50

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

"INDUCCIÓN DE LA PUBERTAD EN CABRITOS MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA Y GnRH"

T É S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A N:

CRISTINA PONCE LÓPEZ

MIGUEL ANGEL VIDAL GONZÁLEZ

ASESOR: M. EN C. ARTURO ANGEL TREJO GONZÁLEZ

270290

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX. 2000

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E.

ATN.: Q. M. DEL CARMEN GARCIA MIJARES
JEFE DEL DEPARTAMENTO.

Con base al articulo 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a Usted que revisamos el TRABAJO de tesis con el nombre de:

"Inducción de la pubertad en cabritos mediante la administración de melatonina y GnRH".

que presenta la pasante: PONCE LOPEZ CRISTINA
con número de cuenta : 9352833-9 para obtener el Título de :

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E.
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izc., México, a 8 de Febrero de 1999

Presidente	M.C. JOSE DE LUCAS TRON	
Vocal	M.C. FERNANDO OSNAYA GALLARDO	
Secretario	M.C. ARTURO ANGEL TREJO GONZALEZ	
1er. Sup.	M.C. MIGUEL ANGEL PEREZ RAZO	
2do. Sup.	M.C. ROSALBA SOTO GONZALEZ	

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E.

ATN.: Q. M. DEL CARMEN GARCIA MIJARES
JEFE DEL DEPARTAMENTO.

Con base al articulo 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a Usted que revisamos el TRABAJO de tesis con el nombre de:

"Inducción de la pubertad en cabritos mediante la administración de melatonina y GnRH".

que presenta el pasante: VIDAL GONZALEZ MIGUEL ANGEL
con número de cuenta : 9361984-2 para obtener el Título de :

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E.
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izc., México, a 8 de Febrero de 1999

Presidente M.C. JOSE DE LUCAS TRON

Vocal M.C. FERNANDO OSNAYA GALLARDO

Secretario M.C. ARTURO ANGEL TREJO GONZALEZ

1er. Sup. M.C. MIGUEL ANGEL PEREZ RAZO

2do. Sup. M.C. ROSALBA SOTO GONZALEZ

Agradecimientos a:

- Miguel, porque siempre está conmigo en todo.
  Je suis très heureuse avec toi. Merci beaucoup, chiot.
- Dios, por todo y que nunca se olvida de mi.
- Mis padres, por todo su apoyo, comprensión amor y educación; y que siempre están al pendiente de mi.
- Mis hermanas.
- Doña Pili y Don Carlos por su apoyo y cariño incondicional.
- El Doctor Trejo, que siempre nos brinda su ayuda, enseñanza y amistad.
- La UNAM, por darme todos los elementos para realizar mi carrera.
- Mis chivitos: Blanco, Miedoso, Hooligan, Tiba, Chuchito, Chuequito y todos los demás.
- Mis perros y gatos porque me dieron todo su amor.
- Todos los compañeros del Laboratorio de Reproducción de la FESC y a las Doctoras del Laboratorio de Endocrinología en C.U. por la mano que nos echaron.

Cristina.

MIGUEL AGRADECE A:

- ◇ Cris. Je te remercie et je t'aime.
- ◇ Mis padres, por todo (literalmente).
- ◇ Ich bedanke mich bei meinem Gott.
- ◇ La U.N.A.M.
- ◇ Doctor Trejo, por ser tan amable, considerado y por ser tan gente con nos (sin ningún interés propio).
- ◇ Mis carnales, mis sobrinitos y mis cuñadas.
- ◇ Los profesores que me hayan enseñado algo positivo de su excelencia o de su miseria (según sea el caso) dentro de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
- ◇ Mis profesoras de Italiano (Sra. Paola Ticozzi y Sra. Regina Chorné), Madame Laganà y Herr Wichmann, sin orden de distinción, por ayudarme a superarme un poco, por su disposición y por ser tan amables conmigo.
- ◇ Los franceses que si aceptaron nuestro trabajo original en la 7ème Conférence Internationale sur les Caprins en Tours.

  Las Doctoras que nos ayudaron en el Laboratorio de Endocrinología en C. U. y todos los que nos ayudaron en Reproducción en la FES-C.
- ◇ Todos los Doctores y profesores que me evaluaron objetivamente (atendiendo solo mi desempeño y capacidad), que afortunadamente resultan ser la gran mayoría.
- ◇ Los que me regalaron dinero por ir a la escuela (v. gr. Good-Year Oxo).

◇ Mis perros.

◇ Los pobres #422, #433, #435 y #438 y todos los caídos. Les debemos mucho.

◇ Mis amigos que alguna vez me han dicho que están orgullosos de mí y/o que soy bueno en lo que hago y que han estado pendientes de mí.

◇ Los únicos dos Profesores que me otorgaron una "B" merecida y los restantes doce que me robaron un "MB" por corruptos.

◇ (Macintosh, la mejor computadora).

◇ El CGH y conexos, que con su retrogradismo hacen que la gente que realmente tiene ganas sobresalga aún más.

RESUMEN:

Dentro de la producción agrícola mundial, trátese de la especie que se trate, la importancia del macho es la misma o mayor que de la hembra, ya que cuando la producción de un macho se ve afectada, también lo hace la porción de hembras que él representa; mientras que cuando se afecta la producción de una hembra, solo se trata de un cambio individual. Por ello, también se deben hacer estudios en los machos, teniendo siempre en cuenta su importancia y el provecho que se obtendría de ello. En el presente estudio realizado en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la U. N. A. M. (Estado de México), se utilizaron cuatro cabritos con la finalidad de observar el comportamiento general en cuanto a la inducción artificial de la pubertad en esta especie. Se utilizaron animales de cinco a cinco meses y medio de edad y se designó un tratamiento diferente a cada animal: el primero fue un grupo control, al segundo y al tercero se les administró melatonina por vía oral (3 mg y 6 mg respectivamente) diariamente al atardecer por cuarenta días y al último le fue administrado un análogo de GnRH (equivalente a 0.8 μg) por vía parenteral en 500 ml de solución salina fisiológica por siete días consecutivos. Para establecer criterios útiles para la determinación de la inducción de la pubertad, se determinaron periódicamente el peso vivo, el perímetro escrotal, el volumen seminal, la concentración espermática, la motilidad espermática progresiva, el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales, así como el porcentaje de anormalidades espermáticas primarias y secundarias (el semen fue obtenido por medio de electroeyaculación, una vez que la adhesión prepucial había cedido). Además, fue evaluado el nivel sérico de testosterona por medio de Radioinmunoanálisis en Ciudad Universitaria (U. N. A. M.) en un contador de ondas gamma (la muestra sérica era obtenida periódicamente y almacenada en congelación, para al final realizar la determinación del total de las muestras). El tratamiento con 3 mg de melatonina dos o tres horas antes de anochecer durante 40 días parece ser el tratamiento más apropiado para adelantar la pubertad en machos caprinos hasta por cuatro semanas en relación a individuos control. En contraste, el tratamiento con 6 mg de melatonina parece no ejercer efectos benéficos en la busca de la inducción de la pubertad. La administración de GnRH parece ser también, aunque en menor medida, un inductor de la pubertad. Además, con este tratamiento se logra tener un efecto anabólico que se observa en parámetros de crecimiento tales como peso vivo y medición de perímetro escrotal. Se pretende que la finalidad primordial de este trabajo sea que sirva de referencia de comparación de los tratamientos hormonales utilizados con mayor frecuencia para inducir la pubertad en los machos de especies estacionales rumiantes y, a su vez, contribuir en la formación de un protocolo de tratamiento para dicha finalidad y para establecer los lineamientos fisiológicos del fenómeno de la estacionalidad en relación a la presentación de la pubertad en el macho caprino y los cambios fisiológicos y anatómicos que en este fenómeno ocurren.

ÍNDICE:

INTRODUCCIÓN..... 1

Situación actual de la caprinocultura en México..... 1

Fisiología endocrina reproductiva del macho..... 3

Pubertad en el macho caprino..... 5

Melatonina y su papel reproductivo en los pequeños rumiantes..... 7

Influencia de la melatonina en la presentación de la pubertad..... 11

GnRH..... 12

OBJETIVO..... 13

MATERIAL Y MÉTODOS..... 14

RESULTADOS..... 27

DISCUSIÓN..... 36

CONCLUSIONES..... 39

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 40

I. INTRODUCCIÓN:

A) SITUACIÓN ACTUAL DE LA CAPRINOCULTURA EN MÉXICO:

En México la ganadería constituye una importante actividad económica y representa la forma de aprovechamiento más amplia de las tierras del país. En efecto, la ganadería se realiza en más de 110 millones de hectáreas, genera alrededor de la tercera parte del PIB agropecuario y 12% del empleo en el campo; así mismo, la producción animal en México genera una oferta de 25 gramos *per capita* al día de proteína ingerible de alto valor biológico, cantidad que teóricamente satisface el mínimo recomendable de ingesta, de este nutrimento, aunque en condiciones reales resulta insuficiente para todos los mexicanos, en virtud de la polarización del ingreso y, por ende, del consumo de productos de origen animal (programa de maestría y doctorado en ciencias de la producción y de la salud animal, 1998).

La población actual de animales en México está constituida por cerca de 36 millones de bovinos, 15 millones de porcinos, 12 millones de equinos, 5 millones de ovinos, más de 300 millones de aves, varios millones de mascotas y 9 millones de caprinos. Esta población genera una demanda de atención médica y zootécnica que es atendida por aproximadamente 25 000 médicos veterinarios zootecnistas (programa de maestría y doctorado en ciencias de la producción y de la salud animal, 1998).

