

**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**USO DE GONADOTROFINA CORIÓNICA EQUINA (eCG) PARA MEJORAR LOS
PARÁMETROS SEMINALES, LA CRIORESISTENCIA Y LA CIRCUNFERENCIA
ESCROTAL DE CARNEROS DE DOS RAZAS DURANTE LA ESTACIÓN NO RE-
PRODUCTIVA**

Por

Alexsandra Soledad RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

María Belén VARELA CRUCES

**TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias.**

Orientado: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO

URUGUAY

2019

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Lic. Julia Giriboni

Segundo miembro (Tutor):

Msc. Florencia Beracochea

Tercer miembro:

Dr. Danilo Fila

Fecha:

Autores:

Alexsandra Soledad Rodríguez Martínez

María Belén Varela Cruces

AGRADECIMIENTOS

A nuestra tutora Florencia Beracochea y co-tutores, Jorgelina Manes y Rodolfo Ungersfeld por su orientación, buena disposición y paciencia a lo largo de esta trayectoria.

A nuestras compañeras María Jesús Frish, Mercedes Ferber y Lucía Fazzio por su ayuda, apoyo y por hacer de esta experiencia una aventura divertida.

A los funcionarios del INTA Balcarce, Sergio Dinino y Carlos Nieto por su colaboración y paciencia y a Matias Ojeda su orientación y ayuda durante el trabajo experimental.

A nuestras familias y amigos por darnos fuerza, motivación, comprensión y creer en nosotras durante este largo camino.

A la Facultad de Veterinaria UdelaR por darnos la oportunidad de formarnos como profesionales y como personas.

Y a todas aquellas personas que directa o indirectamente influyeron positivamente y contribuyeron en este importante proceso.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	9
1. INTRODUCCIÓN	11
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Estacionalidad reproductiva.....	13
2.2. Control endócrino estacional de la reproducción en el macho.....	14
2.3. Metodologías utilizadas para reducir la estacionalidad	16
2.4. Gonadotrofina coriónica equina	18
2.5. Origen y características de las razas Texel y Highlander.....	19
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	21
4.1. Objetivo general	21
4.2. Objetivos específicos	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1. Animales y su manejo	22
5.2. Evaluación testicular y colección seminal	22
5.3. Evaluación de semen fresco	23
5.4. Dilución de las muestras, congelación y descongelación de semen	24
5.5. Análisis estadístico	25
6. RESULTADOS	26
6.1. Circunferencia escrotal.....	26
6.2. Semen fresco.....	26
6.3. Semen descongelado.....	30
6.4. Tasa de crioresistencia	33

7. DISCUSIÓN	35
8. CONCLUSIONES	37
9. BIBLIOGRAFÍA	38

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. (a) volumen del eyaculado (b) concentración espermática y (c) porcentaje de espermatozoides móviles de carneros Texel y Highlander tratados con eCG y no tratados en función de los días de colección..... 27

Tabla 1. Características de semen fresco en carneros de dos razas tratados o no con eCG durante la estación no reproductiva. 28

Figura 2. Porcentaje de espermatozoides móviles en semen descongelado de carneros Texel y Highlander tratados con eCG y no tratados en función de los días de colección.. 31

Tabla 2. Características seminales de semen descongelado en carneros de dos razas tratados o no con eCG durante la estación no reproductiva..... 32

Tabla 3. Características seminales de tasa de crioresistencia en carneros de dos razas tratados o no con eCG durante la estación no reproductiva..... 34

RESUMEN

La utilización de gonadotropina coriónica equina (eCG), ha sido extensamente estudiada como herramienta en el manejo reproductivo, como por ejemplo en el uso para inducir el desarrollo folicular y la ovulación en hembras. Sin embargo, existe escasa información sobre el uso de dicha hormona para promover la actividad reproductiva en machos. El objetivo de este trabajo fue evaluar y comparar la circunferencia escrotal y las características seminales de carneros de la raza Texel (TEX) y Highlander (HL) como respuesta a la administración de eCG durante la estación no reproductiva. Se utilizaron 17 carneros adultos de la raza TEX y 15 HL de los cuales 9 y 8, respectivamente, fueron tratados con dos dosis de 1000 UI de eCG separadas por 5 días (GeCG), mientras que los restantes permanecieron sin tratamiento como grupo control (GCon). Se les midió circunferencia escrotal y se colectó semen mediante electroeyaculación 6 y 4 días previos a la primera administración de eCG y luego semanalmente durante 3 semanas. En cada muestra de semen fresco y descongelado se evaluaron los principales parámetros seminales. Además, se calculó la tasa de crioresistencia para los mismos. Los datos fueron comparados mediante ANOVA para mediciones repetidas considerando los efectos del tratamiento (GeCG o GCon), de la raza (HL o TEX), y la interacción entre tratamiento con eCG y la raza, y entre tratamiento con eCG y el día de colección. La administración de eCG no incrementó la circunferencia escrotal del grupo tratado, independientemente de la raza evaluada. En semen fresco la motilidad masal tendió a ser mayor en el GCon que en el GeCG ($p= 0,1$). En la motilidad masal y en la calidad espermática hubo una interacción entre el tratamiento y el tiempo de evaluación ($p= 0,01$ y $p= 0,02$, respectivamente), mayor en el GCon que en el GeCG en el día 7. En la interacción entre el tratamiento con eCG y las razas el porcentaje de espermatozoides móviles fue mayor en el grupo TEXCon que los HLCon ($p= 0,08$) y en motilidad progresiva tendió a ser mayor el grupo TEXCon que el HLCon ($p= 0,1$). Hubo una interacción entre el tratamiento con eCG y el tiempo de colección ($p < 0,0001$) en el porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra, siendo mayor en el GCon que en el GeCG en el día 2 ($p= 0,01$). En semen descongelado la integridad de membrana tendió a ser mayor en el GeCG que el GCon ($p= 0,1$). Hubo una interacción entre el tratamiento con

eCG y el tiempo en el porcentaje de espermatozoides móviles ($p= 0,0001$), tendiendo a ser mayor en el GeCG que en el GCon en el día 7. En la tasa de crioresistencia se observó una interacción entre el tratamiento y el tiempo en el porcentaje de espermatozoides móviles ($p= 0,0001$) y con motilidad progresiva ($p= 0,0008$). Ambas variables fueron mayores en el grupo tratado con eCG que en el grupo control en el día 7. En conclusión, la administración de eCG durante la estación no reproductiva no aumentó la circunferencia escrotal ni mejoró la calidad seminal de carneros TEX y HL. Tampoco existió una respuesta diferente a la eCG de acuerdo a la raza de los carneros testeados.

SUMMARY

The use of equine chorionic gonadotrophin (eCG) has been extensively studied as a tool in reproductive management, such as in the use to induce follicular development and ovulation in females. However, there is little information on the use of this hormone to promote reproductive activity in males. The aim of this study was to evaluate and compare the scrotal circumference and the seminal characteristics of Texel (TEX) and Highlander (HL) rams in response to the administration of eCG during the non-reproductive season. Seventeen adult rams of the TEX breed and fifteen HL were used, of which 9 and 8, respectively, were treated with two doses of 1000 IU of eCG separated by 5 days (GeCG), while the rest remained without treatment as a control group (GCon). Scrotal circumference was measured and semen was collected by electroejaculation 6 and 4 days prior to the first administration of eCG and then weekly for 3 weeks. The main seminal parameters were evaluated in each fresh and thawed semen sample. In addition, the rate of cryoresistance was calculated for them. Data were compared using ANOVA for repeated measurements considering the effects of treatment (GeCG or GCon), breed (HL or TEX), and the interaction between treatment with eCG and breed, and between treatment with eCG and the day of collection. The administration of eCG did not increase the scrotal circumference of the control group or the treated group, regardless of the breed evaluated. In fresh semen, mass motility tended to be greater in the GCon than in the GeCG ($p= 0.1$). In mass motility and sperm quality there was an interaction between treatment and evaluation time ($p= 0.01$ and $p= 0.02$, respectively), greater in the GCon than in the GeCG on day 7. In the interaction between the treatment and the breeds, the percentage of mobile sperm was higher in the TEXCon group than the HLCon ($p= 0.08$) and in progressive motility it tended to be higher in the TEXCon group than in the HLCon ($p= 0.1$). There was an interaction between the treatment with eCG and the collection time ($p < 0,0001$) in the percentage of sperm with an integral membrane, being greater in the GCon than in the GeCG on day 2 ($p= 0.01$). In thawed semen, membrane integrity tended to be higher in the GeCG than the GCon ($p= 0.1$). There was an interaction between the treatment with eCG and the time in the percentage of motile sperm ($p= 0.0001$), tending to be greater in the GeCG than in the GCon on day 7. An interaction between treatment and time in the percentage of motile sperm

($p= 0.0001$) and with progressive motility ($p= 0.0008$) was observed in the cryoresistance rate. Both variables were higher in the group treated with eCG than in the control group on day 7. In conclusion, the administration of eCG during the non-reproductive season did not increase the scrotal circumference or improve the seminal quality of TEX and HL rams. Nor was there a different response to the eCG according to the breed of rams tested.

