propia testosterona (Casao et al., 2010) en el plasma seminal. Además, la cantidad de enzimas con efectos antioxidantes (Cardozo et al., 2006; Marti et al., 2007; Casao et al., 2010) también varía en forma estacional. A su vez, el efecto crioprotector del plasma seminal de los carneros aumenta cuando se lo colecta durante la estación reproductiva comparado con la colección fuera de la misma (Domínguez et al., 2008; Leahy et al., 2010). En el mismo sentido, la efectividad de la criopreservación seminal varía de acuerdo a la estación del año, lo que probablemente se asocia con la concentración de testosterona (Coloma et al., 2010). Por lo tanto, durante su tiempo en el tracto reproductivo masculino, los espermatozoides están expuestos a diferentes concentraciones de testosterona dependiendo de la época del año. Dado que las propiedades de la membrana espermática pueden ser influenciadas por la testosterona (Purohit et al., 2000), las modificaciones en la secreción de la misma mediante el uso crónico de un agonista de GnRH o la inmunoneutralización de la GnRH produce efectos similares a los de la castración quirúrgica (Robertson et al., 1979).

Sieme et al. (2004) observaron en equinos que la reducción de la liberación de gonadotrofinas durante el invierno es la causa subyacente de una menor calidad del semen durante la temporada no reproductiva. Por lo tanto, la estimulación de la secreción de gonadotrofinas podría ser la vía más directa para contrarrestar estos efectos. En línea con esta idea, el tratamiento de los sementales con un análogo de la GnRH (buserelina) dos veces al día durante 6 semanas durante la estación no reproductiva mejoró el comportamiento sexual y la calidad del semen congelado-descongelado. De manera similar, la motilidad y la integridad de la membrana del semen congelado-descongelado mejoró sólo durante el período de tratamiento. En contraposición, el bloqueo o la disminución de la concentración de gonadotrofinas y de testosterona podrían repercutir en forma negativa en la cantidad y composición del plasma seminal. Dado que la testosterona es la que estimula el desarrollo de las glándulas accesorias, que son las que proporcionan la mayor parte del plasma seminal podría también llevar a que se modifique la crioresistencia.

La evaluación seminal es una herramienta utilizada principalmente para determinar la capacidad de fertilización del espermatozoide, y por ende predecir el potencial fértil de un determinado reproductor (Davies-Morel, 1999). Además, permite la selección de eyaculados para procesos de refrigeración y congelación. Las características más relevantes para determinar la calidad seminal son la integridad funcional de las membranas plasmática y acrosomal, la morfología y las velocidades y trayectorias de movimiento (Canisso, 2008). Los espermatozoides con membranas

íntegras, morfología normal y con motilidad rápida y progresiva son los que tendrán mayor probabilidad de fertilizar al ovocito (Canisso, 2008). La motilidad espermática debe estar presente para que ocurra la fertilización, pero de por sí sola no es un buen indicador de capacidad fecundante, por lo que se debe complementar este análisis con el de viabilidad, que permite distinguir espermatozoides con membranas plasmáticas íntegras o dañadas (Davies-Morel, 1999; Canisso, 2008; Nascimento et al., 2008). La membrana plasmática debe estar intacta para que en el espermatozoide se desencadenen los mecanismos fisiológicos involucrados en la fertilización (De Oliveira, 2007). La morfología espermática también es una característica importante debido a que espermatozoides morfológicamente anormales poseen una menor habilidad de fertilización, principalmente por compromiso de la motilidad y de la penetración y unión al ovocito (Miró et al., 2005; Canisso, 2008). Es esperable que dichos parámetros seminales se vean afectados por los tratamientos hormonales en base al uso de agonistas de GnRH o mediante la inmunoneutralización de la misma. Por ejemplo, en caninos se observó que el uso de una sola dosis de un agonista de GnRH (leuprolide), llevó a la disminución del volumen de eyaculado (Vickery et al., 1989) y dentro de las 8 semanas de comenzado el tratamiento se han observado morfoanomalías espermáticas (Inaba et al., 1996). En perros tratados con implantes subcutáneos de deslorelina se obtuvieron resultados similares donde se observaron efectos negativos en todos los valores seminales evaluados (Novotny et al., 2015). Junaidi et al. (2003) observaron que con implantes subcutáneos de deslorelina la recuperación del volumen del eyaculado y calidad espermática varió considerablemente entre perros. Dentro de las 5-6 semanas de colocado el implante la motilidad espermática y la concentración de espermatozoides disminuyeron, habiendo un aumento progresivo en el porcentaje de espermatozoides anormales. Entre 6 y 48 semanas luego del tratamiento se observaron morfoanomalías secundarias y no se produjeron eyaculados. Hacia la semana 60 del tratamiento hubo un incremento gradual en el volumen del eyaculado y en la concentración y motilidad de los espermatozoides, recuperando sus valores normales.

1.2.2 Semen congelado – descongelado

Las gonadotrofinas ejercen un rol central en el control de la reproducción. Sin embargo, su rol específico sobre la composición del plasma seminal y la crioresistencia del semen aún no está suficientemente claro. El proceso de congelación-descongelación seminal afecta considerablemente la integridad estructural y funcional de la membrana de los espermatozoides, produciéndose un efecto deletéreo que afecta la motilidad y viabilidad espermática pos-descongelación (Pérez et al., 2001; Madrid-Bury, 2004; Quintero-Moreno., 2005). En las especies domésticas la criopreservación del semen resulta en una menor fertilidad en comparación con semen fresco debido a la pérdida de viabilidad de los espermatozoides (Salomón y Maxwell, 2000; Watson, 2000). Las etapas de enfriamiento iniciales del proceso de criopreservación exponen a los espermatozoides a la fluctuación de membrana y a cambios osmóticos que eventualmente conducen a un estado de estrés oxidativo (Salazar et al., 2011; Martorana et al., 2014). Cuando los espermatozoides están expuestos a bajas temperaturas, aumenta la producción celular de especies reactivas de oxígeno y esto se traduce en una mayor susceptibilidad del ADN y la membrana plasmática al ataque oxidativo mitocondrial de subproductos metabólicos en comparación con el

semen fresco (Chatterjee, 2001; Ortega et al., 2010). Gillan et al. (2004) informaron que la respiración mitocondrial es interrumpida en espermatozoides criopreservados y descongelados, y disminuye más rápidamente en comparación con espermatozoides frescos durante incubación *in vitro* (37 °C).

Por otro lado, la descongelación del semen induce la capacitación de los espermatozoides, y por tanto acorta la vida útil de las células (Gillan et al., 1998; Salamon y Maxwell 2000). También se han detectado cambios bioquímicos, incluyendo la liberación de la enzima transaminasa Glutamato-Oxalacética (GOT), pérdidas de lipoproteínas y aminoácidos ácidos, disminución de la actividad de la fosfatasa ácida, aumento del sodio y disminución del contenido de potasio, inactivación de la hialuronidasa, pérdida de concentración de prostaglandinas, reducción de la síntesis de ATP y ADP, y disminución en la actividad proteolítica acrosomal (Salamon y Maxwell, 2000). Por otro lado, utilizando el análisis *computer-assisted semen analysis* (CASA), Moses et al. (1995) establecieron que todos los parámetros cinéticos de espermatozoides fueron modificados por la criopreservación. Además, la criopreservación seminal induce la formación de cristales de hielo intracelulares y cambios en el citoplasma de los espermatozoides, e incluso efectos sobre el citoesqueleto y estructuras relacionadas (Isachenko, 2003). Todo esto resulta en una calidad inferior del semen criopreservado, lo que reduce su viabilidad y por tanto su capacidad fertilizante.

1.2.3 Plasma seminal

Las variaciones en el perfil proteico del plasma seminal a lo largo del año se relacionan con variaciones en el porcentaje de espermatozoides motiles, con la viabilidad espermática y con la concentración espermática del eyaculado, siendo éstos mejores durante la estación reproductiva (Cardozo et al., 2006). A su vez, La Falci et al. (2002) identificaron y caracterizaron proteínas con afinidad a la heparina (HAP) en chivos, observando que su concentración en el plasma seminal varía a lo largo del año. Según estos investigadores, las HAP se encuentran en mayor proporción en estación no reproductiva, produciendo un deterioro en el acrosoma y en la motilidad espermática, por lo que la calidad seminal disminuye. Las proteínas en el plasma seminal están implicadas en varios procesos como la preservación de la viabilidad de los espermatozoides en su proceso de maduración, las interacciones con el tracto reproductivo femenino, la protección y mantenimiento de la membrana celular frente a agentes externos incluyendo eventos que producirían una prematura capacitación y/o reacción acrosómica, como es el caso del proceso de criopreservación (Manjunath et al., 2002). Por lo tanto, la cantidad y composición del plasma seminal influye tanto sobre la calidad del semen fresco como en la calidad del semen congelado-descongelado.

Tanto el uso crónico de agonistas de GnRH como el uso de una vacuna anti-GnRH disminuyen los niveles de LH y FSH (Jeffcoate et al., 1982; Jago et al., 1997), hormonas necesarias para la producción de andrógenos, por lo que podrían repercutir indirectamente en la composición del plasma seminal. Ello podría llevar a una modificación de la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática y acrosomal, así como de la motilidad espermática, y por lo tanto modificar la crioresistencia del semen. Por lo tanto, al inhibir el eje hipotálamo-hipófisis gonadal y

por ende bloquear toda la cascada hormonal, estos tratamientos podrían tener impacto en la calidad del semen y afectar el proceso de congelado-descongelado.

2- OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar si el uso crónico de un agonista de GnRH o la inmunoneutralización de la GnRH afectan negativamente la calidad seminal del semen fresco y la crioresistencia seminal en chivos adultos.