La problemática agropecuaria nacional no sólo se limita a la producción de una sola especie, ya sean sus deficiencias o sus expectativas, sino a todas; pero está claro que paralelamente a ciertas especies que se explotan en sistemas intensivos y modernos, continúan existiendo sistemas de producción basados en la economía campesina a pequeña escala (minifundismo), y que operan con una lógica distinta, con requerimientos de insumos muy diferentes a aquellos de los sistemas de producción especializados, con la falta de oportunidad de obtener agrocréditos y la escasez de médicos y zootecnistas especializados. Todo esto aunado al intermediarismo y la falta de cultura de consumo (especialmente en contra de la

caprinocultura). Así, más del 70% de la producción ovina y caprina del país está limitada a sistemas campesinos tradicionales, lo que señala la importancia y potencial de estos sistemas de producción, de bajos insumos y alto valor social y económico (programa de maestría y doctorado en ciencias de la producción y de la salud animal, 1998).

La problemática de la producción caprina requiere de apoyo tecnológico profesional específico, que debe sustentarse en la investigación, desarrollo y adecuación de tecnologías que se generen en México, integrando el conocimiento universal con las aportaciones locales (programa de maestría y doctorado en ciencias de la producción y de la salud animal, 1998).

En suma, es necesario acudir a todos los recursos científicos y tecnológicos disponibles en nuestro país para poder avanzar en la producción agropecuaria. En cuanto a los caprinos, existen grandes lagunas en el conocimiento de sus estadísticas vitales en México (Arbiza, 1986) y también se ha dado poca importancia al macho en la literatura mundial, centrándose el interés actual sobre todo en el control parcial de algunos rasgos como la libido y el control de la pubertad (Jochle y Ross, 1980).

B) FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA ENDOCRINA DEL MACHO:

En el macho existe una interrelación hormonal indispensable para el correcto funcionamiento reproductivo. En la cabra comienza con el fenómeno de la estacionalidad, entonces el estímulo primario de dicha estacionalidad resulta ser el fotoperiodo (Bearden y Fuquay, 1992a). A este estímulo, la cabra responde mediante la vista, la cual por estímulo nervioso de la retina, envía una señal a glándula pineal, donde se sintetiza melatonina, que al ser secretada, llega a hipotálamo, que a su vez, desencadena una secreción de GnRH (Hormona Liberadora de Gonadotropinas) (Fig. 1) (Bearden y Fuquay, 1992a).

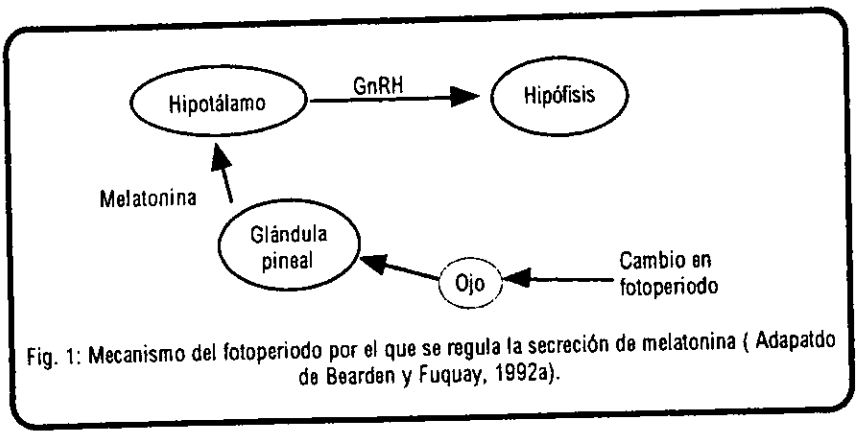


Fig. 1: Mecanismo del fotoperiodo por el que se regula la secreción de melatonina (Adapatdo de Bearden y Fuquay, 1992a).

La GnRH del hipotálamo estimula la liberación de FSH (Hormona Folículo-estimulante) y LH (Hormona Luteotrófica o Luteinizante) de la hipófisis anterior (Fig. 2) (Bearden y Fuquay, 1992a y c). La LH estimula las células de Leydig para producir testosterona. Altas concentraciones de testosterona inhiben la liberación de GnRH (y en consecuencia, de LH y FSH), mientras bajos niveles de testosterona estimulan la liberación de GnRH, una vez que se encuentra en la época reproductiva (Bearden y Fuquay, 1992a). La FSH estimula las células de Sertoli para producir inhibina (que inhibe la liberación de FSH) y ABP (Androgen Binding Protein), que integrada a la testosterona en los túbulos seminíferos, asegura la

continuación de la espermatogénesis (Bearden y Fuquay, 1992c). Esta acción recíproca de testosterona con el hipotálamo y hormonas gonadotrópicas es necesaria para la regulación de la función hormonal en el macho (Bearden y Fuquay, 1992a).

Como se ha dicho antes, la estimulación de la LH a las células de Leydig en los testículos inducen la producción de andrógenos. El principal andrógeno en el macho maduro es la testosterona (Bearden y Fuquay, 1992a).

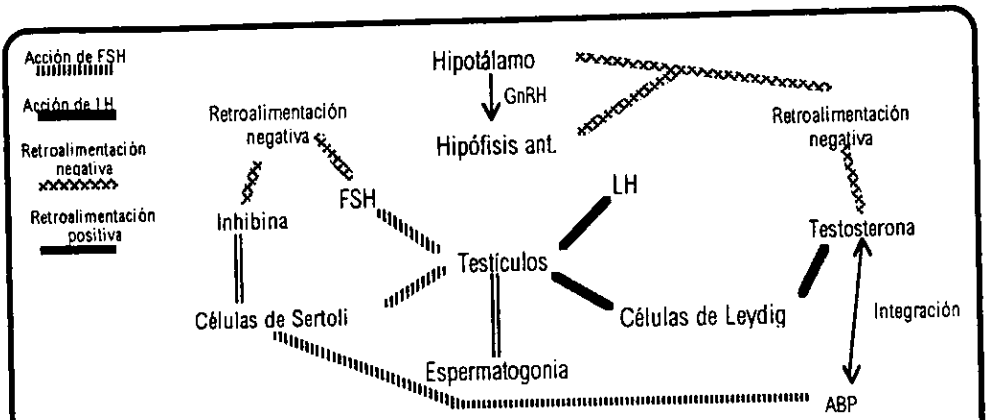


Figura 2: Interrelación de la regulación de hormonas reproductivas en el macho (Adapatdo deBearden y Fuquay, 1992a).

Las funciones de la testosterona incluyen (Swenson y Reece, 1993):

- Estimular junto con la FSH las células en túbulos seminíferos en la espermatogénesis.
- El desarrollo de las características secundarias sexuales.
- Mantenimiento de la libido (Comportamiento sexual).
- Función de las glándulas accesorias.
- Mantenimiento del sistema de ductos.
- Función de la túnica muscular dartos en el escroto.
- Diferenciación embrionaria del sistema de ductos en el macho y genitales externos.

C) PUBERTAD EN EL MACHO CAPRINO:

La pubertad se refiere, al inicio de la vida sexual en los animales (Trejo, 1986). Su presentación está íntimamente relacionada con el genotipo y la influencia de diversos factores ambientales, tales como la nutrición, peso vivo, tipo y época de nacimiento (Trejo, 1986). La pubertad en la hembra tiene origen con la liberación de los ovocitos y el comportamiento del estro; estos dos aspectos no se presentan necesariamente al mismo tiempo, de hecho es muy frecuente que exista una ovulación sin celo y es comúnmente llamado "celo silente" (Trejo, 1986). En los machos se manifiesta con la aparición de la espermatogénesis y la libido (Trejo, 1986).

La pubertad en el macho también se puede definir como la edad en que se alcanza el 56% del peso de adulto y de la primera colección de un eyaculado con 50 x 10^6 espermatozoides y 10% de motilidad (Mukasa *et al.*, 1992). Hay otros cambios que se pueden observar en los machos unas semanas antes de presentar el primer eyaculado fértil, como son: aumento en la conformación corporal, incremento en la agresividad, aparición de deseo sexual, crecimiento rápido del pene y los testículos y la separación del pene del prepucio (Mukasa *et al.*, 1992). El desarrollo de la función testicular es un cambio primario unos meses antes de la presentación de pubertad, este cambio primario es regulado por la Hormona Luteinizante (LH): a) estimulando la diferenciación de células de Leydig, b) comenzando a secretar androstenediona y c) incrementando el estímulo para la concentración de testosterona (Mukasa *et al.*, 1992).

Otro aspecto que se puede tomar en cuenta para determinar la presentación de la pubertad es el tamaño del perímetro escrotal (Mukasa *et al.*, 1992), que está correlacionado con el peso vivo y con la edad en la pubertad, esto sugiere que a falta de un dato de peso corporal de un individuo, el perímetro escrotal puede ser un indicador útil del principio de la pubertad (la medida del perímetro escrotal puede ser de gran ayuda para calcular el peso individual de un animal púber o prepúber en áreas rurales donde no hay facilidades para cuantificar el peso corporal) (Mukasa *et al.*, 1992). La predicción del peso vivo de los

pequeños rumiantes adultos por medidas lineales corporales han sido reportadas, pero el método carece de exactitud. A nivel genético, el perímetro escrotal es una medida simple con alta repetibilidad (Mukasa *et al.*, 1992). El tamaño testicular es altamente heredable y está asociado con la variación genética continua respondiendo más probablemente a la selección genética (Mukasa *et al.*, 1992). Por lo tanto, el perímetro escrotal es compatible con la selección genética para aumentar el incremento de ganancia de peso y crecimiento (Mukasa *et al.*, 1992).

D) MELATONINA Y SU PAPEL REPRODUCTIVO EN LOS PEQUEÑOS RUMIANTES:

La melatonina es un componente muy importante dentro de la actividad reproductiva de los animales estacionales, ya sean "reproductores de día largo" (aquellos que crían en la primavera) o "reproductores de día corto" (aquellos que crían durante el verano), como son la cabra, la oveja y el venado rojo (Adam, 1994). La cría estacional es una estrategia reproductiva (Williams y Helliwell, 1993), la cual maximiza en la vida salvaje la supervivencia de las crías quienes crecen en la primavera cuando la temperatura ambiental y el abasto de alimento van en aumento. Esta estrategia en animales domésticos es algo redundante, cuando viven en un ambiente más protegido (Williams y Helliwell, 1993).