1. INTRODUCCIÓN

Está ampliamente reportado que diversas especies de mamíferos presentan estacionalidad reproductiva (*equinos, ovinos y hamsters*: ver revisión Gerlach y Aurich, 2000; *ovinos*: Ungerfeld, 2016), que es una adaptación fisiológica de los animales desarrollada para favorecer la supervivencia de las crías (ver revisión: Santiago-Moreno y col., 2006). El principal factor responsable de la reproducción estacional es el fotoperíodo (Ortavant, 1964), en el que los animales responden a los cambios de horas luz liberando melatonina (Ptszynska, 2007).

Los carneros son estacionales de día corto (Bustos y Torres-Díaz, 2012) lo que significa que su actividad reproductiva es estimulada al disminuir las horas de luz, incrementándose los niveles séricos de melatonina (ver revisión: Wood y Loudon, 2018), que estimula la liberación de GnRH a nivel del hipotálamo (ver revisión: Yu y col., 2018) y ésta, a su vez, desencadena la liberación de hormonas hipofisarias, como la hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH) (Bustos y Torres-Díaz, 2012) responsables de la funcionalidad testicular (Lincoln y col., 1990), la espermatogénesis (ver revisión: Yu y col., 2018) e indirectamente, del comportamiento sexual (Alexander, 2018).

Existen reportes de trabajos realizadas para manipular la estacionalidad reproductiva en pequeños rumiantes con el fin de aumentar la rentabilidad de explotaciones ganaderas (Abecia y col., 2012). En carneros, se han utilizado diversas metodologías como la manipulación artificial del fotoperíodo (Palacín y col., 2018) y la administración de hormonas, entre ellas la melatonina (Chemineau y col., 1992), y agonistas GnRH (Lincoln y col., 1986). Sin embargo, dado que la manipulación artificial del fotoperíodo y los implantes de melatonina son metodologías costosas y de respuesta retardada, su uso potencial en sistemas extensivos de pastoreo es muy limitado. A raíz de ello, otra metodología que podría ser utilizada para contrarrestar la estacionalidad reproductiva es la administración de gonadotrofina coriónica equina (eCG).

Si bien la administración de eCG ha sido ampliamente estudiada para inducir el desarrollo folicular y la ovulación en hembras (ver revisión: Murphy, 2012), el

uso de esta hormona para promover la actividad reproductiva en machos es muy escasa. En este sentido, se ha demostrado que la administración de eCG estimula la secreción de testosterona (Hochereau-De Reviere y col., 1990; Price y col., 1991; Ungerfeld y col., 2018). Dicho aumento de testosterona se asoció con una mayor exhibición de comportamientos sexuales (Ungerfeld y col., 2018). A su vez, la administración de eCG a chivos no sólo permitió aumentar la concentración de testosterona, sino que también mejoró la calidad seminal de los machos durante la estación no reproductiva (Beracochea y col., 2018). Si bien estos resultados son alentadores, aún resta evaluar si la administración de eCG mejora las características seminales en carneros durante la estación no reproductiva. Además, dado que la duración de la estacionalidad reproductiva dentro de una misma especie puede estar influenciada por el origen de las razas y su genética (Arellano-Lezama y col., 2017), se determinará si la administración de eCG influye de forma diferencial en carneros de dos razas con diferente origen como lo son la raza Texel y la raza Highlander.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estacionalidad reproductiva

Muchas especies de mamíferos, entre ellos los ovinos, presentan estacionalidad reproductiva (Ungerfeld, 2016). Esto implica que las hembras que habitan zonas de clima templado sólo ciclan durante un período determinado del año (mediados de verano y otoño), caracterizado por la manifestación de ciclos estrales regulares, conducta de estro y ovulación, permaneciendo en anestro el resto del año (invierno-primavera) (de Lucas Tron y col., 1997; Arroyo, 2011). Los machos modulan su actividad reproductiva de manera sincronizada con las hembras (Ungerfeld, 2016), reduciendo su actividad sexual durante aproximadamente seis meses a partir de mediados del invierno, primavera e inicios de verano (ver revisión: Dardente y col., 2016). La estacionalidad reproductiva es una adaptación fisiológica desarrollada por los animales para que las variaciones estacionales de temperatura y disponibilidad de alimento les afecten con la menor intensidad posible, favoreciendo la supervivencia de las crías (Hafez, 1952; Ortavant y col., 1988; ver revisión: Santiago-Moreno y col., 2006), y minimizando el costo energético utilizado en la reproducción (Goeritz y col., 2003). Si bien, en los ovinos el fotoperiodo es el principal factor responsable de la reproducción estacional, otras señales del entorno como la temperatura, la nutrición, y las relaciones sociales pueden modular su efecto (Martin y col., 2002; ver revisión: Urviola-García y col., 2017). En zonas de clima templado, los partos de los ovinos se concentran en la primavera, coincidiendo este evento con las mejores condiciones climáticas y disponibilidad de alimento (Lincoln y Short, 1980; Forsberg, 2002; ver revisión: Santiago-Moreno y col., 2006).

Los carneros presentan variaciones estacionales en la concentración de diferentes hormonas, como la LH, la FSH y la testosterona, así como en la calidad seminal y la fertilidad (Kulaksiz y col., 2019). Como consecuencia de esto, a lo largo del año se modifica el tamaño testicular y el comportamiento sexual, presentando valores máximos durante la estación reproductiva (Lincoln y Davidson, 1977; Avdi y col., 2004). Las razas ovinas que habitan las zonas templadas presentan mejor cali-

dad seminal, mayor peso testicular y despliegan mayor cantidad de comportamientos sexuales a partir de mediados de verano hasta finales de otoño que durante el resto del año (Ortavant y col., 1988). A su vez, el factor genético y el origen de la raza impactan de manera diferencial en la duración de la estacionalidad reproductiva (Arellano-Lezama y col., 2017). Existen diferencias raciales en la duración de la época reproductiva, incluso en latitudes similares (Islam y Land, 1977). De este modo, los ovinos de carne de raza Suffolk o Texel, presentan una estacionalidad mucho más marcada que otras razas como la Merino o las razas de pelo, que son menos estacionales (Arellano-Lezama y col., 2017).

2.2. Control endócrino estacional de la reproducción en el macho

El eje hipotálamo-hipofisario-gonadal representa la conexión entre el sistema nervioso y el endócrino, regulado por la GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) (Somoza, 2002). Esta hormona es conocida por su rol en la reproducción de los vertebrados (Fernald y Whitte, 1999). La GnRH es una hormona de naturaleza peptídica, sintetizada en el hipotálamo y liberada por vasos porta-hipofisarios que la transportan hacia la hipófisis donde estimula la secreción de LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona folículo estimulante) hacia la circulación general (Somoza, 2002).

La secreción de LH y FSH en los carneros puede modificarse por cambios estacionales, principalmente a consecuencia de variaciones en el fotoperiodo (Tilbrook y Clarke, 2001). Los ovinos detectan los cambios en el fotoperiodo diario, y lo traducen a través de la secreción circadiana de la hormona melatonina a partir de la glándula pineal, lo que modifica la fisiología del animal de acuerdo a las variaciones de las horas luz/oscuridad (ver revisión: Santiago-Moreno y col., 2006). La concentración fisiológica de melatonina es muy baja durante el día y elevada durante la noche (ver revisión: Wood y Loudon, 2017). El control fisiológico del fotoperíodo depende básicamente de tres componentes fundamentales, que son en primer lugar un foto-