2.2 Objetivos específicos

Determinar si el uso crónico de un agonista de GnRH o la inmunoneutralización contra GnRH afectan negativamente:

- la calidad de la motilidad
- la motilidad espermática de masa
- el porcentaje de espermatozoides motiles, con motilidad progresiva, con morfología normal y con membrana funcional del semen fresco y descongelado de chivos adultos.

Comparar la duración de los efectos de ambos tratamientos.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio y animales

Todos los procedimientos realizados fueron aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Veterinaria. El estudio se llevó a cabo en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria, ubicado en Libertad, San José, Uruguay (34° 41' S; 56° 32' O) y en la sede central de Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay (34° 53' S; 56° 8' O). La alimentación de los animales se basó en fardos de alfalfa de buena calidad, calculando la cantidad por animal de acuerdo a sus requerimientos nutricionales para, y dispusieron de agua *ad libitum*. La condición corporal de los animales fue homogénea y se realizaron vacunaciones anuales contra leptospira y brucelosis, y controles coprológicos periódicos.

Se utilizaron 23 chivos de Gabón (peso corporal promedio $34,8 \pm 5,7$ kg) separados en tres grupos. Uno de los grupos fue utilizado como control (Grupo control, Gcon, n=9) y no se le realizó ningún tratamiento. Los animales de otro de los grupos fueron tratados al comienzo de la estación reproductiva (noviembre) con un único implante subcutáneo de GnRH en la zona pre escapular de cada animal conteniendo 4,7 mg de acetato de deslorelina (Suprelorin, Virbac, España) (Grupo implante, Gimp n=7). Los del grupo restante fueron inoculados con una vacuna anti GnRH (300µg diluidos en 2mL s/c por animal) (Improvac, Zoetis, Bruselas, Bélgica) (Grupo vacuna, Gvac, n=7). La primera dosis de la vacuna se aplicó el mismo día en que se realizó la colocación de los implantes al Gimp, y el booster se administró 21 días después. El ensayo se realizó durante un periodo de 16 meses, realizando 7 colecciones de semen en los meses de noviembre, diciembre, enero, mayo, agosto, noviembre y marzo.

3.2 Evaluación del semen fresco

Las muestras de semen se colectaron mediante electroeyaculación, utilizando un equipo que cuenta con un vástago de 30 x 1,5 cm con 4 electrodos circulares de 1 cm de ancho (Fuhijira Industry, Tokyo, Japón). Se aplicó un voltaje creciente, iniciando con 3 V, ejecutando series de 2-3 s con descansos de 2 s hasta obtener el eyaculado. Las muestras se obtuvieron directamente en copas de vidrio temperadas a 37 °C.

En el semen fresco se determinó la calidad de la motilidad asignándose una escala de 0 a 5, siendo 0 cuando no hay movimiento de espermatozoides y 5 cuando el movimiento es muy rápido (Fernández et al., 2013), el volumen del eyaculado, la motilidad espermática de masa (MM) mediante microscopio óptico (Nikon, modelo Eclipse E200, Shanghai, China con un aumento de 4x) asignándose una escala entre 0 y 5 de acuerdo a la cantidad de remolinos y la velocidad de movimiento de los mismos, los porcentajes de espermatozoides motiles y con motilidad progresiva

(MP, porcentaje de espermatozoides que se mueven en forma rectilínea y progresiva). La determinación de la calidad de la motilidad y de la motilidad espermática (tanto la MM como la MP) se realizaron de manera subjetiva, siempre por el mismo observador. Luego se fijó una alícuota de semen fresco en formol citrato para determinar la concentración espermática y el porcentaje de espermatozoides con morfología normal. La integridad funcional de membrana de los espermatozoides se evaluó tras 15 min de incubación en un medio hipo osmótico (HOST). Esta prueba se utilizó para identificar los espermatozoides con membrana funcional, es decir los que reaccionan a la solución hipo osmótica por aumento y rizado de los flagelos en comparación con espermatozoides dañados que se mantienen sin cambios.

3.3 Congelación de semen

Luego de la evaluación de las muestras de semen fresco se realizó el agregado de un diluyente comercial (Andromed, Minitube, Tienfenbach, Alemania). Se congelaron solamente las muestras de semen fresco con una calidad de la motilidad igual o mayor 3. Para ello se extrajeron 10 μ L de la muestra fijada en formol citrato, se determinó la concentración espermática con una cámara de Neubauer y se calculó el total de espermatozoides en el eyaculado. En función de ello se calculó el volumen de diluyente a agregar para congelar el semen en pajuelas de 0,5 mL con un total de 100×10^6 espermatozoides. Luego del agregado del diluyente se determinó inmediatamente la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides motiles y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva mediante evaluación subjetiva. Además, se fijaron muestras en formol citrato para determinar el porcentaje de espermatozoides con morfología normal y el porcentaje de espermatozoides con integridad funcional de la membrana mediante el test de HOST. Las muestras de semen acondicionadas en las pajuelas se colocaron en un recipiente con agua a 20 °C y se llevaron a heladera hasta alcanzar los 5 °C (curva de enfriado de 1 h 30 min aproximadamente, 1,7 °C/min). Posteriormente las muestras de semen se colocaron en vapor de nitrógeno (5 cm por encima de la superficie de nitrógeno en una caja de almacenamiento criogénico, aproximadamente -120 °C) durante 10 minutos (11,5 °C/min) antes de sumergirlas en el nitrógeno líquido. En el mes de agosto no se congelaron muestras de semen debido a que no fue posible coleccionar semen de la mayoría de los animales. Además, de los que sí fue posible coleccionar muestras de semen, las mismas tuvieron una calidad de la motilidad inferior a 3. Las pajuelas se conservaron identificadas individualmente en nitrógeno líquido a -196 °C hasta su descongelación para evaluar el semen pos congelado.

3.4. Descongelación de semen y evaluación de semen descongelado

Las muestras de semen almacenadas en nitrógeno líquido se retiraron del mismo y se mantuvieron a temperatura ambiente por 10 s. Luego se sumergieron en solución fisiológica en baño maría a 37 °C durante 30 s. Por último, se retiró la muestra de semen contenida en las pajuelas y se colocó en un tubo eppendorf para determinar inmediatamente (T0) y a los 30 (T30), 60 (T60) y 90 (T90) min pos descongelado:

- la calidad de la motilidad (mediante evaluación subjetiva)
- el porcentaje de espermatozoides motiles (mediante software *Integrated Semen Analysis System* - ISAS).
- el porcentaje de espermatozoides motiles progresivos (mediante software *Integrated Semen Analysis System* - ISAS).
- el porcentaje de espermatozoides con morfología normal del semen fresco al tiempo 30 min pos-descongelado
- el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional

3.5 Análisis estadístico

Los datos del semen fresco fueron comparados mediante un procedimiento mixto, considerando como efectos principales el tratamiento (implante, vacuna y control) y el tiempo (meses, momentos de colección) y la interacción entre tratamiento y tiempo. Los datos del semen descongelado fueron comparados mediante un procedimiento mixto, considerando como efectos principales el tratamiento (implante, vacuna y control) y el tiempo pos descongelación (etapas de evaluación T0, T30, T60 y T90) para cada momento de colección y la interacción entre tratamiento y la etapa. El porcentaje de espermatozoides con morfología normal se comparó desde el semen fresco hasta 30 min pos descongelado mediante un modelo mixto considerando como efectos principales el tratamiento (implante, vacuna y control) y las etapas de evaluación (semen fresco, semen fresco con el agregado del diluyente, T0 y T30) para cada momento de colección y la interacción entre tratamiento y la etapa.

4- RESULTADOS

4.1. *Parámetros seminales semen fresco*

La MM tendió a ser mayor en el semen del Gcon ($2,5 \pm 0,2$) que en el del Gvac ($1,7 \pm 0,3$, $P= 0,08$). No hubo diferencias entre el Gcon y Gimp, ni entre Gimp y Gvac. Se observó una interacción entre grupo y tiempo ($P= 0,02$): en enero la MM fue mayor en el Gcon que en el Gimp ($P= 0,003$) y tendió a ser mayor en el Gcon que en el Gvac ($P= 0,07$). En mayo la MM fue mayor para el Gcon que en el Gimp ($0,02$) y en marzo fue mayor en el Gimp que en el Gvac ($P= 0,05$) (Figura 1A).

El porcentaje de espermatozoides motiles fue mayor en el semen del Gcon ($67,1 \pm 4,2\%$) que en el del Gvac ($52,7 \pm 5,0\%$, $P= 0,04$). No hubo diferencias entre el Gcon e Gimp, ni entre Gimp y Gvac. No hubo interacción entre el grupo y el tiempo.

El porcentaje de espermatozoides con MP fue mayor en el semen del Gcon ($56,2 \pm 3,2\%$) que en el del Gvac ($41,1 \pm 3,8\%$, $P= 0,007$). No hubo diferencias entre el Gcon e Gimp, ni entre Gimp y Gvac. Se observó una interacción entre el tratamiento y el momento de colección ($P= 0,04$): en mayo el porcentaje de espermatozoides MP fue mayor en el semen del Gcon que en el Gvac ($P= 0,006$) (Figura 1B).

El porcentaje de espermatozoides con morfología normal fue mayor en el semen del Gcon ($61,4 \pm 2,6\%$) que en el del Gimp ($51,5 \pm 3,4\%$, $P= 0,03$). No hubo diferencias entre el Gcon y el Gvac, ni entre Gimp y Gvac. Se observó una interacción entre el tratamiento y el momento de colección ($P= 0,05$): en diciembre el porcentaje de espermatozoides con morfología normal fue mayor en el semen del Gcon que en el Gimp ($P= 0,01$) y en enero fue mayor en el Gcon que en el Gvac ($P= 0,02$) (Figura 1C).