Esta sustancia es un derivado del aminoácido triptofano y es secretada en forma natural por la glándula pineal (Bearden y Fuquay, 1992a). La oscuridad estimula un incremento en la actividad simpática en esta glándula, la cual incrementa la tasa de secreción de la hormona melatonina (Bearden y Fuquay, 1992a).

Su función dentro de la estacionalidad está bien establecida con la pinealectomía (Tucker, 1996), dando como resultado la falla en la respuesta gonadal al estímulo del fotoperiodo; y por el contrario, la administración exógena de melatonina va a imitar los efectos de este estímulo. Además, se ha estudiado en ovejas (Asher *et al.*, 1993) han indicado que en el patrón circadiano de secreción de la glándula pineal, la melatonina modula el efecto del fotoperiodo en la reproducción. Se ha indicado que hay un patrón diurno con niveles de melatonina indetectables durante el día (Williams y Helliwell, 1993) y con secreción inmediata y sostenida de melatonina durante la noche y la puesta de sol (Misztal *et al.*, 1996) (especialmente la primera hora posterior a la puesta de sol), tanto en animales estacionales, como en animales no estacionales. Se ha determinado también el claro efecto pituitario sobre los testículos de la administración de melatonina exógena midiendo cada 30 minutos el nivel de LH y testosterona en grupos tratados y control (Asher *et al.*, 1993).

En animales como la cabra o la oveja la secreción más alta y prolongada de melatonina se realiza en la época de noches largas y días cortos, regulando la actividad reproductiva de acuerdo a la longitud del fotoperiodo (Chemineau, 1993). Y por el contrario, existe una reducción de la producción y de la calidad de espermatozoides al haber un fotoperiodo largo (Bearden y Fuquay, 1992b). La melatonina secretada durante la noche permite a los animales determinar la longitud del día. Esta hormona puede ser usada para adelantar la época de apareamiento en cabras y ovejas y para incrementar su fecundidad (Chemineau, 1993). El uso de variaciones fotoperiódicas artificiales y/o administración de melatonina elimina o altera la declinación estacional de la producción de semen (Chemineau, 1993). Además, existe evidencia (McMillen *et al.*, 1995) de información compartida a cerca del fotoperiodo entre la madre y el feto durante la gestación, afectando al producto de tal modo, que se ha visto que si se altera el fotoperiodo en la madre al final de la gestación (a pesar de que se han detectado receptores activos en el feto desde mucho antes en la gestación -ver abajo-), el producto experimenta cambios en el nivel de prolactina en plasma y si la madre es pinealectomizada, llega a sufrir cambios en el ritmo respiratorio al nacer (McMillen *et al.*, 1990). De acuerdo a la duración de la señal nocturna de melatonina, se ve afectada la respuesta al fotoperiodo del cordero antes y después de nacer (Williams y Helliwell 1993).

El mecanismo por el cual la melatonina activa o inhibe la actividad reproductiva no está muy claro (Bearden y Fuquay, 1992a), a pesar de que existe gran cantidad de datos experimentales. Sin embargo, se ha demostrado que el sitio de acción más probable de la melatonina es a nivel de hipotálamo y sistema límbico del encéfalo (Williams y Helliwell, 1993), regulando la secreción de GnRH. Existe evidencia en roedores estacionales de que con implantes cerebrales de melatonina, se obtienen mejores resultados si se administra en el o cerca del hipotálamo medial, además de que los efectos de implantes cerebrales y sistémicos son bloqueados cuando se lesiona el hipotálamo en su área preóptica anterior y en algunas especies el núcleo supraquiásmico (Bartness *et al.*, 1991). Otro estudio en carneros demostró que la melatonina es más efectiva si se administra en la región medial basal del hipotálamo (Williams y Helliwell, 1993).

F) GnRH:

La hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH) es un decapéptido (p-Glu-His-Trip-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2) que estimula la parte anterior de la hipófisis para dar lugar a secreción de FSH y LH (Bearden y Fuquay, 1992a). La GnRH presenta variaciones en la frecuencia y amplitud de pulsos en su secreción (Swenson y Reece, 1993). La GnRH es producida en células neurosecretoras del hipotálamo (Bearden y Fuquay, 1992a) y junto con la dopamina (que se secreta en el núcleo arcuato) es transportada desde las terminales axónicas a los vasos sanguíneos, del hipotálamo a la eminencia medial, en donde son liberados por el sistema venoso portal (Cunningham, 1997). La síntesis de GnRH, junto con la oxitocina y la vasopresina, participa en la producción de una molécula precursora de GnRH llamada GnRH-Péptido-Asociado (GAP), que es importante en la inhibición de la secreción de prolactina (Cunningham, 1997).

- En el carnero, el fotoperiodo de día largo es inhibitorio para la GnRH en su síntesis y liberación, e incluso pequeñas cantidades de testosterona pueden aumentar la inhibición. En el fotoperiodo de día corto, la inhibición de la síntesis de GnRH es suprimida, y la influencia de la testosterona es nula (Cunningham, 1997). La actividad reproductiva es incrementada en el carnero cuando hay un estímulo a causa de la disminución de la luz, y se debe a un incremento en la frecuencia de la liberación de GnRH en el hipotálamo que estimula la secreción de LH y FSH en la hipófisis anterior; esta liberación de hormonas es importante para el establecimiento de la función testicular en los animales púberes o un restablecimiento en los animales maduros (Cunningham, 1997).

En un estudio realizado en ovinos (Cunningham, 1997), se determinó el promedio episódico de la liberación de LH y se halló que existía 1 episodio en 24 horas durante la inactividad testicular, 5 episodios en 24 horas durante la activación testicular y 12 episodios en 24 horas durante la actividad testicular normal.

II. OBJETIVO:

El objetivo de este trabajo es comparar los efectos de tres distintos tratamientos hormonales en cabritos prepúberes con un grupo control, para determinar cuál tratamiento es el más efectivo en relación a parámetros reproductivos y de crecimiento para inducir artificialmente la pubertad.

III. MATERIAL Y MÉTODOS:

I. El experimento se llevó a cabo en la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicada en el Municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México:

   A. Este lugar se localiza a 2450 metros sobre el nivel del mar, a 19° 43' de latitud Norte, y a 99° 14' de longitud Poniente (García, 1973). En una región de clima templado subhúmedo con lluvias predominantemente durante el verano (mayor precipitación en Junio, con valores entre los 120 y 130 mm; la precipitación mínima se da en el mes de Febrero con valores inferiores a los 5 mm) (INEGI, 1987). La precipitación media anual es de 600 a 800 mm. La temperatura media anual es de 12 a 16°C, con la temperatura más cálida en Mayo (18-19°C) y la más fría en los meses de Diciembre y Enero (11 a 12°C) (INEGI, 1987).

   B. Se realizó dentro de los corrales de la escuela destinados para experimentos de la Cátedra de Reproducción y Genética en Ovinos y Caprinos del Departamento de Ciencias Pecuarias. Dichos corrales son comunes para todas las hembras del rebaño y además, se cuentan con corrales especiales para experimentos diversos, para hembras parturientas y para madres con cría, estos últimos individuales o colectivos (según sea requerido).

II. El presente estudio se realizó con cuatro cabritos, a los que se realizó el siguiente manejo previo a la experimentación:

   A. Durante el parto:

      1. A inicio de Marzo de 1997 las madres a parir fueron asignadas a un corral especial, donde parieron y convivieron con el resto de las madres y sus crías hasta el destete, que se realizó a los 60 días de edad.
      2. Se cuidó que se alimentaran y alojaran adecuadamente, tanto madres como cabritos.
      3. Se identificaron con aretes de plástico y de metal.

   B. Los animales fueron identificados de la siguiente manera:

1. El primero nació el 31 de Marzo de 1997 y fue identificado con el número 422 (#422).
2. El segundo nació el 04 de Marzo de 1997 y fue identificado con el número 433 (#433).
3. El tercero nació el 11 de Marzo de 1997 y fue identificado con el número 435 (#435).
4. El cuarto nació el 28 de Marzo de 1997 y fue identificado con el número 438 (#438).

C. Lactancia y el destete:

1. Se vigiló su salud, su estado nutricional y su alojamiento.
2. Llegado el destete (a los 60 días), se separaron las crías de las madres y se alojaron en un corral contiguo, (tanto hembras, como machos).
    a) El corral midió 9 m^2 de sombra con un comedero común (de 1.75 m X 0.5 m), cama de paja de avena y un área de sol de 9 m^2 con piso de cemento y un bebedero con capacidad de 100 l.
3. Fueron desparasitados con Ivermectina (200 µg/Kg de peso vivo) administrada vía subcutánea.
4. Les fue cambiada la dieta por alfalfa y concentrado (de 90 g/cabrito/día aumentando la cantidad hasta alcanzar los 150 g/cabrito/día en un trascurso de 2 meses).
    a) La alfalfa se administró diariamente antes del mediodía (hora en que se administraba la solución parenteral con análogo de GnRH –ver abajo–) y a las 16:00·h (misma hora de administración del tratamiento con melatonina –ver abajo–).
    b) El concentrado se administró diariamente a la hora de la segunda comida.
5. Los animales fueron conservados en el mismo corral desde el destete (aproximadamente a inicio de Junio de 1997) hasta la última semana de Septiembre (fecha aproximada de inicio del experimento).
6. Una semana antes del comienzo del experimento fueron sacados el resto de los cabritos (un total de 11 entre hembras y machos), con la finalidad de adaptar los animales experimentales a estar solos y ser manejados. El corral fue dotado de una báscula con

capacidad para 50 Kg y una precisión de 50 g y de una repisa sobre una barda (en la sombra) para guardar sogas para colgar los animales al pesarlos, cinta métrica, sueros, jeringas, venoclisis, agujas, frascos de tabletas de melatonina y el frasco de análogo de GnRH.