receptor (los ojos, en los mamíferos) que detecta la luz y un reloj que distinga los días largos de los cortos (reloj circadiano localizado en el núcleo supraquiasmático), en segundo lugar necesita una ruta neural que enlace dicho reloj al sistema neuroendócrino, y por último el sistema endócrino que involucra la secreción de gonadotropinas hipofisarias, y el desarrollo gonadal (Li y Zhou, 2015; ver revisión: Dardente y col., 2016). La respuesta primaria a la disminución de la duración del día es un incremento en la secreción de LH y FSH por la hipófisis, desencadenados por una descarga coordinada de GnRH procedente del hipotálamo (Bustos y Torres-Díaz, 2012) estimulado por el aumento de Melatonina (ver revisión: Yu y col., 2018). En el carnero la FSH y la LH son requeridas para una correcta funcionalidad testicular (Lincoln y col., 1990), regulando la producción de gametos y de hormonas testiculares (Bielli, 2002; ver revisión: Yu y col., 2018). Existen dos tipos principales de células responsables de la producción de hormonas dentro del testículo: las células de Sértoli y las células de Leydig. Estas últimas son las encargadas de la síntesis de testosterona (Bielli, 2002) y su actividad secretora es controlada por la LH (Lincoln y col., 1990; Bustos y Torres-Díaz, 2012). Se necesitan altas concentraciones de testosterona en el túbulo seminífero para que transcurra correctamente el proceso de diferenciación y maduración de los gametos masculinos, la espermatogénesis (Bielli, 2002), además, la testosterona es necesaria para el comportamiento sexual normal, la función testicular (Alexander, 2018; ver revisión: Yu y col., 2018;) y el desarrollo muscular del carnero (Bustos y Torres-Díaz, 2012). Las células de Sértoli son el blanco de la FSH, que controla la actividad funcional de dichas células (Lincoln y col., 1990) y de la testosterona (Bielli, 2002). La FSH, al estimular la división y maduración de las espermatogonias es determinante en la producción diaria de espermatozoides normales (Bielli, 2002; Bustos y Torres-Díaz, 2012). Durante la estación reproductiva se presentan las mayores concentraciones plasmáticas de FSH y esto está muy correlacionado con el momento de máximo tamaño testicular (Lincoln y col., 1990; Bustos y Torres-Díaz, 2012).

2.3. Metodologías utilizadas para reducir la estacionalidad

La estacionalidad reproductiva limita los períodos del año en que los ovinos pueden parir, lo que causa un patrón estacional en los precios de mercado (ver revisión: Dardente y col., 2016), siendo más bajos cuando la producción de carne/leche son mayores (fin de primavera, principios de verano) y viceversa (Abecia y col., 2012). Se han desarrollado métodos naturales y artificiales con el objetivo de reducir los períodos de menor actividad reproductiva y mejorar los índices productivos (Abecia y col., 2012), así como para sincronizar los nacimientos en un corto período de tiempo (ver revisión: Dardente y col., 2016). Algunos de estos métodos involucran la administración exógena de hormonas que modifican la cadena de eventos fisiológicos involucrados en el ciclo sexual, mientras que otros no involucran hormonas, sólo “métodos naturales” como la manipulación artificial del fotoperiodo o el efecto estimulador de la presencia del macho sobre la hembra expuesta (Abecia y col., 2012; ver revisión: Dardente y col., 2016). La actividad sexual durante la estación no reproductiva puede ser estimulada con la administración de agonistas de GnRH (Lincoln y col., 1986), incrementando la concentración de testosterona y la calidad seminal (Giriboni y col., 2019). El efecto farmacológico conlleva a una hiperestimulación en la secreción de FSH y LH. Sin embargo, la misma es solo al inicio del tratamiento (Giriboni y col., 2019), pues luego de transcurridos 10 días con administraciones diarias ocurre una reducción significativa en las concentraciones plasmática de FSH, LH y testosterona, siendo las mismas suprimidas al día 21 del inicio del tratamiento (Lincoln y col., 1986). Este efecto podría deberse a que la exposición continua a agonistas de GnRH induce una desensibilización de las células gonadotrofas en la glándula pineal, pudiendo llevar a una involución de los testículos y de las glándulas accesorias en el macho (Lincoln y col., 1986). Lo que se traduce en un método poco eficiente para contrarrestar los efectos de la estacionalidad reproductiva de los machos.

Otra metodología utilizada para estimular la actividad reproductiva es la manipulación artificial del fotoperiodo (Chemineau y col., 1992; ver revisión: Delgadillo y col., 2004) o mediante el uso de implantes de melatonina (Chemineau y col., 1992).

Tratamientos en carneros durante la primavera, que involucraron una manipulación del fotoperíodo, seguidos por la colocación de implantes de melatonina permitió a éstos reactivar la actividad sexual de las hembras que fueron expuestas a los carneros tratados (Abecia y col., 2007). El desarrollo reproductivo de los carneros fue rápidamente estimulado al ser estos sometidos a 8 h de luz y 16 h de oscuridad (simulando días cortos), con importantes aumentos no solo en la concentración sérica de FSH, LH y testosterona, sino también del tamaño testicular (Lincoln y Peet, 1977). La exposición de carneros y chivos a alteraciones continuas de 1-2 meses de días largos (16 h luz), alternados con 1-2 meses de días cortos (8 h luz), provoca aumentos de libido y producción de semen de buena calidad durante todo el año (ver revisión: Dardente y col., 2016). Abecia y col., (2019) demostraron que la exposición de hembras en anestro estacional frente a carneros fotoestimulados, les permitió a éstas mantener altas concentraciones de LH en plasma fuera de la estación reproductiva, similares a las observadas durante la estación reproductiva. La colocación de implantes de melatonina provoca cambios en la respuesta al fotoperíodo y el patrón de reproducción anual (Abecia y col., 2012). Estos efectos se traducen en modificaciones en la reproducción, el peso corporal, y cambios endócrinos similares a los inducidos por la exposición a días cortos. En este sentido, la utilización de implantes de melatonina ha permitido estimular la liberación de LH y FSH, que a su vez estimula la actividad espermatogénica y androgénica de los testículos (Lincoln y Maeda, 1992), así como también activa e incrementa la actividad secretora de las glándulas seminales (Mokhtar y col., 2016). Asimismo, se han observado mejoras en la motilidad espermática luego de 45-60 días de haber comenzado el tratamiento (Casaoy col., 2010). La administración constante de melatonina parece provocar un efecto refractario a dicha hormona (Lincoln y col., 1985). Por otra parte, dado que la manipulación artificial del fotoperíodo y los implantes de melatonina son metodologías costosas y de respuesta retardada, su uso potencial en sistemas extensivos de pastoreo es muy limitado. En función de ello, otra metodología que podría ser utilizada para contrarrestar la estacionalidad reproductiva es la administración de gonadotrofina coriónica equina (eCG).

2.4. *Gonadotropina coriónica equina*

La eCG es una hormona glucoproteica secretada por las copas endometriales de la yegua entre los días 55 y 130 de gestación (Murphy y Martinuk, 1991). Está formada por dos cadenas α y β unidas mediante enlaces no covalentes y su estructura es semejante a la de la LH, FSH, y a la TSH. La subunidad α tiene una secuencia de aminoácidos que posee entre un 70% y 90% de semejanza con las cadenas α de la FSH de otras especies (Pierce y Parsons, 1981). La subunidad β es la encargada de la actividad hormonal específica (ver revisión: Murphy, 2012) y su estructura primaria es igual a la de la LH β equina, ambas codificadas por un mismo gen con diferente grado de glicosilación. La eCG presenta una larga vida media en sangre, de aproximadamente 6 días en yeguas (Martinuk y col., 1991). Esta persistencia en la circulación está dada por su alto contenido de ácido siálico (Christakos y Bahl, 1979; Martinuk y col., 1991). La eCG ha sido utilizada en múltiples trabajos experimentales por su actividad biológica similar a la FSH y a la LH en diversas especies (ver revisión: Murphy, 2012). Si bien la base biológica de este fenómeno permanece incompleta, la explicación intuitiva es que la actividad dual debe basarse en el determinante estructural de la eCG o de los receptores de LH y FSH en especies no equinas (ver revisión: Murphy, 2012).

El uso de la eCG está ampliamente estudiado en hembras y ha sido utilizado para adelantar la pubertad, acortar el anestro estacional así como para la superovulación y sincronización de celos (ver revisión: Murphy, 2012). Sin embargo, es escasa la información disponible sobre los efectos de su aplicación para mejorar la actividad reproductiva en machos. En este sentido, se ha demostrado que la administración 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 y col., 1998). Además, se ha demostrado que la administración de dicha hormona induce la secreción de testosterona y la actividad de las células de Sertoli en perros con baja motilidad espermática (Kawakami y col., 2000) y permitió producir espermatozoides en forma transitoria en un venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) azoospermico (Ungerfeld, 2013). Courot y col. (1979) de-

mostraron que la administración de eCG a carneros hipofisectomizados permitió mantener concentraciones séricas de testosterona normales en los túbulos seminíferos, estimulando la espermatogénesis. Sumado a esto, se ha demostrado que la administración de altas dosis de eCG estimula la secreción de testosterona tanto en carneros prepuberales como adultos (Hochereau-De Reviere y col., 1990; Ungerfeld y col., 2014, 2018), pero no logró un efecto positivo sobre el desarrollo reproductivo en corderos prepuberales (Ungerfeld y Bielli, 2008). Por otro lado, la administración repetida de dosis secuenciales en chivos no sólo permitió aumentar la concentración de testosterona sino que también mejoró la calidad seminal de los machos durante la estación no reproductiva (Beracochea y col., 2018). No obstante, no existe información sobre las repercusiones que tiene o podría tener la administración de eCG en las características testiculares y seminales de carneros fuera de la estación reproductiva.