La cantidad total de espermatozoides fue menor en el semen del Gcon ($1070 \times 10^6 \pm 5117 \times 10^6$) que en el del Gvac ($3555 \pm 5692 \times 10^6$, $P= 0,004$) y fue menor en el del Gimp ($1199 \times 10^6 \pm 5952 \times 10^6$) que en el del Gvac ($P= 0,01$). Se observó una interacción entre el grupo y el tiempo ($P < 0,0001$): en marzo la cantidad total de espermatozoides fue menor para el semen del Gcon que en el Gvac ($P= 0,0001$) y fue menor en el semen de el Gimp que en el Gvac ($P= 0,0001$) (Figura 1D).

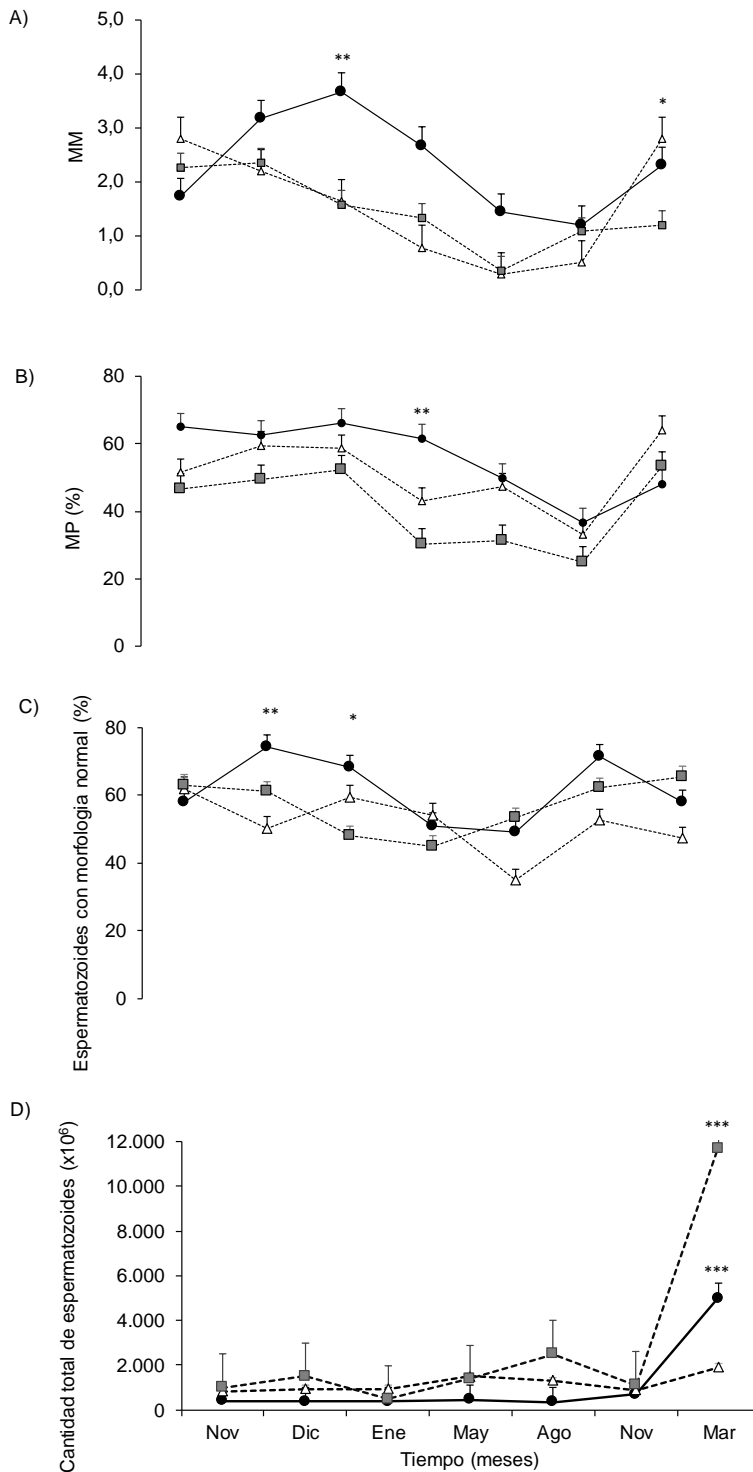


Figura 1. A: Motilidad espermática de masa (MM), B: espermatozoides con motilidad progresiva (MP) (%), C: espermatozoides con morfología normal, y D: cantidad total de espermatozoides de chivos adultos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH (n=7, Gimp Δ), inmunoneutralizados contra GnRH (n=7, Gvac \blacksquare) y chivos no tratados (n=9, Gcon \bullet). Diferencias entre grupos para un mismo tiempo (mes) se muestran como: * ($P \leq 0,05$) ** ($P < 0,01$) y *** ($P < 0,0001$).

El porcentaje de espermatozoides con membrana funcional fue mayor para el Gcon ($74 \pm 3,7$ %) y Gimp ($64 \pm 4,8$ %) que para el Gvac ($50 \pm 4,4$ %, $P= 0,0005$ y $P= 0,04$, respectivamente). No hubo interacción entre el grupo y el tiempo (Figura 2).

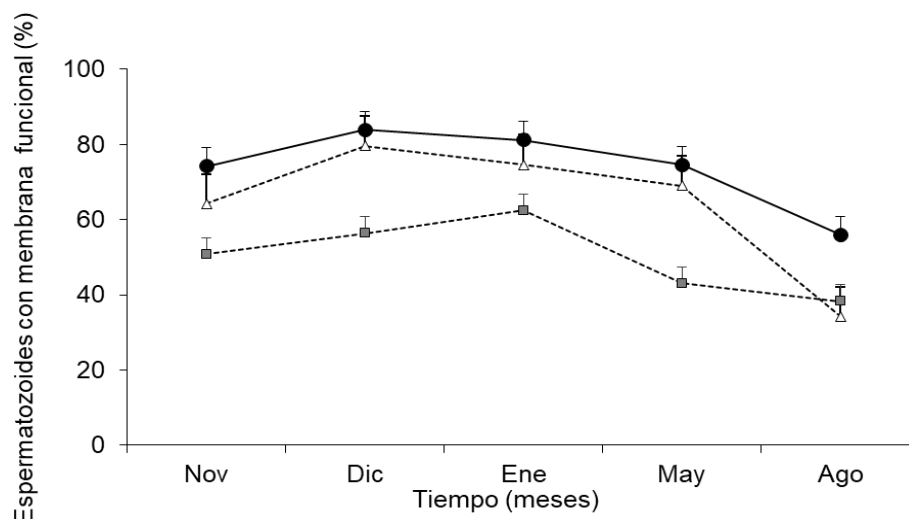


Figura 2. Espermatozoides con membrana funcional (%) de chivos adultos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH ($n=7$, Δ), inmunoneutralizados contra GnRH ($n=7$, \blacksquare) y chivos no tratados ($n=9$, \bullet).

4.1.2 Parámetros seminales pre y pos descongelado

La calidad de la motilidad no fue diferente entre grupos en ninguno de los momentos de colección (meses), excepto en mayo, en que fue mayor en el semen de los chivos del Gcon ($1,3 \pm 0,19$) que en el Gvac ($0,52 \pm 0,04$, $P= 0,02$), no siendo diferente al del Gimp ($0,5 \pm 0,2$). Además, se observó interacción entre el grupo y la etapa ($P= 0,02$): en el mes de mayo la calidad de la motilidad en el semen fresco fue mayor en el semen de los chivos Gcon que en los del Gvac ($P= 0,01$) y tendió a ser mayor que en los del Gimp ($P= 0,06$); en el semen fresco con el agregado de diluyente fue mayor en el semen de los chivos del Gcon que en los del Gvac ($P= 0,003$); en el T0 fue mayor en el semen del Gcon que en el Gimp ($P= 0,02$) y Gvac ($P= 0,0001$) (Figura 3). La calidad de la motilidad varió con las etapas para todos los momentos de colección ($P < 0,0001$ para todas las comparaciones).

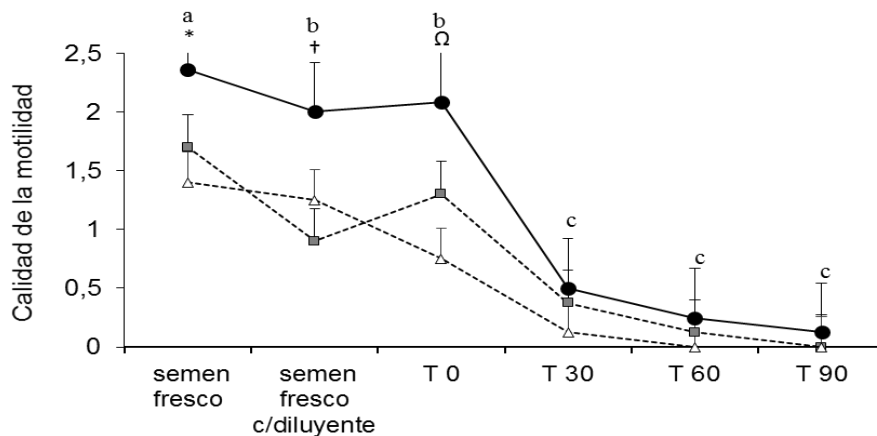


Figura 3. Calidad de la motilidad en el mes de mayo de chivos adultos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH (n=7, Δ), inmunoneutralizados contra GnRH (n= 7, ■) y chivos no tratados (n=9, ●). Diferencias entre grupos para para el semen fresco se indican como: * (P< 0,01); para el semen con agregado de diluyente como: † (P< 0,003) y para T0 como: Ω (P< 0,0001). Diferentes letras indican diferencias entre tiempos.