III. El experimento constó de la asignación de cada cabrito a un grupo de tratamiento y de la evaluación de diferentes parámetros tomados como criterios de la presentación de la pubertad. La fase experimental se realizó con los siguientes pasos:

A. Control previo:

1. Se realizó determinación de medidas de peso y perímetro escrotal semanalmente desde 60 días antes de administrar los tratamientos hasta el inicio de la fase experimental.
2. Se intentó eyacular cada animal (sin significar que haya eyaculado) una vez a la semana durante cuatro semanas (un mes antes de comenzar la administración de los tratamientos), sin recibir ningún tratamiento y mediante la técnica de electroeyaculación abajo descrita con el fin de habituar los animales a dicho manejo y para monitorear su estado de desarrollo.

B. Aleatoriamente se designó un grupo de tratamiento a cada animal:

1. Cabrito #435 (tratamiento 1 –T1–): Grupo control, al que no se le realizó ningún tratamiento.
2. Cabrito #438 (tratamiento 2 –T2–): Se le administró melatonina a una dosis de 3 mg diarios durante 40 días consecutivos (desde el 29 de Septiembre hasta el 07 de Noviembre de 1997), suministrados por vía oral en comprimidos a las 16:00 h (Yang, 1995; Recabarren *et al.*, 1993; Asher *et al.*, 1993).
3. Cabrito #422 (tratamiento 3 –T3–): Se le administró melatonina a una dosis de 6 mg diarios durante 40 días consecutivos (desde el 29 de Septiembre hasta el 07 de Noviembre de 1997), suministrados por vía oral en comprimidos a las 16:00 h (Kusakari

et al., 1991).

4. Cabrito #433 (tratamiento 4 –T4–): Se le administró un análogo de GnRH (0.8 µg), por vía parenteral en 500 ml de solución salina fisiológica durante los primeros 5 días del tratamiento (desde el 29 de Septiembre hasta el 03 de Octubre de 1997)), la evaluación de parámetros de realizó al igual que los demás animales (ver abajo).

IV. Se determinaron criterios de evaluación de crecimiento y de presentación de la pubertad de la siguiente manera:

A. Medición de perímetro escrotal en centímetros.

1. Se tuvo al animal sujeto en pie por una persona y rodeando el escroto en su perímetro máximo por otra persona, se midió el perímetro escrotal en centímetros.
2. Este parámetro se midió hasta 15 días después de finalizar el tratamiento.

B. Determinación de peso vivo en kilogramos.

1. Se contuvo el animal con una soga metida en una pata delantera y la trasera del lado contrario para que no resbalase o cayese, y se dejó una gaza a nivel de la cruz del lomo a fin de poder colgar inmóvil al cabrito en el gancho de la báscula y determinar su peso vivo.
2. Este parámetro se midió hasta 15 días después de finalizar el tratamiento.

C. Obtención de electroeyaculado y determinación de criterios relacionados a características seminales:

1. Para poder realizar este tipo de determinaciones, se ha requerido que haya separado el prepucio su adhesión natural con el pene:
    a) Esto se determinó colocando el animal en posición de decúbito lateral sujeto por una persona y otra persona se requirió para desplazar el prepucio hacia abajo y ver si había separado ya.
2. Una vez que el prepucio separó, ya fue posible proceder a la electroeyaculación:

a) Se preparó un electroeyaculador con voltaje fijo de 9 voltios y un amperio, en el que se utilizó un electrodo de 13 cm de largo y 1.3 cm de diámetro, lubricado con pomada de Furacin para introducirlo completamente por el ano del cabrito.

b) Por otro lado, se preparó un tubo recolector de semen graduado en décimas de mililitro adicionado en la punta con una extensión de plástico para ampliar el orificio receptor.

Se prepararon a su vez, 100 ml de solución de Citrato de Sodio 98 mM:

(1) Primero se pesó en una báscula digital 2.9 g de Citrato de Sodio.

(2) En una probeta se depositó la sal y se aforó a 100 ml de agua destilada. Disolviéndola perfectamente.

c) En una platina caliente se reguló la temperatura alrededor de los 35°C y se puso a entibiar tanto el tubo recolector, como diversos portaobjetos y pipetas Pasteur.

En un baño María a 35°C se colocaron 5 tubos de ensayo de 20 ml con 9.9 ml de solución de Citrato de Sodio 98 mM (medidos con una pipeta graduada a 5 ml y una pipeta graduada a 1 ml) y 5 tubos de ensayo de 10 ml con 4.95 ml de solución de Citrato de Sodio 98 mM (medidos con una pipeta graduada a 2 ml y una pipeta graduada a 1 ml) hasta que alcanzaran la temperatura del resto del agua.

d) Se tomó el tubo graduado de la platina caliente e inmediatamente se colocó en un contenedor de hule espuma, tanto para amortiguar el tubo colector, como para proteger la muestra de semen obtenida de la luz y de perder temperatura rápidamente. También se prepararon gasas estériles cerca de donde se sujetaría al animal.

Se preparó a su vez, un microscopio de contraste de fases y diversos tubos

Eppendorf con capacidad de 2 mililitros conteniendo 0.5 ml de solución de Hancock (1957).

e) Dentro del Laboratorio se preparó el animal en posición de asiento sujeto por una persona para hacerle lavado y rasurado de la zona prepucial, luego se sujetó el pene para deslizarlo hacia fuera para posteriormente sujetarlo con una gasa y mantenerlo dentro del tubo colector.

Después, ya con el pene asegurado, se depositó el cabrito en posición decúbito lateral y, una vez en esa posición, se introdujeron la extensión del tubo colector de semen en el pene sujeto con la gasa y el electrodo del electroeyaculador por el ano (cuidando siempre que la parte metálica hiciera contacto con la pared ventral rectal).

f) Una vez el electrodo en el ano y el tubo colector listo, se comenzó a dar descargas eléctricas por medio del electroeyaculador, contando tres segundos encendido y tres segundos apagado. Todo esto hasta que el animal eyaculara y después de haber eyaculado por primera vez, se realizaban otras tres descargas eléctricas.

3. Determinación de volumen seminal por eyaculado.

a) Una vez obtenida la muestra se leyó el volumen en el tubo colector y se registró, luego se procedió a diluir la muestra en los tubos con solución de Citrato de Sodio 98 mM en el baño María de la siguiente manera:

(1) De la muestra se tomaron 0.1 ml con una pipeta graduada a 1 ml y se depositaba en un tubo conteniendo 9.9 ml de solución de Citrato de Sodio 98 mM y se homogeneizaba gentilmente.

4. Determinación de motilidad progresiva espermática.

a) Se preparó el microscopio con el dispositivo de contraste de fases y con el objetivo de 40X. De la muestra diluida, se tomó con una pipeta Pasteur una

gota para ser depositada en un portaobjetos a 35°C y se procedió a determinar motilidad progresiva de la muestra diluida.

b) Se hizo la determinación de motilidad progresiva a tres gotas de cada muestra y después se promediaron los porcentajes de motilidad progresiva para obtener un valor más confiable.

5. Determinación de concentración espermática.

a) En tubos Eppendorf con capacidad de 2 ml conteniendo 0.5 ml de solución de Hancock (1957), se depositó 0.5 ml de la misma muestra de semen diluido y se conservó herméticamente por una semana para poder realizar el conteo de espermatozoides.

b) Previamente al conteo celular, se requirió de homogeneizar el contenido del tubo con ayuda de un agitador de tipo Vortex.

c) En una cámara de conteo de células de Neubauer se deslizaba un cubreobjetos calibrado para ese uso y se depositaba la muestra de semen diluido en el compartimento adecuado a fin que el líquido se deslizara por todo el interior de la zona de cuadrantes.

d) Se colocó el microscopio de contraste de fases y se observó con el objetivo de 40X la cámara de Neubauer.

e) El conteo de células se realizó de la siguiente manera:

(1) Primero se apreciaban los cuadrantes de un lado de la cámara de Neubauer con el objetivo de 10X.

Los cuadrantes en que se hizo el conteo celular se disponían en las esquinas y en el centro, tal como se muestran sombreados en la Figura 4:

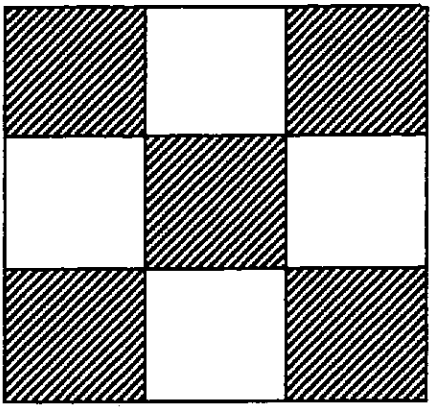


Figura 4: Disposición de los cuadrantes durante el conteo celular.

(2) En cada microcuadrante, el conteo se hizo de la misma forma que en los cuadrantes (conteo en esquinas y centro), tomando un criterio uniforme de conteo: Se tomaron 2 de los 4 margenes que fuesen perpendiculares para cada microcuadriculado y se contaban las células que estuvieran en contacto con ellos. Las que no lo estuvieran, no eran consideradas (Figura 5).

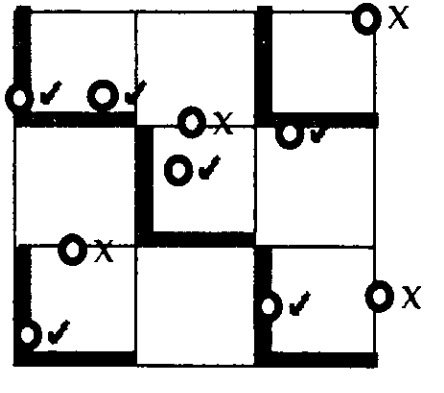


Figura 5: Representación de la forma en que se hizo el conteo espermático dentro de un microcuadrante. Donde ✓ si se contaba y x no se consideraba.

(3) Lo mismo se hizo del lado opuesto de la cámara y ambos valores se sumaron y promediaron.

(4) Finalmente, el número de células resultante se multiplicaba por 10^7.