2.5. Origen y características de las razas Texel y Highlander

Es posible que el origen y por lo tanto el patrón estacional de las diferentes razas afecte la respuesta a la administración de eCG. Por eso en la presente tesis se utilizaron carneros de dos razas con orígenes diferentes, Texel y Highlander. La raza Texel, se originó a fines del siglo XIX en la isla Texel al norte de Holanda. Dicha raza fue creada a partir del cruzamiento entre la raza Old Texel con Lincoln y Leicester Longwool. Es utilizada como línea paterna en cruzamientos, siendo una raza de doble propósito, productora de lana y destacada por su importante rendimiento cárnico (Gonzales, 2017). Esta raza presenta una marcada estacionalidad reproductiva (Arellano- Lezama y col., 2017), es decir, una estación reproductiva de corta duración. Colas y col. (1986) demostraron que el crecimiento testicular de los carneros TEX comienza en verano, durante los días largos y que existen grandes variaciones en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales ubicándose los valores mínimos en primavera y los más altos en otoño.

Por otro lado, la raza Highlander se originó en el año 2000 en Nueva Zelanda a partir de la cruce entre las razas Finnish Landrace (50%), Romney Marsh (25%) y

Texel (25%). Dicha raza se caracteriza por su prolificidad, supervivencia, precocidad, longevidad, alta tasa de crecimiento de los corderos, y buena conformación y aptitud carnicera (Frileck S.A. Highlander, 2018, Highlander, raza ovina de carne, Uruguay, 2013). No se encontraron reportes sobre la duración de su estacionalidad reproductiva, pero teniendo en cuenta el origen de la raza, basado en sus cruces, y conociéndose que la raza Finnish Landrace presenta una estacionalidad reproductiva extendida (Quirkey col., 1985) de aproximadamente 5 meses (Arellano-Lezama y col., 2017) se podría esperar que fuera una raza de estación reproductiva más amplia que la raza Texel.

3. HIPÓTESIS

La administración de eCG a carneros incrementa la circunferencia escrotal y mejora las características del semen fresco y descongelado durante la estación no reproductiva, siendo más notorios los cambios en carneros de la raza Highlander que en los Texel.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar y comparar las características seminales y la circunferencia escrotal de carneros Texel y Highlander como respuesta a la administración de eCG durante la estación no reproductiva.

4.2. Objetivos específicos

Determinar si la administración de dos dosis de eCG en carneros Texel y Highlander durante la estación no reproductiva, incrementa y produce una respuesta diferente de acuerdo a la raza, en la circunferencia escrotal y las siguientes características de semen fresco y descongelado:

- el volumen del eyaculado
- la concentración espermática
- la motilidad masal
- la calidad de la motilidad
- el porcentaje de espermatozoides móviles
- el porcentaje de espermatozoides con la motilidad progresiva
- y el porcentaje de espermatozoides con su membrana íntegra y funcional

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Animales y su manejo

El experimento se realizó en el campo experimental “Reserva 8” de producción ovina perteneciente a la Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), en Balcarce, Argentina (37° 45' S; 53° 18' O). Los animales utilizados en esta tesis fueron manejados bajo estricto cumplimiento de las prácticas de bienestar animal aplicadas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (Dictamen 093/2016, CICUAE INTA CeRBAS). Se utilizaron 17 carneros adultos de la raza Texel (TEX; peso en kg \pm EE: 73,1 \pm 6,1 kg) y 15 Highlander (HL; peso en kg \pm EE: 70,9 \pm 7,0 kg), de los cuales 9 TEX y 8 HL fueron tratados con eCG (TEXeCG, HLeCG). En base al protocolo utilizado por Ungerfeld (2018) a los animales tratados se les administró 1000 UI de eCG (Novormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) en el Día 0 y 5, y el resto de los machos permanecieron sin tratamiento como grupo control (TEXCon, HLCon). Los animales se alimentaron con pastura de raygrass perenne (*Lolium perenne*), festuca (*Festuca arundinacea*) y trébol blanco (*Trifolium repens*) y tuvieron libre acceso al agua.

5.2. Evaluación testicular y colección seminal

La circunferencia escrotal se midió con escrotímetro y se colectó semen mediante electroeyaculación. Los muestreos se realizaron 6 y 4 días antes de la primera administración de eCG y luego semanalmente durante tres semanas. La electroeyaculación se realizó con una sonda rectal de 22 cm de longitud y 2,5 cm de diámetro con tres electrodos lineales (Electrojac V, Ideal instruments; Neogen Company, Lansing MI, EEUU). El electroeyaculador se utilizó en modo automático, aplicando estímulos de 2 s, con intervalos de descanso de 2 s entre cada estímulo.

5.3. *Evaluación de semen fresco*

Luego de coleccionar la muestra seminal y durante todo el proceso de evaluación de semen fresco, las muestras se mantuvieron en un baño maría a 37 °C. Las evaluaciones microscópicas se realizaron mediante un microscopio óptico binocular (Nikon Diaphot, Japón) con platina térmica (Eporvac, Saladillo, Buenos Aires). Se midió el volumen del eyaculado con micropipeta (Gilson, Valle del Oise, Francia) y se determinó la concentración espermática mediante espectrofotómetro (Accuread, IMV Technologies, L'Aigle, Francia).

La evaluación de la motilidad en masa se realizó colocando una gota de 10 µL sobre un porta-objetos atemperado y se observó en microscopio a 4x, considerando la concentración y la onda de movimiento del semen en una escala de 0-5 (5 cuando se observaron ondas de movimiento muy rápidas y densas en donde el 90 % de los espermatozoides son activos, y 0 cuando ningún espermatozoide presentaba movimiento) (Evans y Maxwell, 1990). A continuación, se extrajeron 10 µL de la muestra de semen y se diluyó en 1mL de PBS para evaluar la calidad de la motilidad a 40x. Se utilizó una escala de 0-5, donde 5 representa espermatozoides con movimiento rápido lineal y progresivo y 0 espermatozoides sin movimiento (Fernández y col., 2013). El porcentaje de espermatozoides móviles, y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva se evaluaron visualizando un mínimo de 5 campos y estimando en cada uno el porcentaje de espermatozoides móviles y con motilidad lineal progresiva. Además, se evaluó la funcionalidad de la membrana espermática mediante el test de endósmosis (Jeyendran y col., 1984), colocando 10 µL de la muestra de semen en 150 µL de una solución hipoosmótica (100 mOsm) e incubándola a baño maría a 37°C durante 30 min. Luego, se extrajeron 10 µL que se fijaron en 90 µL de formol hasta su posterior evaluación. Para su determinación, se colocó una gota (5 µL) entre porta-objeto y cubre-objetos y microscópicamente (40x) se observó el porcentaje de células positivas al test (espermatozoides con flagelo enrollado) contando un máximo de 200 células espermáticas en un mínimo de cinco campos al azar. Se consideraron negativos los casos en que el flagelo se mostró recto o en forma de látigo (Jeyendran y col., 1984; Ducci y col., 2002). Para la evaluación de

la integridad de membrana se realizaron frotis con eosina-nigrosina (E-N) (Campbell y col., 1956). Se colocaron 5 μ L de colorante y 5 μ L de la muestra de semen en un porta-objeto. Luego de homogeneizar el colorante con la muestra, se realizaron los extendidos y se les colocó un cubre-objeto. Los frotis fueron evaluados el mismo día de realizados mediante microscopio óptico a 40x, determinando el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos. La alta facilidad con la que penetra la coloración en los espermatozoides muertos por la E-N es atribuido a un incremento de la permeabilidad de la membrana celular al momento de la muerte (Bamba, 1988), por lo que los espermatozoides teñidos o parcialmente teñidos de color violeta son considerados dañados y no viables (Campbell y col., 1956; Brito y col., 2003) y los de color blanco son considerados como espermatozoides vivos.

5.4. Dilución de las muestras, congelación y descongelación de semen

En base a los datos de volumen y concentración espermática previamente determinados, se calculó el volumen de diluyente a adicionar para almacenar 100 millones de espermatozoides/pajuela en pajuelas de 0,5 mL. Se utilizó un diluyente en base a Tris, con ácido cítrico, glucosa, glicerol (7 %) y yema de huevo (10 % v/v), el cual fue adicionado dejándolo correr lentamente por la pared del tubo, en forma fraccionada permitiendo que se equilibre la primera fracción durante 15 min y luego se completó hasta llegar al volumen final.