El porcentaje de espermatozoides motiles del semen fresco luego del agregado del diluyente no fue diferente entre grupos para ninguno de los momentos de colección (meses), excepto para noviembre y mayo. En noviembre el porcentaje de espermatozoides motiles en el semen de los chivos fue mayor para el Gcon ($70,0 \pm 2,6$ %) que en los del Gimp ($52,5 \pm 5,3$ %, P= 0,01) y el Gvac ($47,0 \pm 3,4$ %, P= 0,0001). En el mes de mayo el porcentaje de espermatozoides motiles en el semen de los chivos fue mayor para el Gcon ($63,9 \pm 5,7$ %) que en los del Gimp ($42,0 \pm 7,7$ %, P= 0,04) y los del Gvac ($34,1 \pm 7,7$, P= 0,007). Además, se observó interacción entre el grupo y la etapa (P= 0.004): en el mes de mayo el porcentaje de espermatozoides motiles en el semen fresco fue mayor en los del Gcon que en los del Gvac (P= 0,008) (Figura 4). El porcentaje de espermatozoides motiles del semen fresco de los chivos en relación al semen fresco con el agregado de diluyente varió con las etapas para todos los momentos de colección (meses) (P< 0,02 para las comparaciones de diciembre y enero; P< 0,0003 para marzo y P< 0,0001 para mayo).

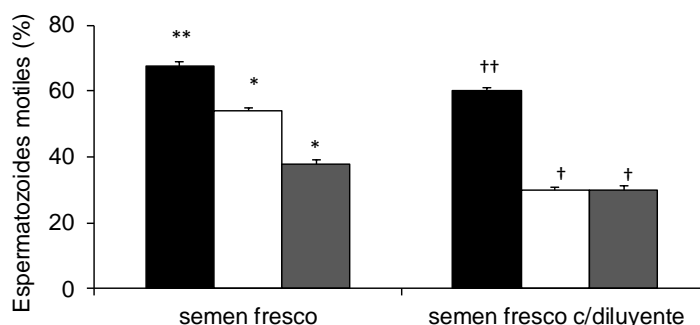


Figura 4. Espermatozoides motiles (%) del semen fresco en relación al semen fresco con el agregado de diluyente en el mes de mayo de chivos adultos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH (n=7, barras blancas), inmunoneutralizados contra GnRH (n=7, barras grises) y chivos no tratados (n=9, barras negras). Diferencias entre grupos para el semen fresco se indican como: ** (P< 0,01) y para el semen fresco con el agregado de diluyente como: †† (P< 0,01).

El porcentaje de espermatozoides con MP del semen fresco de los chivos luego del agregado del diluyente no fue diferente entre grupos para ninguno de los momentos de colección (meses), excepto para el mes de noviembre y mayo. En noviembre la MP del semen fresco de los chivos en relación al semen fresco con el agregado de diluyente fue mayor los del Gcon ($63,6 \pm 4,0\%$) que en los del Gimp ($47,1\%$, $P= 0,03$) y los del Gvac ($40,1 \pm 4,9\%$, $P= 0,002$). En mayo la MP del semen fresco de los chivos en relación al semen fresco con el agregado de diluyente fue mayor en los del Gcon ($58,6 \pm 5,1\%$) que en los del Gimp ($33,5 \pm 6,8\%$, $P= 0,001$) y Gvac ($24,2 \pm 6,8\%$, $P= 0,001$). Además, se observó interacción entre el grupo y la etapa ($P= 0,03$): en el mes de mayo el porcentaje de espermatozoides con MP en el semen fresco de los chivos fue mayor en los del Gcon que en los del Gvac ($P= 0,001$) y tendió a ser mayor en los del Gimp que en los del Gvac ($P= 0,07$); en el semen fresco con el agregado de diluyente fue mayor en los del Gcon que en los del Gimp ($P= 0,003$) y Gvac ($P= 0,004$) (Figura 5). El porcentaje de espermatozoides con MP del semen fresco de los chivos en relación al semen fresco con el agregado de diluyente varió con las etapas para todos los momentos de colección (meses) ($P < 0,01$ para las comparaciones de noviembre y mayo; $P < 0,0004$ para enero y $P < 0,0001$ para las comparaciones de diciembre y marzo).

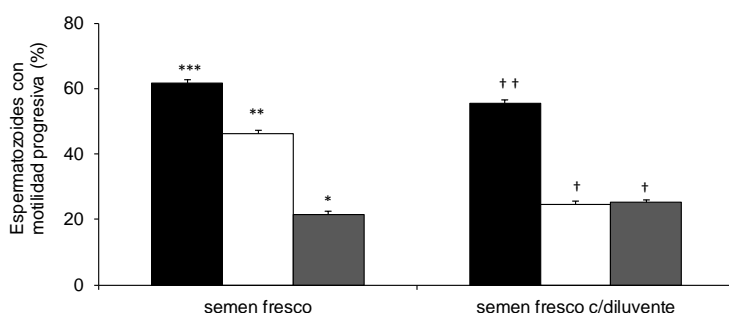


Figura 5. Espermatozoides con motilidad progresiva (MP) del semen fresco en relación al semen fresco con el agregado de diluyente en el mes de mayo de chivos adultos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH ($n=7$, barras blancas), inmunoneutralizados contra GnRH ($n=7$, barras grises) y chivos no tratados ($n=9$, barras negras). Diferencias entre grupos para para el semen fresco se indican como: ** ($P < 0,001$) y para el semen c/diluyente como: †† ($P < 0,003$).

El porcentaje de espermatozoides con morfología normal del semen fresco al T30 (30 min después de descongelado) no fue diferente entre grupos para ninguno de los momentos de colección (meses), excepto para diciembre y enero. En diciembre el porcentaje de espermatozoides con morfología normal del semen fresco al T30 fue mayor en el semen del Gcon ($71,3 \pm 3,7\%$) que en el del Gimp ($54,5 \pm 5,7\%$, $P= 0,02$) y tendió a ser mayor en el semen del Gcon que en el del Gvac ($60,4 \pm 4,5\%$, $P= 0,08$). En enero el porcentaje de espermatozoides con morfología normal del semen fresco al T30 fue mayor en los del Gcon ($64,2 \pm 6,5\%$) que en los del Gvac ($39,0 \pm 7,4\%$, $P= 0,02$) no siendo diferente en los del Gimp ($56,4 \pm 8,1$). No se observó interacción entre el grupo y la etapa de colección para ninguno de los momentos de colección, excepto para noviembre ($P= 0,01$) y enero ($P= 0,01$): en noviembre el porcentaje de espermatozoides con morfología normal en el semen

fresco con el agregado de diluyente fue mayor en el semen del Gcon que en el del Gimp ($P= 0,03$) y en el T30 tendió a ser mayor en el del Gcon que en el semen del Gvac ($P= 0,06$) (Figura 6A). En enero el porcentaje de espermatozoides con morfología normal en el semen fresco con el agregado de diluyente fue mayor en el semen del Gcon que en el del Gvac ($P= 0,003$) y en el T30 fue mayor en el semen del Gcon que en el del Gvac ($P=0,02$) (Figura 6B). El porcentaje de espermatozoides con morfología normal del semen de los chivos varió con las etapas para todos los momentos de colección (meses) ($P< 0,002$ para las comparaciones de noviembre, enero y marzo).

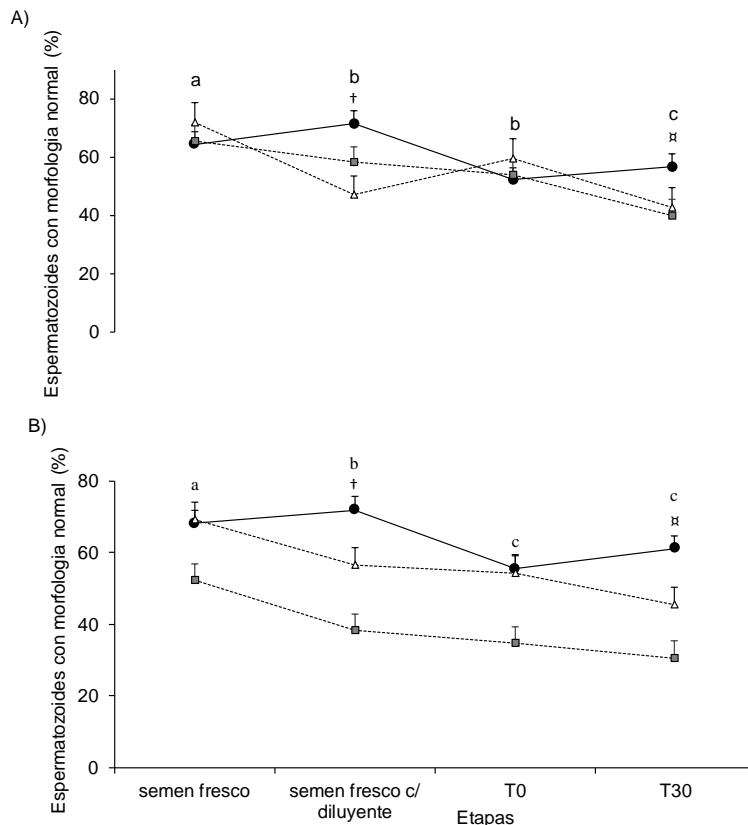


Figura 6. Espermatozoides con morfología normal del semen fresco al tiempo 30 en el mes de noviembre (A) y enero (B) de chivos adultos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH ($n=7$, Δ), inmunoneutralizados contra GnRH ($n=7$, \blacksquare) y chivos no tratados ($n=9$, \bullet). Diferencias entre Gcon y Gvac para una misma etapa se indican como: † ($P< 0,03$) ‡ ($P< 0,02$). Diferentes letras indican diferencias entre tiempos.