6. Determinación de espermatozoides normales, anormalidades primarias y anormalidades secundarias.

a) En tubos Eppendorf con capacidad de 2 ml conteniendo 0.5 ml de solución de Hancock (1957), se depositaba 0.5 ml de la misma muestra de semen diluido y eran identificadas con número de cabrito y fecha. Después se conservaba herméticamente por una semana en un lugar obscuro y fresco para posteriormente proceder a la evaluación de anormalidades primarias y secundarias.

b) Para evaluar al microscopio la morfología celular fue necesario realizar frotis de cada muestra teñido con solución de Rosa de Bengala al 2%.

Antes de preparar el frotis, se agregó una gota de solución de Rosa de Bengala al 2% y fue necesario homogeneizar cada tubo con agitador de tipo Vortex durante 1 minuto.

c) Se preparó un par de portaobjetos para soltar con un gotero una gota de muestra sobre un extremo de uno de ellos y deslizarla con el otro para preparar un frotis de manera estándar.

d) Se dejó secar al aire el frotis en laminilla para poder evaluarlo al microscopio.

e) En el microscopio se buscaron grupos de células, primero en objetivo panorámico (10X), después en 40X para finalmente contar los espermatozoides con objetivo y aceite de inmersión (100X).

f) El conteo se realizó a 100 células utilizando un aparato contador de laboratorio.

D. Obtención de muestra de sangre y cuantificación de testosterona sérica mediante técnica de Radio-Inmuno-Análisis en nanogramos en un mililitro.

1. Paralelamente a todos los procedimientos anteriores, se practicaba la obtención de suero de la sangre de los cabritos para realizar posteriormente la determinación de testosterona sérica mediante la prueba de Radio-Inmuno-Análisis:

a) Técnica de obtención de suero:

(1) Se preparaban varios tubos al vacío sin aditivo (de tapón rojo) al vacío con sus respectivas agujas de calibre 21 en una charola plástica, además de masking tape y plumón indeleble para facilitar la identificación de los tubos.

(2) Se procedió a sujetar cada cabrito con una persona montada sobre el lomo y sujetando los cuernos o el mentón con el fin de exponer una vena yugular. De esa manera, con ayuda del equipo de vacío, se procedió a sangrar cada animal, obteniendo una cantidad aproximada de sangre de 8 ml por muestra. Cada muestra fue debidamente identificada con el número de cabrito y fecha de obtención, para posteriormente ser llevadas al laboratorio de Reproducción para dejarlas reposar a temperatura ambiente por 30 minutos.

(3) Una vez listas las muestras, se procedió a centrifugarlas:

(a) Se colocaban en una balanza para equilibrar el peso y poder introducirlas en la centrifuga en forma equilibrada. En caso de no estar equilibradas, se introducían tubos de ensayo adicionales conteniendo agua.

(b) Se centrifugaban a 2500 revoluciones por minuto durante 25 minutos.

(4) Cuando el suero y el coágulo estaban claramente separados dentro

del tubo, se dispuso a obtener la porción sérica usando pipetas Pasteur con tapón de goma de succión.

El suero se depositó en tubos Eppendorf con capacidad de 2 ml (previamente adicionados de 5 µl de Azida de Sodio al 0.02% colocados con pipeta del tipo desplazamiento positivo para 5 µl) y se identificaban también con número de cabrito, fecha y número de muestra en caso de haber hecho muestras apareadas de respaldo.

(5) En cada fecha de obtención de muestras se colocaban las muestras en una bolsa de plástico, que también se identificaba con los mismos datos de los tubos contenidos y se colocaba en un congelador a una temperatura de -3°C.

(6) Al tener todas las muestras esperadas, se les determinaría la cantidad de testosterona sérica por técnica de Radio-Inmuno-Análisis.

b) Técnica para cuantificar testosterona sérica por Radio-Inmuno-Análisis:

(1) Fue realizada en el Laboratorio de Endocrinología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México, en Ciudad Universitaria.

(2) Esta determinación se realizó por medio de un Kit de Radioinmunoensayo de testosterona (conservado entre 2 y 8 °C desde la fecha de elaboración hasta la fecha de su utilización) por ImmuChem™ de ICN para diagnóstico *in vitro* y un medidor de ondas γ existente en dicho laboratorio.

(3) Se adaptó el kit completo a temperatura ambiente.

(4) Se contaron con 200 tubos recubiertos de Anti-testosterona incluidos en el kit que fueron identificados de igual manera que su muestra de

suero correspondiente, excepto los doce primeros tubos, que estaban reservados para el suministro apareado de las soluciones estándar de testosterona. Todos los tubos fueron puestos en gradillas especiales de hule espuma con capacidad para 100 tubos.

(5) Se dispuso de Testosterona-^{125}I contenida en el kit en frascos de 100 ml en forma de solución salina con gelatina buffereada con Fosfato. Con una radioactividad total de 1.3 µCi/52ml y actividad específica de no menos de 1000 µCi/µg.

(6) Los Estándar liofilizados de testosterona (preparados a base de matriz de suero humano adicionado con Sulfato de Gentamicina y Azida de Sodio) fueron reconstituidos según su concentración:

- 0 ng/ml: Fue reconstituido con 1 ml de agua destilada.
- 0.2 ng/ml: Fue reconstituido con 0.5 ml de agua destilada.
- 0.6 ng/ml: Fue reconstituido con 0.5 ml de agua destilada.
- 2.0 ng/ml: Fue reconstituido con 0.5 ml de agua destilada.
- 6.0 ng/ml: Fue reconstituido con 0.5 ml de agua destilada.
- 20 ng/ml: Fue reconstituido con 0.5 ml de agua destilada.

Una vez preparados, fue necesario adaptarlos nuevamente a temperatura ambiente por 15 minutos.

(7) Con una pipeta de liberación exacta de 25 µl se procedió a suministrar con dicho volumen de cada estándar, muestra y control (dos muestras de suero adicionales de concentración conocida) a los tubos recubiertos de Anti-testosterona previamente identificados.

(8) Una vez suministrados los tubos recubiertos de Anti-testosterona, se adicionó a cada tubo 1 ml de Testosterona-^{125}I con una pipeta automática de pistola de liberación exacta de 1 ml.

(9) Ya preparados los tubos, se introdujeron en un incubador de baño de agua de temperatura constante de 37°C por 120 minutos.

(10) Al finalizar el tiempo de incubación los tubos fueron aspirados de su contenido (cada uno en el orden en que fueron llenados) y drenados en un contenedor especial para sustancias radioactivas. Después fueron escurridos en papel absorbente.

(11) Mediante el uso de un contador de rayos γ calibrado para ^{125}I y la ayuda de los tubos impregnados con los estándar, se realizó una curva Estándar.

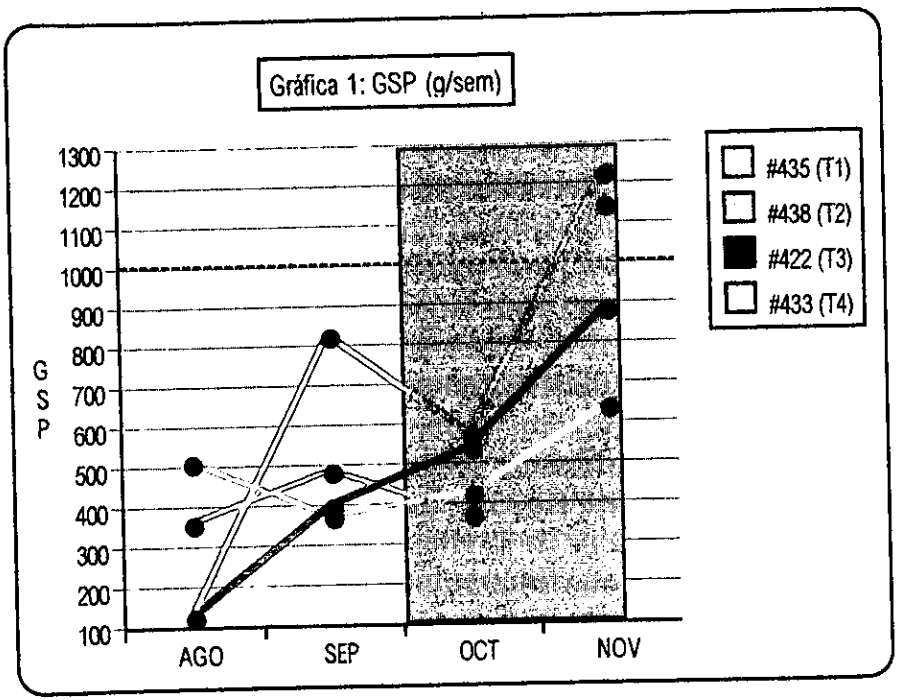
Después se introdujeron 10 tubos en cada lectura, comenzando por los controles y posteriormente las muestras.

(12) Los resultados de testosterona en nanogramos fueron determinados por computadora e impresos en tablas junto con la curva estándar, con un error intra-ensayo menor al 10%.

E. Toda determinación de parámetros se realizó el primer día de tratamiento y se volvió a determinar cada semana durante los 40 días de tratamiento. Después se realizó una evaluación final 15 días después de terminar los 40 días de tratamiento.