Las pajuelas fueron rotuladas con fecha y con el número de carnero correspondiente, y luego de adicionarles la muestra fueron selladas con alcohol polivinílico. Inmediatamente, se procedió con el descenso térmico a una tasa de 0,17°C por minuto (aproximadamente 3 h). A continuación, se llevó a cabo la congelación de las pajuelas, para la cual se utilizó una caja de poliuretano, conteniendo un rack y nitrógeno líquido (NL2). Se colocaron las pajuelas en el rack tapando la caja y dejándolas en vapores de nitrógeno (-80 °C) durante 10 min. Transcurrido dicho tiempo se las dejó caer en NL2, y fueron almacenadas en el tanque de NL2, dentro de goblets ro-

tulados, colocados en cañas de aluminio, hasta su posterior evaluación posdescongelación.

Transcurridas dos semanas de la congelación espermática, las muestras fueron descongeladas. Para ello, se extrajeron los goblets conteniendo las pajuelas a evaluar del tanque de NL2, manteniéndolas a temperatura ambiente durante 10 s e inmediatamente fueron colocadas en baño maría a 37 °C durante 30 s. Posteriormente, se secaron las pajuelas y el contenido de las mismas se vació en un eppendorf atemperado (37 °C) y se evaluó calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides móviles y con motilidad progresiva, así como el porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra y funcional.

La respuesta a la criopreservación fue calculada para cada variable espermática como la tasa de crioresistencia (TC) (Esteso y col., 2006) de la siguiente manera:

$$TC = (\text{valor luego de la descongelación} / \text{valor antes de la congelación}) \times 100$$

5.5. Análisis estadístico

Los datos fueron comparados mediante ANOVA para mediciones repetidas considerando los efectos del tratamiento (grupo tratado eCG o control), de la raza (TEX o HL), y la interacción entre tratamiento y la raza, y entre el tratamiento y el día de colección. Los datos colectados previo a la administración de eCG (días -6 y -4) fueron promediados para realizar el análisis y se representan como AeCG. Los datos se presentaron como media de mínimos cuadrados \pm EE.

6. RESULTADOS

6.1. Circunferencia escrotal

La administración de eCG no incrementó la circunferencia escrotal del grupo tratado con eCG ni la del grupo no tratado ($30,1 \pm 0,3$ cm vs $30,1 \pm 0,3$ cm, respectivamente) independientemente de las razas evaluadas ($29,9 \pm 0,3$ cm vs $30,3 \pm 0,3$ cm, raza HL y TEX respectivamente). La circunferencia escrotal presentó una tendencia a la interacción entre el tratamiento y el tiempo de evaluación ($p= 0,07$), sin interacción entre tratamiento y raza.

6.2. Semen fresco

La motilidad masal tendió a ser mayor en el grupo control que en el tratado con eCG (Tabla 1). El resto de las variables evaluadas no presentaron diferencias entre grupo tratado con eCG y control (Tabla 1). El volumen seminal fue mayor en los carneros de la raza HL que en los TEX (Tabla 1). El porcentaje de espermatozoides con membrana funcional fue mayor en los carneros de la raza TEX que en los HL (Tabla 1). El resto de las variables evaluadas no presentaron diferencias entre las razas (Tabla 1).

Si bien se observó una interacción significativa entre el tratamiento y el tiempo en el volumen seminal ($p= 0,001$) y en la concentración espermática ($p= 0,003$), no existieron diferencias significativas entre los puntos de evaluación en ambas variables (Figura 1a y 1b). El volumen y la concentración espermática no presentaron diferencias en la interacción entre el tratamiento con eCG y la raza ($p= 0,7$ y $p= 0,3$; respectivamente).

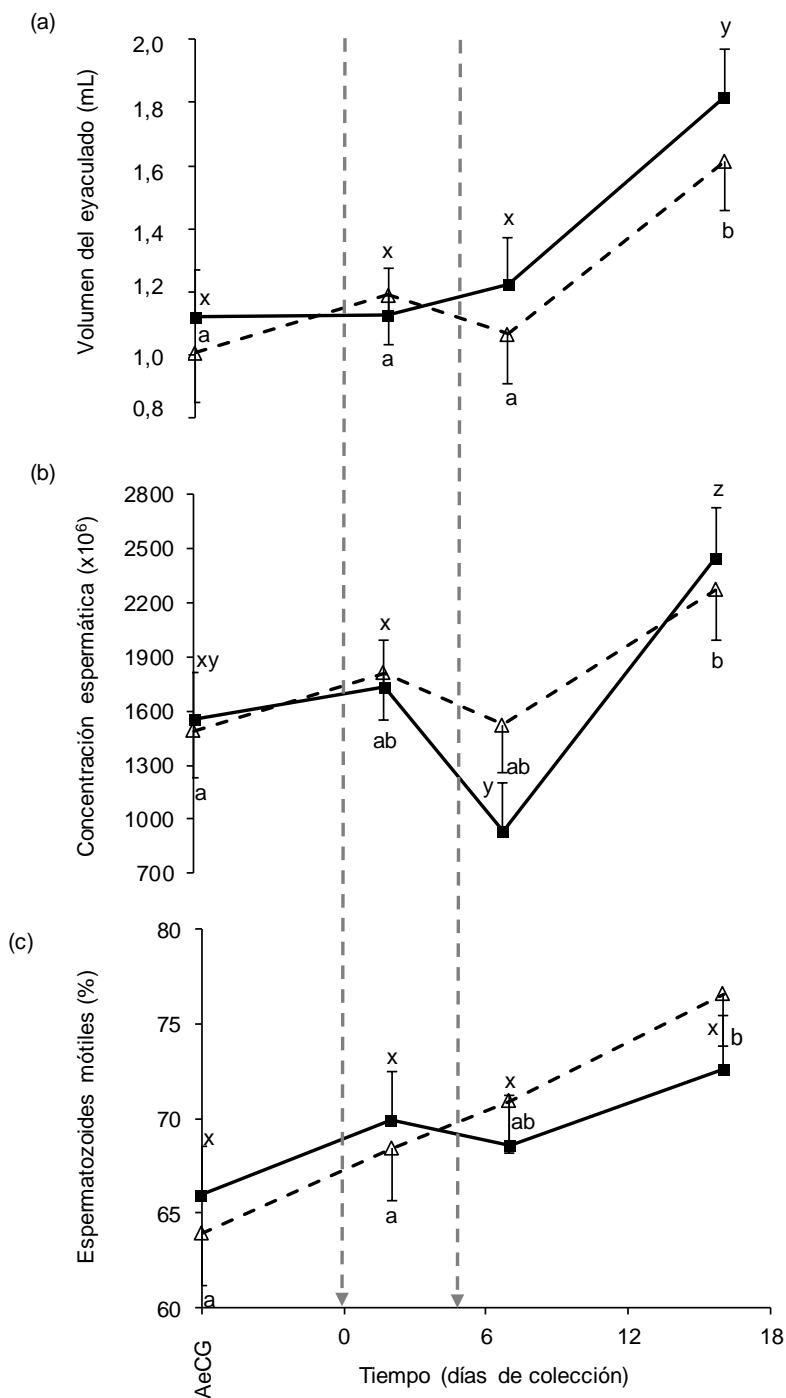


Figura 1(a). Volumen del eyaculado (b) concentración espermática y (c) porcentaje de espermatozoides móviles de carneros Texel y Highlander tratados con eCG (■-) y no tratados (-Δ-) en función de los días de colección. Las muestras fueron colectadas durante la estación no reproductiva. Las flechas punteadas indican los momentos en que se administró la eCG (1000 UI administrada el día 0 y 5) y AeCG representa la media de los datos colectados antes de administrar la eCG. Diferentes letras indican diferencias grupo por tiempo. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados \pm EE.

Tabla 1. Características de semen fresco (media \pm EE) en carneros de dos razas (Texel y Highlander) tratados o no con 2 dosis de 1000 UI de eCG durante la estación no reproductiva.