El porcentaje de espermatozoides con membrana funcional del semen de los chivos no fue diferente entre grupos para ninguno de los momentos de colección. Se observó una interacción entre el grupo y la etapa en los meses de noviembre y diciembre ($P= 0,04$ respectivamente) y mayo ($P= 0,02$). En noviembre el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional en el semen fresco de los chivos fue mayor en el del Gcon que en el del Gvac ($P= 0,005$) (Figura 7A). En diciembre el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional en el semen fresco de los chivos fue mayor en el del Gcon que en el del Gvac ($P= 0,0004$); y fue mayor en el

del Gimp que en el del Gvac ($P= 0,01$) (Figura 7B). En mayo el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional en el semen fresco de los chivos fue mayor en el del Gcon que en el del Gvac ($P= 0,001$) y fue mayor en el del Gimp que en el del Gvac ($P= 0,01$) (Figura 7C). El porcentaje de espermatozoides con membrana funcional del semen de los chivos disminuyó con las etapas para todos los momentos de colección (meses) ($P < 0,0001$ para todas las comparaciones).

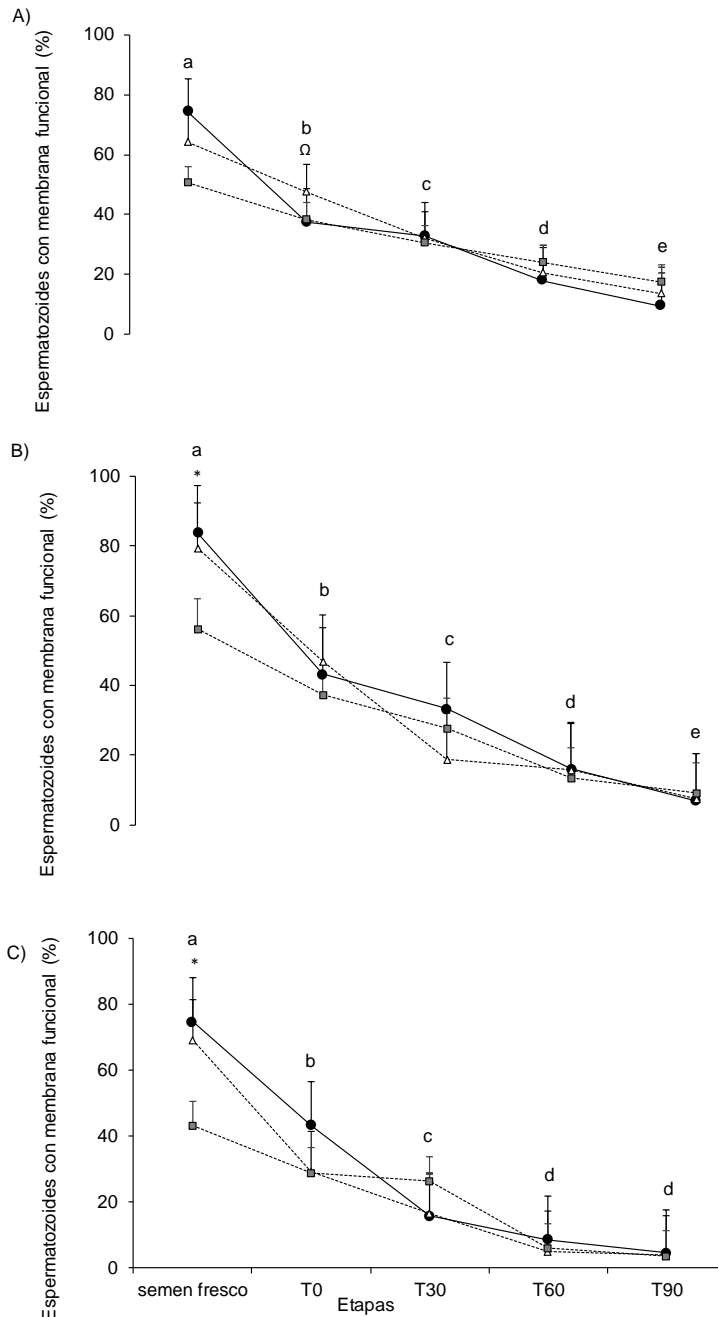


Figura 7. Espermatozoides con membrana funcional del semen fresco al tiempo 90 en el mes de noviembre (A), diciembre (B) y mayo (C) de chivos adultos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH ($n=7$, Δ), inmunoneutralizados contra GnRH ($n=7$, \blacksquare) y chivos no tratados ($n=9$, \bullet). Diferencias en (A, B y C) entre Gcon y Gvac para una misma etapa se indican como: * ($P < 0,005$; $P < 0,0004$; $P < 0,001$). Diferentes letras indican diferencias entre tiempos.

4.1.3 Parámetros seminales semen descongelado

El porcentaje de espermatozoides motiles del semen descongelado (etapa T0, T30, T60 y T90) de los chivos no fue diferente entre grupos para ninguno de los momentos de colección (meses), excepto para el mes de mayo donde fue mayor en el del Gcon ($38,9 \pm 3,7\%$) que en el del Gimp ($25,9 \pm 4,8$, $P= 0,05$) y el del Gvac ($21,4 \pm 4,9$, $P= 0,01$). Además, se observó interacción entre el grupo y la etapa ($P= 0,02$): en el mes de mayo el porcentaje de espermatozoides motiles del semen descongelado en el T0 fue mayor en el del Gcon que en el del Gvac ($P= 0,0002$) y fue mayor en el del Gimp que en el del Gvac ($P= 0,03$); en el T30 fue mayor en el del Gcon que en el del Gimp ($P= 0,002$) y el del Gvac ($P= 0,001$) (Figura 4B). El porcentaje de espermatozoides motiles del semen descongelado de los chivos varió con las etapas para todos los momentos de colección (meses) ($P < 0,03$ para diciembre; $P < 0,01$ para las comparaciones de noviembre y enero y $P < 0,0001$ para las comparaciones de mayo y marzo).

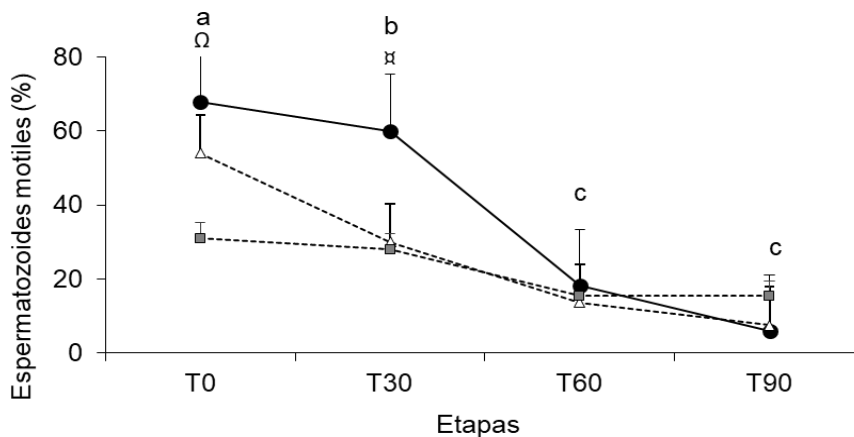


Figura 8. Espermatozoides motiles (%) del semen descongelado en el mes de mayo de chivos adultos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH ($n=7$, Δ), inmunoneutralizados contra GnRH ($n=7$, \blacksquare) y chivos no tratados ($n=9$, \bullet). Diferencias entre Gcon, Gimp y Gvac para T0 se indican como: Ω ($P < 0,0002$) y para T30 α ($P < 0,001$). Diferentes letras indican diferencias entre tiempos.

El porcentaje de espermatozoides con MP del semen descongelado de los chivos no fue diferente entre grupos en ninguno de los momentos de colección (meses), excepto en noviembre y mayo. En noviembre la MP del semen de los chivos descongelado (etapa T0, T30, T60 y T90) fue mayor en el del Gcon ($12,3 \pm 2,1\%$) que en el del Gimp ($2,2 \pm 3,7\%$, $P= 0,03$), no siendo diferente a los del Gvac ($6,4 \pm 2,9$). En mayo la MP del semen descongelado de los chivos fue mayor en el del Gcon ($5,7 \pm 1,0\%$) que los del Gvac ($1,9 \pm 1,1\%$, $P= 0,03$) no siendo diferente a los del Gimp ($3,9 \pm 1,2\%$). No se observó interacción entre el grupo y la etapa para ninguno de los momentos de colección, excepto para noviembre ($P= 0,0008$): en la etapa T0 fue mayor en el del Gcon que en el del Gimp ($P= 0,0001$) y el del Gvac ($P= 0,0001$) (Figura 9). El porcentaje de espermatozoides con MP del semen descongelado de los chivos varió con las etapas para todos los momentos de colección (meses) ($P < 0,0004$ para enero y $P < 0,0001$ para las comparaciones de noviembre, diciembre mayo y marzo).