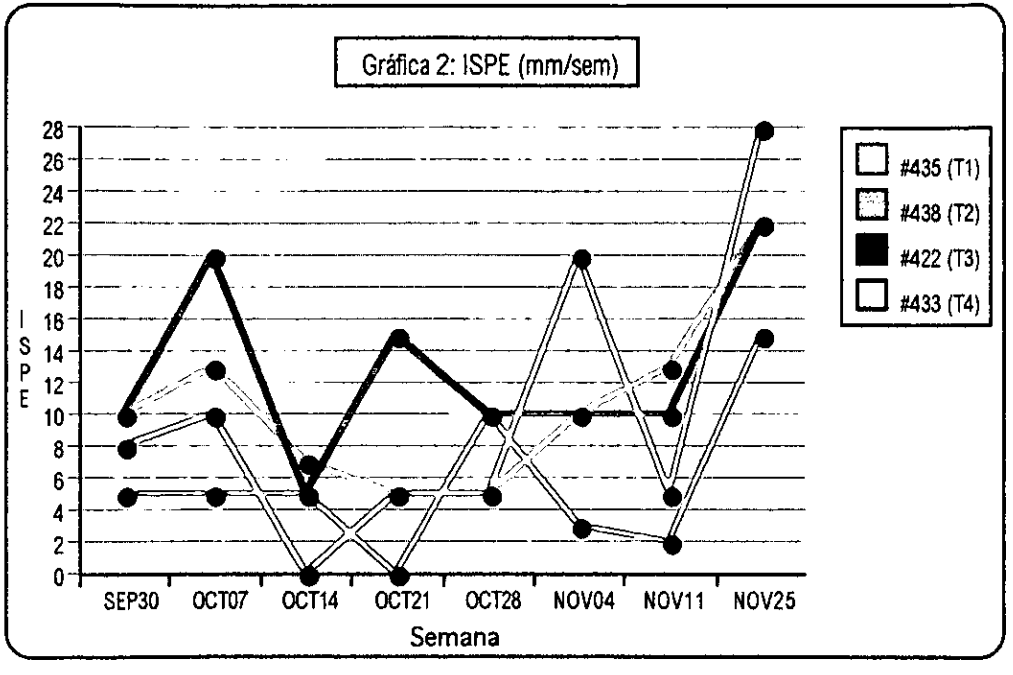
IV. RESULTADOS:

En la gráfica 1 se presentan los datos de la ganancia semanal de peso (GSP) de los cuatro animales experimentales, dados en gramos por semana (g · sem^{-1} o g/sem), desde el mes de Agosto al mes de Noviembre de 1997, donde los animales T4 (tratado con análogo de GnRH) y T3 (tratado con 6 mg de melatonina) tuvieron los mayores incrementos en ganancia semanal de peso al final de la fase experimental, superando ambos los 1000 gramos por semana:



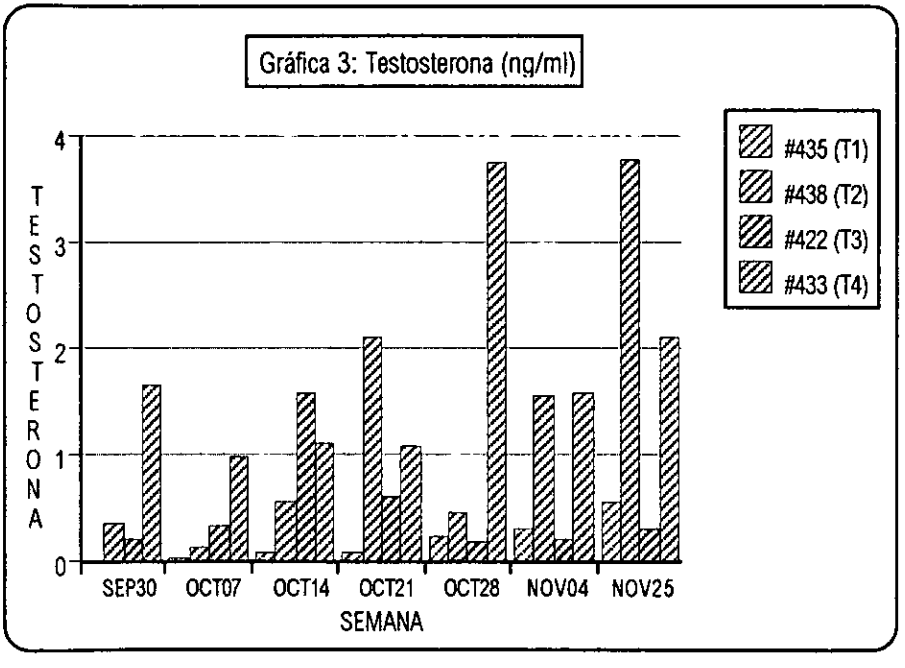
Gráfica 1: Se representan los valores de la ganancia semanal de peso (GSP) de los cuatro animales experimentales. En el eje Y se presenta la GSP en gramos y en el eje X, los meses desde Agosto hasta Noviembre. La linea punteada roja denota la GSP superior o igual a 1000 gramos • $semana^{-1}$. El área sombreada representa la duración de la fase experimental.

En la gráfica 2 se presentan los datos del incremento semanal en perímetro escrotal (ISPE) de los cuatro animales experimentales, dados en milímetros por semana ($mm \cdot sem^{-1}$ o mm/sem), desde la última semana de Septiembre hasta la última semana del mes de Noviembre de 1997. En la última semana el animal T4 (tratado con análogo de GnRH) representa el mayor ISPE, a pesar que, como el resto de los animales, no siga un patrón constante a lo largo de las semanas:



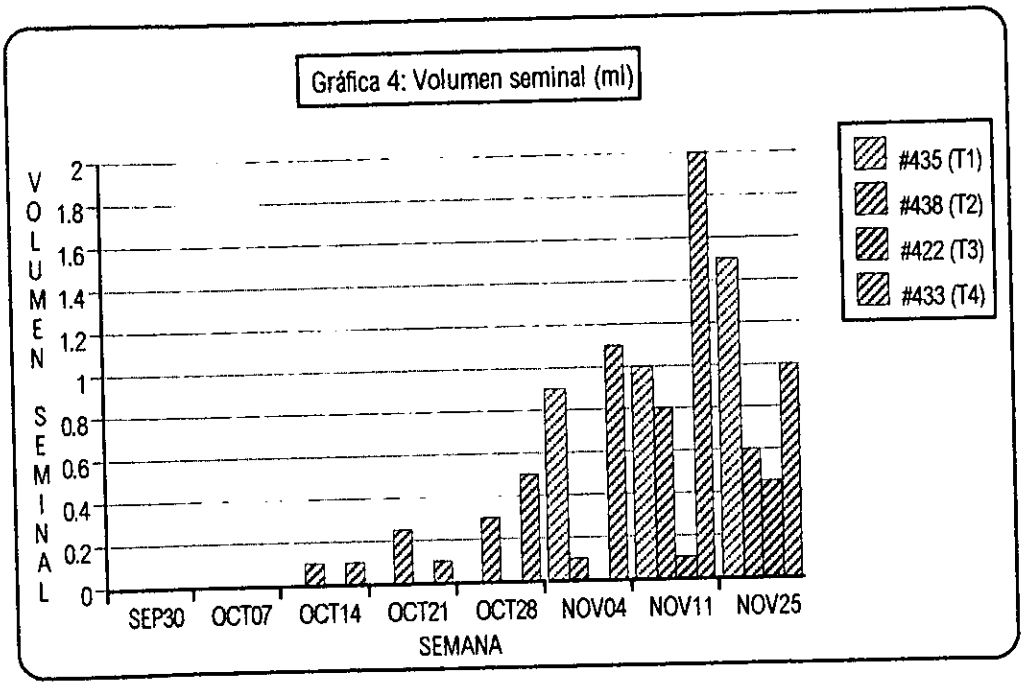
Gráfica 2: Se representan los valores del aumento semanal en perímetro escrotal dado en $mm \cdot sem^{-1}$ para los cuatro animales experimentales. En el eje Y se presenta el ISPE en milímetros y en el eje X, las semanas respectivas.

En la gráfica 3 se presentan los datos para la determinación de testosterona sérica en los cuatro animales experimentales, dados en nanogramos por mililitro ($ng \cdot ml^{-1}$ o ng/ml), desde la última semana de Septiembre hasta la última semana del mes de Noviembre de 1997. Los animales T2 (tratado con 3 mg melatonina) y T4 (tratado con análogo de GnRH) representan los mayores valores de nanogramos de testosterona por mililitro de suero con respecto al resto de los animales, a partir de la tercera semana de Octubre. Además se observa que dichos animales no presentan valores inferiores a un nanogramo de testosterona por mililitro a partir de la misma semana:



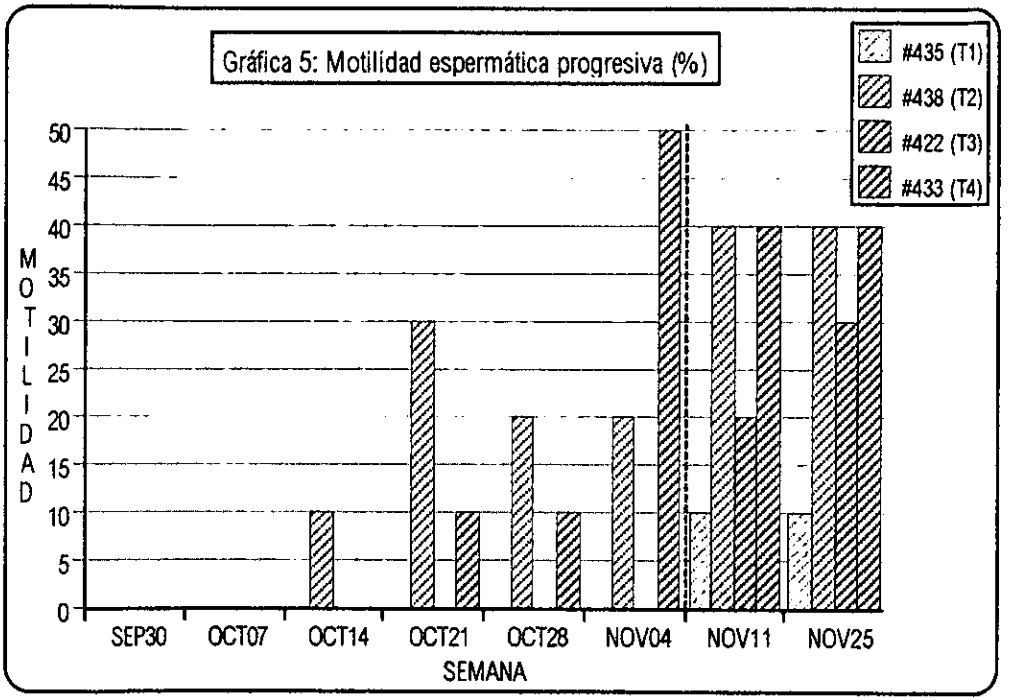
Gráfica 3: Se representan los valores del contenido sérico de testosterona dado en $ng \cdot ml^{-1}$ para los cuatro animales experimentales. En el eje Y se presentan los nanogramos de testosterona y en el eje X, las semanas respectivas.