Características seminales	GCon	GeCG	p*	HL	TEX	p**
Volumen (mL)	1,2 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	ns	1,4 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	0,01
Concentración ($\times 10^6$ esp/mL)	1774,4 \pm 142	1668,7 \pm 136	ns	1807,9 \pm 143	1634,2 \pm 134	ns
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
Calidad de la motilidad (0-5)	3,3 \pm 0,1	3,1 \pm 0,1	ns	3,1 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1	ns
Espermatozoides móviles (%)	69,9 \pm 1,5	69,3 \pm 1,4	ns	68,5 \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 1,6	67,3 \pm 1,4	ns
Espermatozoides con membrana funcional (%)	69,9 \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 1,8	ns

Nota: p*: p- valor entre tratamientos; p**: p-valor entre razas; GCon: grupo control; GeCG: grupo tratado con eCG

En la motilidad masal y en la calidad espermática hubo una interacción entre el tratamiento con eCG y el tiempo ($p= 0,01$ y $p= 0,02$; respectivamente): en el día 7 de colección ambas variables fueron mayores en el grupo control que en el grupo tratado con eCG (motilidad masal: $2,3 \pm 0,3$ vs $1,5 \pm 0,2$; respectivamente; $p= 0,03$ y calidad espermática: $3,4 \pm 0,2$ vs $2,6 \pm 0,2$, respectivamente; $p= 0,003$). Sin embargo, la motilidad masal no presentó diferencias significativas en la interacción entre tratamiento con eCG y las razas. La calidad espermática tendió a ser mayor en el grupo TEXeCG que en el TEXCon ($3,4 \pm 0,1$ vs $2,9 \pm 0,1$; respectivamente; $p= 0,09$).

El porcentaje de espermatozoides móviles presentó diferencias significativas en la interacción entre tratamiento con eCG y el tiempo de colección ($p=0,04$), sin embargo, no existieron diferencias significativas entre los puntos de evaluación (Figura 1c). Existió una tendencia en la interacción entre el tratamiento con eCG y las razas, tendiendo a ser mayor en el grupo TEXCon que en los HLCon ($72,8 \pm 2,03$ % vs $67,1 \pm 2,1$ %, respectivamente; $p= 0,08$).

En lo que respecta al porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva se observó diferencias significativas en la interacción entre el tratamiento con eCG y las razas ($p= 0,04$), tendiendo a ser mayor en el grupo TEXCon que en el HLCon ($69,8 \pm 2,1$ % vs $64,1 \pm 2,1$ %, respectivamente; $p= 0,06$). Sin embargo, no hubo diferencias en la interacción entre tratamiento con eCG y el tiempo ($p= 0,1$).

En el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional no se observaron diferencias en la interacción entre el tratamiento con eCG y las razas ni entre el tratamiento con eCG y el tiempo. El porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra presentó diferencias en la interacción entre el tratamiento con eCG y el tiempo de colección ($p < 0,0001$): en el día 2 el porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra fue mayor en el grupo control que en el grupo tratado con eCG ($78,4 \pm 3,6$ % vs $66,1 \pm 3,4$ %, respectivamente; $p= 0,01$). Asimismo, no se observaron diferencias en la interacción entre tratamiento con eCG y las razas.

6.3. Semen descongelado

La integridad de membrana tendió a ser mayor en el grupo tratado con eCG que en el grupo control (Tabla 2). Mientras que el resto de las variables evaluadas no presentaron diferencias significativas entre el grupo tratado con eCG y el control (Tabla 2). La calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional fueron mayores en la raza TEX que en la HL (Tabla 2). El porcentaje de espermatozoides móviles tendió a ser mayor en la raza TEX que en la HL (Tabla 2). La integridad de membrana no presentó diferencias entre razas (Tabla 2).

La calidad de la motilidad no presentó diferencias significativas en las interacciones entre tratamiento con eCG y las razas, ni entre el tratamiento con eCG y el tiempo.

Hubo diferencias significativas en la interacción entre el tratamiento con eCG y el tiempo en el porcentaje de espermatozoides móviles ($p= 0,0001$): en el día 7 existió una tendencia a ser mayor el porcentaje de espermatozoides móviles en el grupo tratado con eCG que en el grupo control ($50,8 \pm 3,7\%$ vs $40,8 \pm 3,7\%$ respectivamente; $p= 0,06$). También hubo diferencias entre el tratamiento con eCG y el tiempo en el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva ($p= 0,001$). Sin embargo, no se observaron diferencias entre punto y punto en ambas variables (Figura 2). No hubo interacción entre el tratamiento con eCG y las razas en el porcentaje de espermatozoides móviles y con motilidad progresiva.

No se encontraron diferencias significativas en la interacción entre el tratamiento con eCG y las razas, ni entre el tratamiento con eCG y el tiempo en el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional y en el porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra.

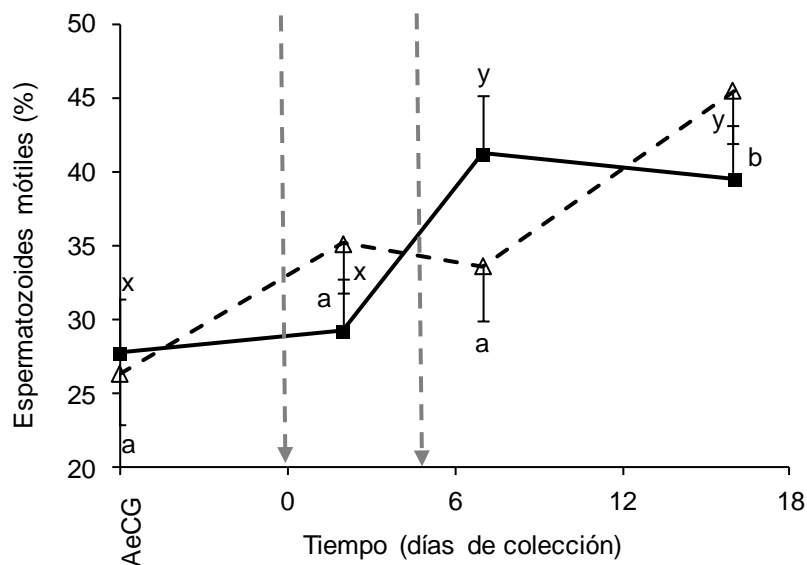


Figura 2. Porcentaje de espermatozoides móviles en semen descongelado de carneros Texel y Highlander tratados con eCG (-■-) y no tratados (-△-) en función de los días de colección. Las muestras fueron colectadas durante la estación no reproductiva. Las flechas punteadas indican los momentos en que se administró la eCG (1000 UI administrada el día 0 y 5) y AeCG representa la media de los datos colectados antes de administrar la eCG. Diferentes letras indican diferencias grupo por tiempo. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados \pm EE.

Tabla 2. Características seminales de semen descongelado (media \pm EE) en carneros de dos razas (Texel y Highlander) tratados con eCG (2 dosis de 1000UI) o no durante la estación no reproductiva.

Características seminales	GCon	GeCG	p*	HL	TEX	p**
Calidad de la motilidad (0-5)	1,7 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	ns	1,5 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	0,04
Espermatozoides móviles (%)	42,2 \pm 1,8	41,9 \pm 1,8	ns	40,1 \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 1,5	33,7 \pm 1,4	ns	30,5 \pm 1,5	36,5 \pm 1,4	0,005
Espermatozoides con membrana íntegra (%)	34,2 \pm 3,4	39,5 \pm 3,3	0,1	35,7 \pm 2,4	37,9 \pm 2,3	ns

Nota: p*: p-valor entre tratamientos; p**: p-valor entre razas; GCon: grupo control; GeCG: grupo tratado con eCG

6.4. Tasa de crioresistencia

La integridad de membrana tendió a ser mayor en el grupo tratado con eCG que en el grupo control (Tabla 3). El resto de las variables evaluadas no presentaron diferencias entre grupo tratado con eCG y el control (Tabla 3). La calidad de la motilidad fue mayor en la raza HL que en la TEX, mientras que el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva tendió a ser mayor en la raza HL que en la TEX (Tabla 3). El resto de las variables evaluadas no presentaron diferencias entre las razas (Tabla 3).

Se observó una interacción entre el tratamiento y el tiempo en la tasa de crioresistencia en el porcentaje de espermatozoides móviles ($p= 0,0001$) y con motilidad progresiva ($p= 0,0008$). Ambas variables fueron significativamente mayores en el grupo tratado con eCG que en el grupo control en el día 7 (espermatozoides móviles: $72,6 \pm 4,6 \%$ vs $56,4 \pm 4,6 \%$, respectivamente; $p= 0,01$; móviles progresivos: $65,12 \pm 4,6 \%$ vs $50,0 \pm 4,6 \%$, respectivamente; $p= 0,02$). No se observaron diferencias significativas en la interacción entre tratamiento y raza en estas mismas variables.

Existió una tendencia en la interacción entre el tratamiento con eCG y las razas en el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional y con membrana íntegra ($p= 0,06$; $p= 0,07$, respectivamente), y no hubo diferencias significativas en la interacción entre el tratamiento con eCG y el tiempo en dichas variables.