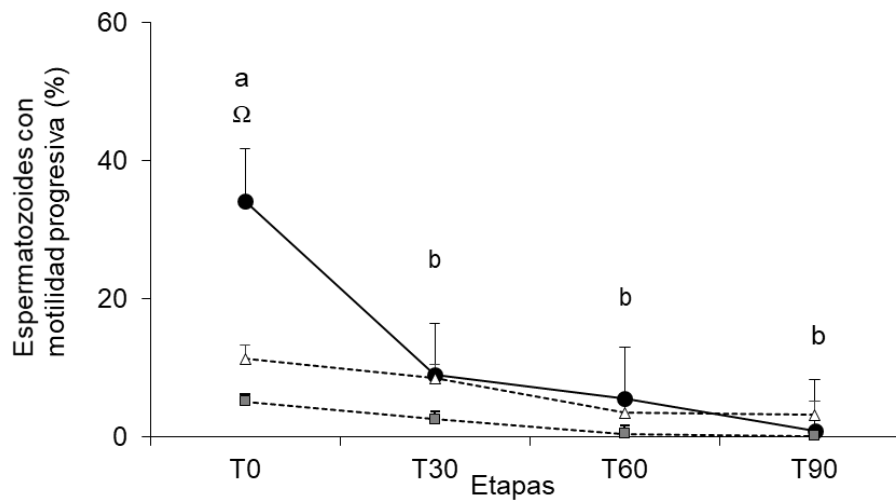


Figura 9. Espermatozoides con motilidad progresiva (MP) del semen descongelado en el mes de noviembre de chivos adultos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH (n=7, Δ), inmunoneutralizados contra GnRH (n=7, \blacksquare) y chivos no tratados (n=9, \bullet). Diferencias entre grupos para una misma etapa se indican como Ω ($P < 0,0001$). Diferentes letras indican diferencias entre tiempos.

5- DISCUSIÓN

El uso crónico de un agonista de GnRH y la inmunoneutralización de la GnRH afectaron negativamente la calidad del semen fresco y la crioresistencia seminal en chivos adultos. Ambos tratamientos afectaron de manera diferente las características seminales a lo largo de la estación reproductiva y no reproductiva. Se observaron diferencias entre los tratamientos en el porcentaje de espermatozoides con morfología normal y con membrana funcional, afectándose más en los animales inmunizados contra GnRH en los meses de diciembre y mayo que en los tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH. Sin embargo, ambos tratamientos inhibieron la actividad reproductiva con duración similar. Debido a que los tratamientos difieren en su mecanismo de acción se podría especular que estos determinen la duración de sus efectos. Los agonistas de GnRH actúan directamente sobre los receptores de la GnRH provocando la desensibilización de los mismos, lo que determina una falla en la síntesis o una carencia en la liberación de gonadotrofinas (Navarro y Schober, 2012), mientras que en la inmunoneutralización contra GnRH, la unión a anticuerpos neutraliza la GnRH, evitando que se difunda enmascarando el sitio de unión del receptor en la molécula de GnRH (Thompson, 2000).

Debido a la aplicación de los tratamientos, es posible que se haya producido una estimulación insuficiente de las células de Sertoli, disminuyendo así la espermatogénesis. Esto se debe a que el efecto de ambos tratamientos provoca que la GnRH no pueda alcanzar la hipófisis generando así la insuficiente liberación de gonadotrofinas LH y FSH y en consecuencia la disminución de testosterona. Por lo tanto, es probable especular con que las células intersticiales no producen suficientes andrógenos debido a la falta de respuesta de la LH en sinergia con la FSH. Además, ocurriría una disminución en la interacción de los receptores de andrógenos de las células de Leydig, y por lo tanto no se activa la síntesis de adenilciclase para transformar la pregnenolona a testosterona. La disminución en las características de calidad de la motilidad, porcentaje de espermatozoides motiles, motiles progresivos y con morfología normal posiblemente se deba a que los gránulos secretores presentes en los conductos eferentes no proporcionen proteínas necesarias para la motilidad (Brandt, 1978). Ya que los espermatozoides sufren cambios fisicoquímicos adicionales entre la rete testis y la cola del epidídimo y adquieren motilidad progresiva a medida que pasan por el mismo, se podría pensar que en los animales tratados el fluido epididimario se pudo ver afectado, ya sea en la concentración de electrolitos (sodio, potasio y cloruro) y de aminoácidos, proteínas, fosfolípidos y enzimas (McDonald et al., 1991). De acuerdo a lo demostrado por Han et al. (2017) en testículos de carneros inmunoneutralizados contra GnRH y por Novotny et al. (2015) en testículos de perros tratados con el uso crónico de un implante de deslorelina, la disminución del porcentaje de espermatozoides con morfología normal puede ser el reflejo de una insuficiente producción de LH y consecuente disminución de la secreción de testosterona (Lincoln y Fraser, 1979; Fagerstone, 2010; Gökdal, 2010).

Al comienzo de la estación no reproductiva (en el mes de mayo) se observó una disminución en la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides motiles y de motiles progresivos en el grupo control, con valores aún menores en el grupo

implante y el grupo vacuna. En este trabajo, se pudo observar que la estación reproductiva tuvo una fuerte influencia en la fisiología reproductiva al disminuir los valores de las características seminales en el semen fresco y en el semen congelado y descongelado de los chivos del grupo control y tuvo una respuesta más marcada en los animales tratados. Se podría suponer que existió una baja respuesta en la liberación de melatonina por parte de la glándula pineal que llevó a que no se libere kisspeptina y no ocurra la estimulación de GnRH, disminuyendo así la secreción de gonadotropinas, lo que además se acentuó con la aplicación de los tratamientos. Es posible asumir que los efectos de los tratamientos produjeron la disminución de la concentración de testosterona en los meses previos al inicio de la estación reproductiva (febrero marzo y abril según Giriboni et al., 2018). Dado que la espermatogénesis requiere de 42 a 63 días para completarse (O'Donnell et al., 2006), esta disminución en la concentración de testosterona pudo provocar que la espermatogénesis de las células germinales no transcurra correctamente, llevando a una menor producción de espermatozoides en el mes de mayo. Esto a su vez podría asociarse con cambios en la susceptibilidad de las células al choque térmico, probablemente como resultado de los cambios en la permeabilidad de membrana espermática (McDonald et al., 1991). Dado que la concentración de cloruro de sodio es responsable de la tolerancia del semen al enfriamiento y congelación (Brass, 2008), la inmunoneutralización de la GnRH podría tener mayor impacto en la composición de plasma seminal y afectar más las concentraciones de sodio que el uso crónico de un agonista de GnRH. Debido a que el daño criogénico básico a los espermatozoides puede ser ultra estructural (físico), bioquímico o funcional, la discusión sobre la naturaleza de este daño está más allá del alcance de este experimento.

En suma, se compararon dos tratamientos hormonales para el control de la reproducción y se encontraron diferencias puntuales en los efectos producidos por ambos tratamientos. Tanto el uso crónico de un agonista de GnRH como la inmunoneutralización contra GnRH disminuyeron notoriamente la calidad espermática y la crioresistencia del semen.

6- CONCLUSIONES

- El uso crónico de un agonista de GnRH y la inmunoneutralización de la GnRH afectaron negativamente la calidad seminal del semen fresco y la crioresistencia seminal en chivos adultos.
- La inmunoneutralización de la GnRH afectó en mayor medida la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides con morfología normal y con membrana funcional que el uso crónico de un agonista de GnRH.

7- BIBLIOGRAFÍA

- 1) Adams, T. E., Daley, C. A., Adams, D. M., Sakurai, H. (1996). Testes function and feedlot performance of bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone: effect of age at immunization. *Journal of Animal Science*. 74:950-954.
- 2) Arimura, A., Sato, H., Kumasaka, T., Worobec, R. B., Debeljuk, L., Dunn, J., Schally, A.V. (1973). Production of antiserum to LH releasing hormone (LH-RH) associated with gonadal atrophy in rabbits: Development of radioimmuno assays for LH-RH. *Endocrinology*. 93:1092-1103.
- 3) Arthur, G. H., Nakes, D.E., Pearson, H. (1991). Aparato reproductor del macho. En: Arthur, G. H., Nakes, D.E., Pearson, H. *Reproduccion y obstetricia en veterinaria*. 6ª ed. Madrid, Interamericana, p.563-624.
- 4) Ballesteros, L., Delgado, N., Rosado, A., Hernández, O. (1983). Effect of steroid hormones on membrane sugar transport in human spermatozoa. *Archives of Andrology*. 11:95-100.
- 5) Bielli A (2002). Regulación hormonal de la función reproductiva en el macho. En: Ungerfeld R (Ed.). *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo. Melibea, p. 81-94.
- 6) Borque C, Vázquez I, (1999). Correlation between blood plasma levels of free and total testosterone and concentrations of some seminal markers in adult Manchego rams. *Small Ruminant Research*. 33:263-269.
- 7) Brandt, H., Acott, T. S., Johnson, D. J., Hoskins, D. D. (1978). Evidence for an epididymal origin of bovine sperm forward motility protein. *Biology of Reproduction*. 19(4):830-835.
- 8) Brass, K., Palma, G. (2008). Inseminación artificial en la especie equina. En: Palma, G. *Biotechnología de la reproducción*. 2ª ed. Mar del Plata, Gustavo Palma, p.547-587.
- 9) Calzada, L., Bernal, A., Loustaunau, E. (1988). Effect of steroid hormones and capacitation on membrane potential of human spermatozoa. *Archives of Andrology*. 21:121-128.
- 10) Canisso, I. F. (2008). Comportamento sexual, parâmetros seminais e fertilidade do sêmen congelado de jumentos (*Equus asinus*) da raza Pêga. Tesis, Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, 211 p.
- 11) Caraty A, Locatelli A, Delaleu B, Spitz IM, Schatz B, Bouchard P. (1990). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonists and GnRH antagonists do not alter endogenous GnRH secretion in short-term castrated rams. *Endocrinology*. 127:2523-2529.