En la gráfica 4 se presentan los datos para la determinación del volumen seminal en los cuatro animales experimentales, dados en mililitros (ml), desde la última semana de Septiembre hasta la última semana del mes de Noviembre de 1997. En esta gráfica, se señala el momento de la primera eyaculación del animal T1 (control) para indicar que los animales T2 (tratado con 3 mg de melatonina) y T4 (tratado con análogo de GnRH) habían ya presentado eyaculado tres semanas antes. El animal T3 (tratado con 6 mg de melatonina) presentó su primer eyaculado una semana después del animal T1:



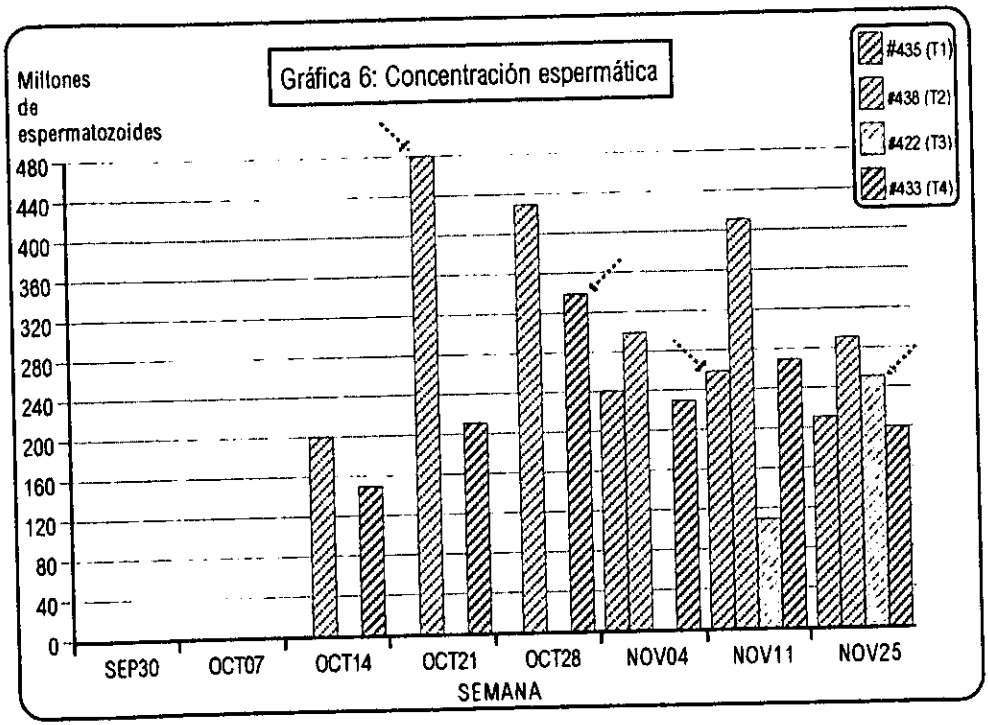
Gráfica 4: Se representan los valores del volumen seminal para los cuatro animales experimentales. En el eje Y se presenta el volumen seminal en ml y en el eje X, las semanas respectivas. La linea punteada roja denota la primera eyaculación del animal control (T1).

En la gráfica 5 se presentan los datos para la determinación de motilidad espermática progresiva en los cuatro animales experimentales, dada en porcentaje (%), desde la última semana de Septiembre hasta la última semana del mes de Noviembre de 1997. En el momento que el animal T1 (control) presenta motilidad espermática progresiva alguna en su eyaculado, el animal T2 (tratado con 3 mg de melatonina) había ya presentado por lo menos el 10 % de motilidad espermática progresiva cuatro semanas antes y el animal T4 (tratado con análogo de GnRH) tres semanas antes:



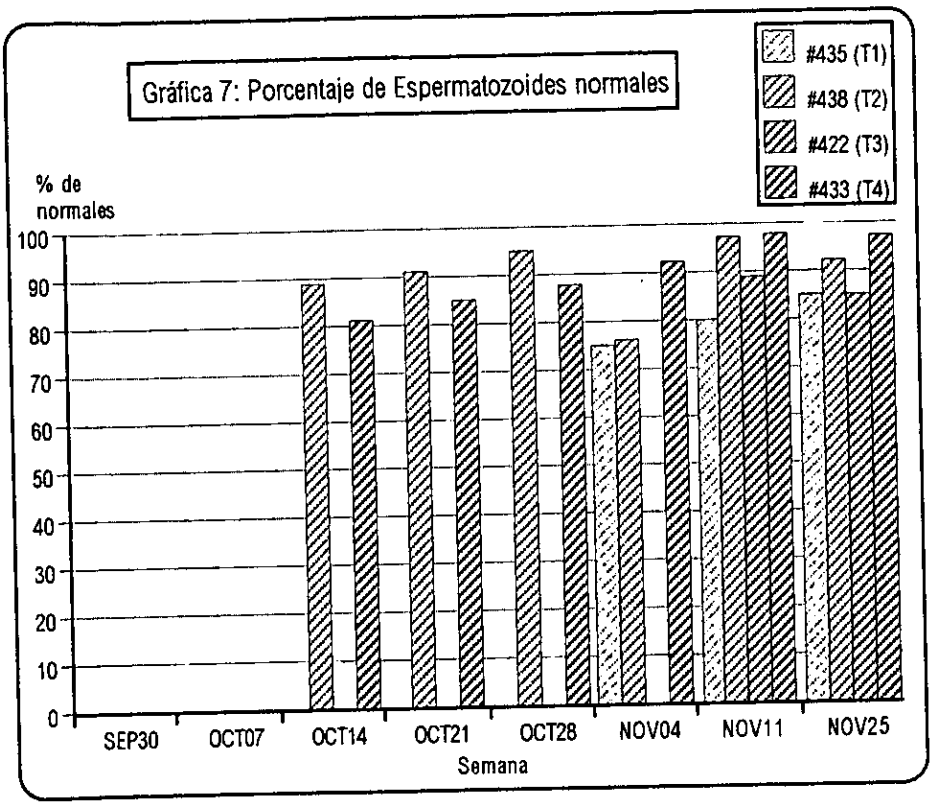
Gráfica 5: Se representan los valores de motilidad espermática progresiva para los cuatro animales experimentales. En el eje Y se presenta la motilidad espermática progresiva en % y en el eje X, las semanas respectivas. La línea punteada roja denota la primera ocasión en que el animal control (T1) presenta motilidad espermática alguna.

En la gráfica 6 se presentan los datos para la determinación de concentración espermática en los cuatro animales experimentales, dada en millones de espermatozoides por mililitro (espermatozoides X 10^6 / ml), desde la última semana de Septiembre hasta la última semana del mes de Noviembre de 1997. Se observa que el animal T2 (tratado con 3 mg de melatonina) presenta la mayor concentración espermática en relación al resto de los animales a partir de la segunda semana de Octubre. También se observa que los animales T2 y T4 (tratado con análogo de GnRH) alcanzan su máximo valor antes que el resto:



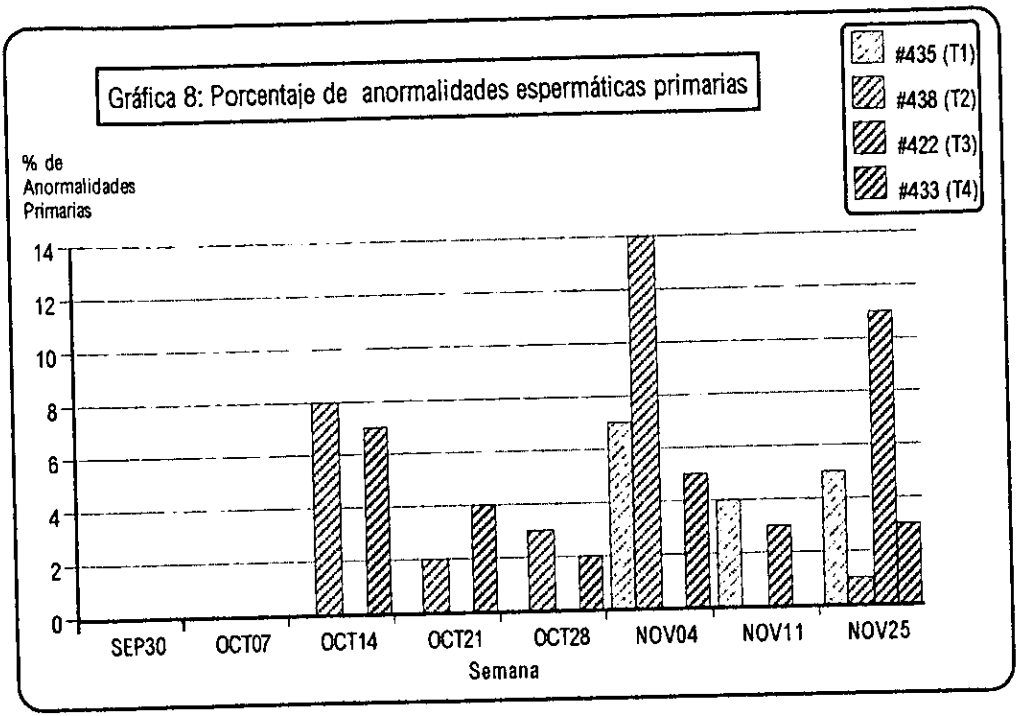
Gráfica 6: Se representan los valores de concentración espermática para los cuatro animales experimentales. En el eje Y se presentan los millones de células por mililitro y en el eje X, las semanas respectivas. Las flechas rojas denotan sendos valores máximos de concentración espermática para los animales durante la fase experimental.