Tabla 3. Características seminales de tasa de crioresistencia en (media \pm EE) carneros de dos razas (Texel y Highlander) tratados o no con 1000 UI de eCG durante la estación no reproductiva.

Características seminales	GCon	GeCG	p *	HL	TEX	p **
Calidad de la motilidad (0-5)	51,6 \pm 3,6	58,0 \pm 3,5	ns	48,9 \pm 3,6	60,7 \pm 3,5	0,03
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 2,3	54,5 \pm 2,2	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 (%)	43,3 \pm 3,1	49,7 \pm 2,9	0,1	46,2 \pm 3,1	46,8 \pm 2,9	ns

Nota: p*: p-valor entre tratamientos; p**: p-valor entre razas; GCon: grupo control; GeCG: grupo tratado con eCG; ns: no significativo

7. DISCUSIÓN

Luego de la administración de eCG no se observaron efectos positivos en la circunferencia escrotal y en las características seminales de los carneros TEX y HL, al menos con la frecuencia de administración de eCG utilizada, y época del año en la que se realizó el estudio. Esto difiere de los resultados observados por Beracochea y col. (2018) en los cuales la administración de eCG mejoró la calidad seminal en chivos. Al inicio del presente trabajo se colectaron eyaculados con motilidades similares a lo reportado durante la estación reproductiva por Ojeda, (2017). Esto puede ser la base de la discordancia entre nuestro trabajo y el reportado por Beracochea y col. (2018) ya que parecería difícil mejorar características seminales que ya de inicio eran buenas.

Beracochea y col. (2018) reportaron una tendencia a mejorar la motilidad espermática luego de la descongelación en aquellos chivos que habían sido tratados previamente con eCG. Sin embargo, la administración de eCG a carneros no logró mejorar ninguno de los parámetros evaluados luego de la descongelación, refutando, nuestra hipótesis. En este sentido, D'Alessandro y Martemucci (2003) sostienen que la resistencia del semen al frío luego del descongelado, se ve afectado por la calidad del semen fresco previo al procesamiento y congelado. Por tanto, difícilmente se podrían haber obtenido mejoras en las características seminales luego del descongelado, cuando en el fresco no se observaron mejorías tras la administración de esta hormona.

El volumen seminal de los carneros HL en el presente trabajo duplicó el resultado observado por Ojeda, (2017) durante la primavera ($1,4 \pm 0,1$ mL vs $0,7 \pm 0,1$ mL), y el de los carneros de la raza TEX fue levemente superior al reportado por Ojeda, (2017) ($1,1 \pm 0,1$ mL vs $0,7 \pm 0,1$ mL). Esta discordancia la atribuimos al diferente método utilizado en la colecta seminal (electroeyaculador versus vagina artificial) y no a la administración de la eCG ya que los eyaculados colectados con electroestimulador contienen mayor volumen debido a la mayor proporción en el contenido de plasma seminal por sobre-estimulación de las glándulas accesorias (Marco-Jimenez y col., 2005).

Si bien Beracochea y col. (2018) reportaron que en chivos la administración de eCG logró mejorar la motilidad espermática durante la estación no reproductiva, y a su vez, Ungerfeld, (2018) demostró que el comportamiento sexual de los carneros se logró estimular luego de la administración de esta hormona, el presente trabajo fue el primero realizado con el objetivo de mejorar los parámetros seminales en carneros fuera de la estación reproductiva utilizando la eCG. Al contrario de lo que planteamos en la hipótesis, los resultados obtenidos durante todo el trabajo ponen de manifiesto que no existieron diferencias sustanciales en la calidad seminal global en los grupos control de ambas razas, no pudiendo deducirse de este modo, que la raza HL presente una estacionalidad reproductiva más extensa en el tiempo en comparación con la raza TEX.

Se ha demostrado, además, que tratamientos con eCG inducen una estimulación en la secreción de testosterona tanto en chivos (Beracochea y col., 2018) como en carneros (Hochereau-De Reviers y col., 1990; Ungerfeld, 2018) y que la testosterona provoca cambios en la composición del plasma seminal, que benefician la calidad espermática (Matsouka y col., 2006). Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado, hubiera sido interesante medir la concentración de testosterona en sangre, con el objetivo de evaluar modificaciones en su concentración. Conocer el perfil de la concentración de testosterona hubiese permitido detectar si efectivamente la concentración de dicha hormona se mantuvo alta por un período considerable de tiempo o si la misma fluctuó a lo largo del trabajo, lo que puede haber contribuido a la falta de buenos resultados obtenidos.

8. CONCLUSIONES

La administración de eCG durante la estación no reproductiva no mejoró los parámetros de calidad seminal evaluados, ni aumentó la circunferencia escrotal en carneros de raza Texel y Highlander. Tampoco hubo respuestas diferentes a la eCG de acuerdo a la raza de los carneros.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. Abecia, J. A., Forcada, F., González-Bulnes, A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130: 173–179.
3. Abecia, J. A., Keller, M., Palacios, C., Chemineau, P., Delgadillo, J. A. (2019). Light-induced sexually active rams prevent the seasonal inhibition of luteinizing-hormone in ovariectomized estradiol-implanted ewes. *Theriogenology* 136:43-46.
4. Alexander, B. M. (2018). Male reproductive behavior: sensory signaling in the brain of low-performing domestic rams. *Journal of Animal Science*, 96: 3003–3008.
5. Arellano-Lezama, T., Cruz-Espinoza, F., Pro-Martínez, A., Salazar-Ortiz, J., Gallegos-Sánchez, J. (2017). Factores ambientales que afectan la calidad seminal del carnero. *Agroproductividad*, 10: 53-59.
6. Arroyo, J. (2011). Estacionalidad reproductiva de la oveja en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14: 829-845.
7. Asher, G. W., Monfort, S. L., Wemmer, C. (1999). Comparative reproductive function in cervids: implications for management of farm and zoo populations. *Journal of Reproduction and Fertility. Suppl*, 54: 143-156.

8. Avdi, M., Banos, G., Stefanos, K., Chemineau, P. (2004). Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Serres rams. *Theriogenology*, 62: 275-282.
9. Bamba, K. (1988). Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology*, 29: 1245-1251.
10. Beracochea, F., Viera, M., Acevedo, L., Santiago-Moreno, J., Ungerfeld, R. (2018). Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) improves bucks' semen quality during the non breeding season. *Reproduction In Domestic Animals*, 53: 1096–1102.
11. Bielli, A. (2002). Estacionalidad reproductiva: el significado de la luz. En: Ungerfeld, R (Ed). *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibe, p 123–140.
12. Brito, L. F., Barth, A. D., Bilodeau-Goeseels, S., Panich, P. L., Kastelic, J. P. (2003). Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology*, 60: 1539–1551.
13. Bustos Obregón, E., Torres-Díaz, L. (2012). Reproducción estacional en el macho. *International Journal of Morphology*, 30: 1266–1279.
14. Campbell, R. C., Dott, H. M., Glover, T. D. (1956). Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *The Journal of Agricultural Science*, 48: 1.

15. Casao, A., Vega, S., Palacín, I., Pérez-Pe, R., Laviña, A., Quintín, F. J., Muiño-Blanco, T. (2010). 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.
16. Chemineau, P., Malpoux, B., Delgadillo, J. A., Guerin, Y., Ravault, J. P., Thimonier, J., Pelletier, J. (1992). Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Animal Reproduction Science*, 30: 157–184.
17. Christakos, S., Bahl, O. P. (1979). Pregnant mare serum gonadotropin. Purification and physicochemical, biological, and immunological characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 254: 4253-4261.
18. 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, Developpement*, 26: 863-875.
19. 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.
20. D'alessandro, A. G., Martemucci, G. (2003). Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Lecce ram. *Animal Reproduction Science*, 79: 93-102.

21. 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.
22. de Lucas Tron, J., Padilla, E. G., Rojas, L. M. (1997). Estacionalidad reproductiva en ovejas de cinco razas en el altiplano central mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 35:25-31.
23. Delgadillo, J. A., Fitz-Rodríguez, G., Duarte, G., Véliz, F. G., Carrillo, E., Flores, J. A., Malpoux, B. (2004). Management of photoperiod to control caprine reproduction in the subtropics. *Reproduction, Fertility and Development*, 16: 471-478.
24. Ducci, M., Gazzano, A., Villani, C., Cela, V., Artini, P. G., Martelli, F., Genazzani, A. R. (2002). Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 102: 53–56.
25. Estes, M.C., Soler, A.J., Fernández-Santos, M.R., Quintero-Moreno, A.A., Garde, J.J., 2006. Functional significance of 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.
26. Evans, G., Maxwell, W.M.C., 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza. Acriba, 192p.
27. Fernald, R. D., White, R. B. (1999). Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 20: 224-240.