- 12)Cardozo JA, Fernández-Juan M, Forcada F, Abecia A, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA., (2006). Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*. 66:841-850.
- 13)Casao A, Cebrián I, Asumpção ME, Pérez-Pé R, Abecia JA, Forcada F, Cebrián-Pérez JÁ, Muiño-Blanco T, (2010). Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 8:59.
- 14)Cavitte JC, Lahlou N, Mialot JP, Mondain-Monval M, Mialot M, Nahoul K, Morel C, Roger M, Schally A-V. (1988). Reversible effects of long-term treatment with D-Trp6-LH-RH microcapsules on pituitarygonadal axis, spermatogenesis and prostate morphology in adolescent and adult dogs. *Andrologia*. 20:249-263.
- 15)Chatterjee, S. (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development*. 59:451-458.
- 16)Chemineau P, Delgadillo J.A. (1993). Neuroendocrinología de la reproducción en el caprino. *Revista Científica*. 3:113-121.
- 17)Chemineau, P., Malpoux, B., Brillard, J.P., Fostier, A., (2007). Seasonality of reproduction and production in farm fishes, birds mammals. *Animal*. 1:419-432.
- 18)Clarke, I.J. (2011).Control of GnRH Secretion: one step back. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 32(3):367-375.
- 19)Coloma, M.A., Gómez-Brunet, A., Velázquez, R., Toledano-Díaz, A., López-Sebastián, A., SantiagoMoreno, J., 2010b. Freezability of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa according to the glycerolization temperature and plasma testosterone concentration. *Cryobiology*, 61: 204-210.
- 20)Corrada Y, Hermo G, Johnson CA, Trigg TE, Gobello C. (2005). Short-term progestin treatments prevent estrous induction by a GnRH agonist implant in anestrus bitches. *Theriogenology*. 65:366-73.
- 21)Culler MD, Negro-Vilar A (1987) Pulsatile follicle-stimulating hormone secretion is independent of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH): pulsatile replacement of LHRH bioactivity in LHRH immunoneutralized rats *Endocrinology*. 120: 2011-2021.
- 22)Davies, MCG (1999). Semen evaluation. En: Davies-Morel MCG (ed). *Equine artificial insemination*. Wallingford, CABI, p. 190-233.
- 23)Delgadillo JA, Canedo GA, Chemineau P, Guillaume D, Malpoux B, (1999). Evidence for an anual reproductive rrythm independent of food availability in male Creole goats in subtropical northenMexico.*Theriogenology*. 52: 727-737.

- 24)DeOliveira, C. H. (2007). Avaliação das características do espermatozóide equino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas. Tesis, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. 85 pp.
- 25)Domínguez MP, Falcinelli A, Hozbor F, Sánchez E, Cesari A, Alberio RH, (2008). Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology* 69:564-573.
- 26) Ezzat-Ahmed, A, Saito, H, Sawada, T, Yaegashi, T, Yamashita, T, Hirata, T I, Sawai, K, Hashizume, T (2009). Characteristics of the stimulatory effect of kisspeptin-10 on the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and growth hormone in prepubertal male and female cattle. *Journal of Reproduction and Development*. 55(6):650-654.
- 27)Fagerstone, KA, Miller, LA, Killian, GJ, Yoder, CA (2010). Review of issues concerning the use of reproductive inhibitors, with particular emphasis on resolving human-wildlife conflicts in North America. *Integrative Zoology*. 1: 15-30.
- 28)Farshad A, Yousefi A, Moghaddam A, Khalili B, (2012). Seasonal changes in serum testosterone, Idh concentration and semen characteristics in Markhoz goats. *Asian- Australasian Journal of Animal Science*. 25:189-193.
- 29)Fernández, S., Sestelo, A., Rivolta, M., Córdoba, M., 2013. Capacitation and acrosome reaction induction on thawed Dama dama deer spermatozoa: glycine effect as cryopreservation diluent supplement. *Zoological science*, 30: 1110-1116.
- 30)Field, RA (1971). Effect of castration on meat quality and quantity. *Journal of Animal Science*. 32: 849.
- 31)Fink, G. (1988). Gonadotropin secretion and its control. *The physiology of reproduction*. 1:1349-1377.
- 32)Fraser, HM(1982). Antifertility effects of GnRH. *Journal of Reproduction and Fertility*. 64: 503-515.
- 33)Gillan, L, Maxwell, MC (1998). The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl*. 54:271-283.
- 34)Gillan, L, Maxwell, MC, Evans, G (2004). Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reproduction, Fertility and Development*. 16: 447-454.

- 35) Giriboni, J, Lacuestaa, L, Santiago-Moreno, J, Ungerfeld, R (2018). Chronic use of a GnRH-agonist (deslorelin) or immunization against GnRH: effects on testicular function and sperm quality of bucks. *Animal Endocrinology*, doi, (en prensa).
- 36) Goeritz, F, Quest, M, Wagener, A, Fassbender, M, Broich, A, Hildebrandt, TB, Hofmann, RR, Blottner, S (2003). Seasonal timing of sperm production in roe deer: interrelationship among changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands. *Theriogenology* 59:1487-1502.
- 37) Gojska NM, Friedman Z, Belsham DD. (2014) Direct regulation of gonadotrophinreleasing hormone (GnRH) transcription by RF-amide-related peptide-3 and kisspeptin in a novel GnRH-secreting cell line, mHypoA-GnRH/GFP. *Journal of Neuroendocrinology*. 26(12):888-897.
- 38) Gökdal O, Atay O, Ulker H, Kayaardi S, Kanter M, DeAvila MD. (2010) The effects of immunological castration against GnRH with recombinant OL protein (Ovalbumin-LHRH-7) on carcass and meat quality characteristics, histological appearance of testes and pituitary gland in Kivircik male lambs. *Meat Science*. 86(3):692-698.
- 39) Hochereau-deReviere MT, Monet-Kuntz C, Courrot M. (1987). Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *Journal of Reproduction and Fertility*. 22-4251.
- 40) Hoffmann, K, Illnerova, H, Vanecek, J (1981). Effect of photoperiod and of one minute light at night-time on the pineal rhythm of N-acetyltransferase activity in the Djungarian hamsters *Phodopus sungorus*. *Biology of Reproduction*. 24:551- 556.
- 41) Hull, M.E.; Kenigsberg, D.J. 1987. Gonadotropin releasing hormone: function and clinical use. *Lab. Manag.* 25:51-58.
- 42) Inaba, T, Umerhara, T, Mori, J, Torii, R, Tamada, H, Sawada, T (1996). Reversible suppression of pituitary testicular function by a sustained release formulation of GnRH agonist (leuprolide acetate) in dogs. *Theriogenology*, 46:671-677.
- 43) Isachenko E (2003). Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive Biomedicine Online*. 6(2):191-200.
- 44) Jago, JG, Cox, NR, Bass, JJ, Matthews, LR (1997). The effect of prepubertal immunization against gonadotropin-releasing hormone on the development of sexual and social behavior of bulls. *Journal of Animal Science*. 75:2609-2619.

- 45) Jeffcoate, IA, Lucas, JMS, Crighton, DB(1982). Effects of active immunization of ram lambs and bull calves against synthetic luteinizing hormone releasing hormone. *Theriogenology*. 18:65-77.
- 46) Junaidi, A, Williamson, PE, Cummins, JM, Martin, GB, Blackberry, MA, Trigg, TE(2003). Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs. *Reproduction Fertility and Development*. 15: 317-322.
- 47) Junaidi A, Williamson PE, Martin GB, Blackberry MA, Cummins JM, Trigg TE, (2007). Dose–response studies for pituitary and testicular function in male dogs treated with the GnRH superagonist, deslorelin. *Reproduction in Domestic Animals*. 44(5):725-734.
- 48) Karten MJ, River JE (1986). GnRH analog design, structure-function studies toward the development of agonists and antagonist: rationale perspective. *Endocrine Reviews*. 7(1):44-66.
- 49) Kerr JB, Sharpe, RM (1985). Follicle-stimulating hormone induction of Leydig cell maturation. *Endocrinology*. 116(6):2592-2604
- 50) Kirkpatrick, JF, Turner, JW (1991). Reversible contraception in nondomestic animals. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 22:392-408.
- 51) Lacoste D, Labrie F, Dube D, Belanger A, Tice T, Gilley RM, Pledger KL.(1989). Reversible inhibition of testicular androgen secretion by 3-, 5-and 6-month controlled release microsphere formulation of the LH-RH agonist [D-Trp6, des-Gly-NH2 10] LH-RH ethylamide in the dog. *Journal of Steroid Biochemistry*. 33(5):1007-10.
- 52) Land, RB (1973). The expression of female sex-limited characters in the male. *Nature* 241:208-209.
- 53) La Falci, VSN, Tortorella, H., Rodrigues, JL, Brandelli, A (2002). Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology*. 57: 1035-1048.
- 54) Leahy T, Marti JI, Evans G, Maxwell WM, (2010). Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 119:147-153.
- 55) Leblond CP, Clermont Y (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 55:548-573
- 56) Lincoln, GA, Fraser, HM(1979). Blockage of episodic secretion of luteinizing hormone in the ram by the administration of antibodies to luteinizing hormone releasing hormone. *Biology of Reproduction*. 21:1239-1245.