28. Fernández, S., Sestelo, A., Rivolta, M., Córdoba, M. (2013). Capacitation and acrosome reaction induction on thawed Damadama Deer Spermatozoa: glycine effect as cryopreservation diluent Supplement. *Zoological Science*, 30: 1110–1116.
29. Forsberg, M. (2002). Estacionalidad reproductiva: el significado de la luz. En: Ungerfeld, R (Ed). *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea, p 123–140.
30. Frileck S.A. Highlander®. (2018). Disponible en: <http://www.highlanderuruguay.com/sobre-highlander/>. Fecha de consulta: 26 de noviembre de 2018.
31. Gerlach, T., Aurich, J. E. (2000). Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Animal Reproduction Science*, 58: 197-213.
32. 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.
33. Goeritz, F., Quest, M., Wagener, A., Fassbender, M., Broich, A., Hildebrandt, T. B., 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.
34. Gonzales, K. (2017). Diez Razones para Criar Ovejas Texel. *Revista. Veterinaria Argentina*. Disponible en:

<https://www.veterinariargentina.com/revista/2017/07/diez-razones-para-criar-ovejastexel/>. Fecha de consulta: 26 de noviembre de 2018.

35. 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.
36. Highlander, raza ovina de carne. Uruguay. *Revista Veterinaria Argentina*. Disponible en: <https://www.veterinariargentina.com/revista/2013/06/highlander-raza-ovina-de-carne-uruguay/>. Fecha de consulta: 26 de noviembre de 2018.
37. 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.
38. Humphrey, W. D., Murphy, B. D., Rieger, D., Mapletoft, R. J., Manns, J. G., Fretz, P. B. (1979). Effect of FSH/LH ratio of PMSG on ovulatory responses. *Theriogenology* 11:101.
39. Islam, A. B. M. M., Land, R. B. (1977). Seasonal variation in testis diameter and sperm output of rams of breeds of different prolificacy. *Animal Science*, 25: 311-317.
40. Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., Zaneveld, L. J. D. (1984). Development of an assay to assess the functional integri-

ty of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70: 219–228.

41. 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.
42. Kulaksiz, R., CebiSen, C. (2019). Investigation of the changes observed in scrotal circumference, and native and post-thaw semen characteristics in karayaka rams during the breeding and non breeding seasons. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 70: 1655-1660.
43. Li, C., Zhou, X. (2015). Melatonin and male reproduction. *Clinica Chimica Acta*, 446: 175-180.
44. Lincoln, G. A., Davidson, W. (1977). The relationship between sexual and aggressive behaviour, and pituitary and testicular activity during the seasonal sexual cycle of rams, and the influence of photoperiod. *Reproduction*, 49: 267-276.
45. Lincoln, G. A., Peet, M. J. (1977). Photoperiodic control of gonadotrophin secretion in the ram: a detailed study of the temporal changes in plasma levels of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone following an abrupt switch from long to short days. *Journal of Endocrinology*, 74: 355-367.
46. Lincoln, G. A., Short, R. V. (1980). Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Proceedings of the Laurentian Hormone Conference*, 36:1-52.

47. Lincoln, G. A., Ebling, F. J. P. (1985). Effect of constant- release implants of melatonin on seasonal cycles in reproduction, prolactin secretion and moulting in rams. *Journal of Reproduction and Fertility*, 73: 241-253.
48. Lincoln, G. A., Fraser, H. M., Abbott, M. P. (1986). Blockade of pulsatile LH, FSH and testosterone secretion in rams by constant infusion of an LHRH agonist. *Journal of Reproduction and Fertility*, 77: 587–597.
49. Lincoln, G. A., Lincoln, C. E., McNeilly, A. S. (1990). Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88: 623–633.
50. Lincoln, G. A., Maeda, K. I. (1992). Reproductive effects of placing micro-implants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area in rams. *Journal of Endocrinology*, 132: 201-215.
51. Marco-Jiménez F, Puchades S, Gadea J, Vicente J, Viudes de Castro M, (2005) Effect of semen collection method on pre and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology* 64: 1756–1765.
52. Martin, G. B., Hötzel, M. J., Blache, D., Walkden-Brown, S. W., Blackberry, M. A., Boukhliq, R., Miller, D. W. (2002). Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of responses to photoperiod by an annual cycle in food supply. *Reproduction, Fertility and Development*, 14: 165-175.

53. Martinuk SD, Manning AW, Black WD, Murphy BD. (1991). Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological activity of equine chorionic gonadotropin in vivo. *Biology of Reproduction*, 45: 598-604.
54. 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.
55. Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57: 327-344.
56. 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.
57. Murphy, B. D., Martinuk, S. D. (1991). Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews*, 12: 27-44.
58. Murphy, B. D. (2012). Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Animal Reproduction*, 9: 223-230.
59. Ojeda, M. (2017) Comportamiento reproductivo y calidad seminal de carneros de las razas Highlander y Texel a lo largo del año. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Mar del Plata, p 155.

60. Ollero, M., Perez-Pe, R., Muino-Blanco, T., Cebrian-Perez, J. A. (1998). Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology*, 37: 1-12.
61. Ortavant, R., Bocquier, F., Pelletier, J., Ravault, J. P., Thimonier, J., Volland-Nail, P. (1988). Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod. *Australian Journal of Biological Sciences*, 41: 69–86.
62. Ortavant, R., Mauleon, P., Thibault, C. (1964). Photoperiodic control of gonadal and hypophyseal activity in domestic mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 117: 157-193.
63. Palacín, I., Abecia, J. A., Forcada, F., Casao, A., Cebrián, J. Á., Muiño, T., Pontes, J. M. (2008). Effects of exogenous melatonin treatment on out-of-season ram fertility. *Italian Journal of Animal Science*, 7: 199-206.
64. Patil, S. R., Sonar, A., Londonkar, R., Patil, S. R., Patil, S. B. (1998). Efficacy of exogenous gonadotropins on the maintenance of spermatogenesis in pethidine treated albino rats. *Indian journal of physiology and pharmacology*, 42: 509-514.
65. Peris, S. I., Morrier, A., Dufour, M., Bailey, J. L. (2004). Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *Journal of Andrology*, 25: 224-233.
66. Pierce, J. G., Parsons, T. F. (1981). Glycoprotein hormones: structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, 50: 465-495.

67. Ptaszynska, M. (2007). Compendium de reproducción animal. 9° ed. Montevideo, Intervet, 205 p.
68. Quirke, J. F., Stabenfeldt, G. H., Bradford, G. E. (1985). Onset of puberty and duration of the breeding season in Suffolk, Rambouillet, Finnish Landrace, Dorset and Finn-Dorset ewe lambs. *Journal of Animal Science*, 60: 1463-1471.
69. Rosa, H. J. D., Bryant, M. J. (2003). Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*, 48: 155–171.
70. Santiago-Moreno, J., Gómez-Brunet, A., Toledano-Díaz, A., Picazo, R., Gonzalez-Bulnes, A., López-Sebastián, A. (2006). Seasonal endocrine changes and breeding activity in Mediterranean wild ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, 41: 72-81.
71. Somoza, G. (2002). Eje hipotálamo - hipofisario. En: Ungerfeld, R (Ed). *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea, p 17-24.
72. 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.
73. Urviola- Garcia, A. P., Riveros, F., Luis, J. (2017). Factores moduladores de la estacionalidad reproductiva en ungulados. *Revista Investigaciones Alto andinas*, 19: 319-336.

74. Ungerfeld, R. (2002). Hipófisis y Gonadotrofinas. En: Ungerfeld, R (Ed). Reproducción en los animales domésticos. Montevideo, Melibea, p 123–140.
75. 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.
76. 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.
77. Ungerfeld, R., Clemente, N., Bonjour, L., Orihuela, A. (2014). Equine Chorionic Gonadotrophin administration to rams improves their effectiveness to stimulate an oestrous ewes (the “ram effect”). *Animal Reproduction Science*, 149:194–198.
78. Ungerfeld, R. (2016). Manejo de la estacionalidad reproductiva en pequeños rumiantes. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 24: 11-116.
79. Ungerfeld, R., Clemente, N., Orihuela, A. (2018). Treatments with eCG and courtship behaviour in rams during the breeding and the non-breeding seasons. *Animal Production Science*, 59:865-869.
80. Wood, S., Loudon, A. (2018). The pars tuberalis: the site of the circannual clock in mammals?. *General and Comparative Endocrinology*, 258: 222-235.

81. Yu, K., Deng, S. L., Sun, T. C., Li, Y. Y., Liu, Y. X. (2018). Melatonin regulates the synthesis of steroid hormones on male reproduction: a review. *Molecules*, 23: 447.