- 57) Lincoln GA, Fraser, HM, Abbott MP. (1986). Blockade of pulsatile LH, FSH and testosterone secretion in rams by constant infusion of an LHRH agonist. *Journal of Reproduction Fertility*. 77(2):587-597.
- 58) Madrid-Bury, N (2004). Relación entre los métodos de valoración seminal in vitro y la fertilidad in vivo del semen descongelado de toros frisonos. Tesis Universidad Complutense de Madrid, España. Facultad de Veterinaria 164 p.
- 59) Malpoux, B, Viguié, C, Skinner, DC, Thiéry, JC, Chemineau, P (1997). Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Research Bulletin*. 44(4):431-438.
- 60) Manjunath, P, Therien I (2002). Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*. 53(1-2):109-119.
- 61) Marti E, Mara L, Marti JI, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. (2007). Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology*. 67:1446-1454.
- 62) Martorana, K, Klooster, K, Meyers, S (2014). Suprazero cooling rate, rather than freezing rate, determines post thaw quality of rhesus macaque sperm. *Theriogenology*. 81:381-388.
- 63) 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.
- 64) Miró, J, Lobo, V, Quintero-Moreno, A, Medrano, A, Peña, A, Rigau, T (2005). Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. *Theriogenology*. 63:1706-1716.
- 65) Miller, LA, Johns, BE, Killian, GJ (2000). Immunocontraception of white-tailed deer with GnRH vaccine. *American Journal of Reproductive Immunology*. 44: 266-274.
- 66) Miyamoto A, Umezu M, Hamano K, Masaki J. (1987). Seasonal changes in inhibin activity in seminal plasma and serum concentrations of FSH, LH and testosterone in the male goat (*Capra hircus*). *Theriogenology*. 28:67-76.
- 67) Moses, DF, de las Heras, MA, Valcárcel, A, Pérez, L, Baldassere, H (1995). Use of computerized motility analyzer for the evaluation of frozen-thawed ram spermatozoa. *Andrologia*. 27: 25-29.
- 68) Nascimento, J, Raphael, CF, Andrade, AFC, Alonso, MA, Celeghini, ECC, Arruda, RP (2008). Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial

membranes of equine cryopreserved spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*. 28:351-358.

- 69) Navarro, C, Schober, P (2012). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of a sustained-release implant of deslorelin in companion animals. *Proceedings of the 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction Whistler, British Columbia, Canada July, 26-29*, pp: 177-178.
- 70) Nehring, H, Blottner, S, Knaack, J (1974). Addition of methyltestosterone to bull semen. 1. Effect on metabolism of spermatozoa. *Archiv fur Experimentelle Veterinarmedizin*. 28(5):769-774.
- 71) Noldus, LP, Trienes, RJ, Hendriksen, AH, Jansen, H, Jansen, RG (2000). The Observer Video-Pro: new software for the collection, management, and presentation of time-structured data from videotapes and digital media files. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*. 32(1):197-206.
- 72) Novotny, R, Vitasek, R, Bartoskova, A, Cizek, P, Novakova, K (2015). Azoospermia with variable testicular histology after 7 months of treatment with a deslorelin implant in toms *Theriogenology*. 83:1188-1193.
- 73) Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocrine Reviews* [Internet]. 2009 [cited: 2012, Nov 4]; 30(6): 713-43.
- 74) O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, McLachlan RI (2006). Endocrine regulation of spermatogenesis. En: Neill DJ (Ed). *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*. 3^a ed. Elsevier, p. 1017-1069.
- 75) Ortega C, Gonzalez L, Salazar C, Macias B, Rodriguez H, Tapia JA (2010). Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces "apoptosis like" changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 74:458-465.
- 76) Padula, AM (2005). GnRH analogues-agonists and antagonists. *Animal Reproduction Science*. 88:115-126.
- 77) Padmanabhan V, McNeilly, AS (2001). Is There an FSH-releasing factor? *Reproduction*. 121:21-30.
- 78) Pérez B, Sánchez R, Yenes P, García P (2001). Estudio de la evolución de poblaciones de espermatozoides de verraco según su respuesta al HOST corto y el estado del acrosoma durante la conservación a 15°C. 6th International Conference on Pig Reproduction. Missouri 06/03-06, EEUU, pp: 50.
- 79) Pineda, M. (1991) Reproducción del macho. En McDonald, LE. *Endocrinología y reproducción*. 4^a ed. México, Interamericana, p.253-293.

- 80) Purohit SB, Saxena D, Laloraya M, Kumar GP (2000). Altered molecular dynamics and antioxidant status in the spermatozoa in testosterone-induced oligospermia in mouse, *Molecular Reproduction and Development*. 55:316-325.
- 81) Quintero A, Rubio J, González D, Palomares R, Madrid N (2007). Efecto de la criopreservación sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática de espermatozoides de toros. XI Jornadas Nacionales de la Facultad experimental de Ciencias-LUZ. Maracaibo 12-15/10, Venezuela, pp:1-128.
- 82) Robertson, I. S., Wilson, J. C., & Fraser, H. M. (1979). Immunological castration in male cattle. *The Veterinary Record*, 105(24), 556-557.
- 83) Romagnoli, S (2006). Two Common Causes of Infertility in the Male Dog. *World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings* Disponible en: <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?id=3859257&pid=11223>
Fecha de consulta: 13 de noviembre de 2018.
- 84) Rosa HJD, Bryant MJ (2003). Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*. 48:155-171
- 85) Sakurai, H, Adams, BM, Adams, TE (1997). Concentration of gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in pituitary tissue of orchidectomized sheep: effect of passive immunization against gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Animal Science*. 75:189-194.
- 86) Salazar JL, Teague SR, Love CC, Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD (2011). Effect of cryopreservation protocol on post-thaw characteristics of stallion sperm. *Theriogenology*. 76:409-418.
- 87) Salamon S, Maxwell, WM (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62: 77-111.
- 88) Sáros 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.
- 89) Schanbacher BD, Lunstra DD (1976). Seasonal changes in sexual activity and serum levels of LH and testosterone in Finnish Landrace and Suffolk rams. *Journal of Animal Science*. 43:644-650.
- 90) Seideman SC, Cross HR, Oltjen RR, Schanbacher BD (1982). Utilization of the intact male for red meat production: A review. *Journal of Animal Science*. 55:826-840.

- 91) Shivaji S, Jagannadham M (1992). Steroid-induced perturbations of membranes and its relevance to sperm acrosome reaction, *Biochimica Biophysica Acta*. 1108: 99-109.
- 92) Sieme H, Troedsson MH, Weinrich S, Klug E (2004). Influence of exogenous GnRH on sexual behavior and frozen/thawed semen viability in stallions during the non-breeding season. *Theriogenology*. 61:159-171.
- 93) Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadehshirazi MR, Maltby M, Bateman K, Goodman RL, Tilbrook AJ, Ubuka T, Betnley GE, Clarke IJ, Lehman MN (2008). Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology*. 149:5770-5782.
- 94) Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogianni D, Giannakis D, Pardalidis N (2008). Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis, *The Journal Steroid Biochemistry Molecular Biology*. 109:323-330.
- 95) Tarlatzis B, Bili H (2004). Safety of agonists and antagonists. *Expert Opinion on Drug Safety*. 3(1):39-46.
- 96) Talwar GP (1985). Immunobiology of gonadotropin-releasing hormone. *The Journal Steroid Biochemistry*. 23:795-800.
- 97) Thompson DL (2000). Immunization against GnRH in male species (comparative aspects). *Animal Reproduction Science*. 60-61:459-469.
- 98) Tilbrook AJ, Galloway DB, Williams AH, Clarke IJ (1993). Treatment of young rams with an agonist of GnRH delays reproductive development. *Hormones and Behavior*. 27: 5-28.
- 99) Toledano-Díaz A, Santiago-Moreno J, Gómez-Brunet , Pulido-Pastor A, López-Sebastián A (2007). Horn growth related to testosterone secretion in two wild Mediterranean ruminant species: the Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) and European mouflon (*Ovis orientalis musimon*). *Animal Reproduction Science*. 102:300-307.
- 100) Trigg TE, Wright PJ, Armour AF, Williamson PE, Junaidi A, Martin GB, Doyle, A.G., Walsh, J. (2001). Use of a GnRH analogue implant to produce reversible, long term suppression of reproductive function of male and female domestic dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*. Suppl. 57:255-261.
- 101) Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa , Kikuchi, M, Ishii S, Sharp PJ (2000). A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropina

- release. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 275(2):661-667
- 102) Vanecek, J (1998). Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiological Reviews*. 78(3) 678-721.
- 103) Valiente C, Corrada Y, de la Sota P, Galassi P, Gobello C. (2007). Effect of the GnRH antagonist, acyline on canine testicular parameters. *Theriogenology*. 68:687-692.
- 104) Vickery BH, McRae GI (1980). Effects of continuous treatment of male baboons with super agonists of LHRH. *International Journal of Fertility*. 25(3):179-184.
- 105) Vickery BH, Mc Rae GI, Goodpasture JC, Sanders LM (1989). Use of potent LHRH analogues for chronic contraception and pregnancy termination. *Journal of Reproduction and Fertility*. 39: 175-187.
- 106) Watson PF (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60-61: 481-492.
- 107) Weckerman D, Harzmann R (2004). Hormone therapy in prostate cancer: LHRH antagonists versus LHEH analogues. *European Urology*. 46:279-284.
- 108) Wright PJ, Verstegen JP, Onclin K, Jöchle W, Armour AF, Martin GB, Trigg TE (2001). Suppression of the oestrous responses of bitches to the GnRH analogue deslorelin by progestin. *Journal of Reproduction and Fertility*. Suppl. 57:263-268.
- 109) Han X, Zhou Y, Zeng Y, Sui F, Liu Y, Tan Y, Cao X, Du X, Meng M, Zeng X (2017). Effects of active immunization against GnRH versus surgical castration on hypothalamic-pituitary function in boars. *Theriogenology*. 97:89-97.
- 110) Xue JL, Dial GD, Bartsh S, Kerkaert B, Squires EJ, Marsh WE, Ferre G. (1994). Influence of a gonadotropin-releasing hormone agonist on circulating concentrations of luteinizing hormone and testosterone and tissue concentrations of compounds associated with boar taint. *Journal of Animal Science*. 72:1290-1298.
- 111) Zamiri MJ, Khalili B, Jafaroghli M, Farshad A (2010). Seasonal variation in seminal parameters, testicular size, and plasma testosterone concentration in Iranian Moghani rams. *Small Ruminant Research*. 94:132-136.