En la gráfica 7 se presentan los datos para la determinación de espermatozoides normales en los cuatro animales experimentales, dada en porcentaje (%), desde la última semana de Septiembre hasta la última semana del mes de Noviembre de 1997. Se observa que tanto el animal T2 (tratado con 3 mg de melatonina), como el animal T4 (tratado con análogo de GnRH), presentan espermatozoides normales en un porcentaje no inferior a 80 % en sus primeras tres colecciónes de semen:



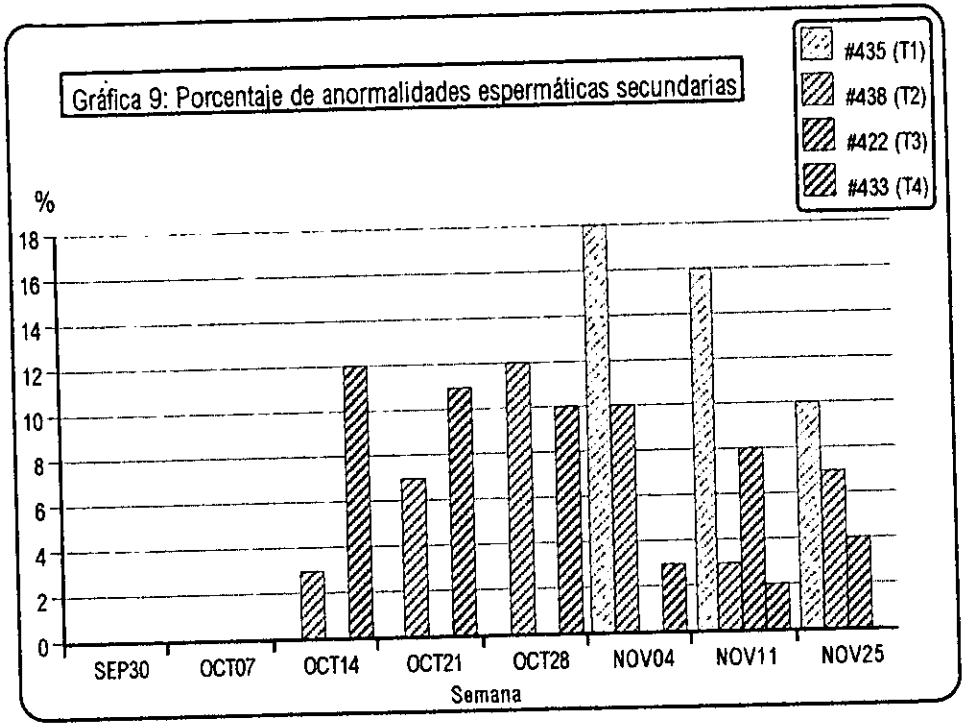
Gráfica 7: Se representan los valores de la determinación de espermatozoides normales para los cuatro animales experimentales, dados en porcentaje. En el eje Y se presenta el porcentaje de espermatozoides normales y en el eje X, las semanas respectivas.

En la gráfica 8 se presentan los datos para la determinación de espermatozoides con anormalidades primarias en los cuatro animales experimentales, dada en porcentaje (%), desde la última semana de Septiembre hasta la última semana del mes de Noviembre de 1997. En esta gráfica no se observa patrón alguno en ninguno de los animales:



Gráfica 8: Se representan los valores de la determinación de anormalidades espermáticas primarias para los cuatro animales experimentales, dados en porcentaje. En el eje Y se presenta el porcentaje de anormalidades espermáticas primarias y en el eje X, las semanas respectivas.

En la gráfica 9 se presentan los datos para la determinación de espermatozoides con anormalidades secundarias en los cuatro animales experimentales, dada en porcentaje (%), desde la última semana de Septiembre hasta la última semana del mes de Noviembre de 1997. En esta gráfica se observa que todos los animales (excepto T2, tratado con 3 mg de melatonina) disminuyen su porcentaje de anormalidades espermáticas secundarias semana tras semana:



Gráfica 9: Se representan los valores de la determinación de anormalidades espermáticas secundarias para los cuatro animales experimentales, dados en porcentaje. En el eje Y se presenta el porcentaje de anormalidades espermáticas secundarias y en el eje X, las semanas respectivas.

V. DISCUSIÓN:

El presente trabajo sirve como ayuda a estudios posteriores, basándose en antecedentes descritos anteriormente sobre los efectos de las hormonas empleadas y sólo se buscó observar los efectos de las mismas para modificar la actividad testicular en animales jóvenes, que a diferencia de las hembras, han sido poco estudiados. Los resultados obtenidos sugieren diferencias entre los animales utilizados, siendo esto útil para sentar bases a posteriores trabajos con mayores grupos experimentales de ambos sexos y para experimentar y corroborar nuestros resultados en diversas épocas del año, desde diversos tiempos a partir del destete y a dosis intermedias de melatonina entre las que fueron usadas en este experimento.

Las observaciones de los experimentos proporcionan una idea de los posibles efectos de los tratamientos hormonales con melatonina a 3 mg (Yang, 1995; Recabarren *et al.*, 1993; Asher *et al.*, 1993) y con GnRH. Las dosis de 0.8 µg de GnRH y de 3 mg de melatonina parecen ejercer un estímulo hormonal cuando aumenta el nivel de testosterona (gráfica 3).

El animal con la dosis de 3 mg de melatonina presentó la pubertad a la tercera semana de tratamiento, esto basándose en las características seminales consideradas definitivas para establecer que se trata de un animal púber (Mukasa *et al.*, 1992). La concentración espermática que se observó en este tratamiento fue la más alta semana a semana, lo que sugiere que el tratamiento con 3 mg de melatonina tiene un mayor efecto sobre las características seminales en comparación con el resto de los tratamientos. Por otro lado, la dosis de 6 mg de melatonina pareció no ayudar, más bien, nos es sugestiva de ser inhibitoria, a pesar de ser también administrada, como ya se ha sugerido antes (Williams y Helliwell, 1993; Asher *et al.*, 1993), poco antes del anochecer.

El animal bajo tratamiento con la hormona GnRH presentó la pubertad (Mukasa *et al.*, 1992) en la cuarta semana de tratamiento, a pesar que se había presentado eyaculado a partir de la tercera (pero dicho

eyaculado tenía motilidad nula y no presentó un mínimo de motilidad de 10% sino hasta la cuarta semana), por lo que también parece atribuirse a este tratamiento la propiedad de inducir la pubertad, aunque en menor medida que en la dosis de 3 mg de melatonina. Por otro lado, el tratamiento con GnRH indujo mayor ganancia de peso y perímetro escrotal, es decir, un mayor efecto anabólico corporal observable sobre todo al final de la etapa experimental, donde junto con el individuo tratado con 3 mg de melatonina, rebasó una ganancia peso corporal de 1000 g/semana en el mes de noviembre.

El animal tratado con dosis de 3 mg de melatonina, al parecer, tuvo mejores resultados que el que fue sometido a dosis de 6 mg de melatonina (Kusakari *et al.*, 1991). Se señala que a cierta dosis la melatonina exógena no ejerce influencia sobre la melatonina endógena (Kusakari *et al.*, 1991). La dosis de 6 mg de melatonina muy probablemente activa un sistema de retroalimentación negativa, bloqueando así, la acción hormonal endógena que puede ser observable al analizar el nivel sérico de testosterona al no presentar incremento significativo, a pesar que represente más del doble que el animal control durante las primeras cuatro semanas de tratamiento; además de que no se observaron efectos sobre otros parámetros. En cuanto al nivel sérico de testosterona, el tratamiento con 6 mg de melatonina no elevó nunca el nivel sérico de testosterona por encima de los 2 ng/ml y el animal control no presentó valores superiores a 1 ng/ml (a diferencia de los tratamientos con 3 mg de melatonina y con GnRH, que elevaron la testosterona por encima de 3 ng/ml durante la fase experimental).

El animal control presentó eyaculación a partir de la sexta semana de la fase experimental, pero no presentó motilidad sino hasta la séptima. Por lo tanto y al igual que el individuo cuyo tratamiento fueron 6 mg de melatonina, no entra en pubertad sino hasta la séptima semana de tratamiento, a diferencia de los tratamientos donde parece inducir la pubertad desde la tercera y cuarta semanas de tratamiento (3 mg de melatonina y 0.8 µg de GnRH, respectivamente), por lo que se podría sugerir que dichos tratamientos adelantaron la pubertad hasta por cuatro semanas, pudiendo dar pie a observaciones futuras de las mismas dosis

Una gran desventaja de este procedimiento experimental es su aplicación práctica, ya que resultaría una gran dificultad el hecho de administrar melatonina por vía oral a cada animal diariamente dentro de un rebaño completo. Pero sería útil este procedimiento para conocer más a cerca de la fisiología endocrina de los pequeños rumiantes estacionales o de aquellos en quienes sea posible manipular la estacionalidad.

VI. CONCLUSIONES:

1. El animal que se trató con 3 mg diarios de melatonina durante 40 días presentó la pubertad cuatro semanas antes en relación con el animal control.

2. La administración de GnRH pareció generar un mayor incremento de peso vivo y perímetro escrotal al final de la fase experimental, además de presentar la pubertad tres semanas antes en relación al individuo control.

3. La administración de 6 mg de melatonina pareció no tener efecto alguno en el animal tratado.

4. La administración oral de manera individual durante 40 días consecutivos no es procedimiento práctico desde el punto de vista de un rebaño comercial. Sin embargo, una aplicación práctica se podría tener una vez que se hagan más estudios y se conozca la mejor hormona, su mecanismo de acción y la mejor dosis a emplear en un número limitado de posibles sementales de alto valor para adelantar su época fértil.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Adam C. L., Robinson J. J. 1994. *The role of nutrition and photoperiod in the timing of puberty.* Proceedings of the Nutrition Society. 53: 1, 89-102.
2. Anwar M. M., Megahed G. A., El-Deeb T. S., Shehata H. S. 1996. *The effect of melatonin on bull liquid semen and enzymatic release in seminal plasma.* Assiut Veterinary Medical Journal. 35: 69, 42-63; 31 ref. Abstract.
3. Arbiza, A. S. I. 1986. *Los caprinos en México.* Producción de caprinos. A.G.T. editores, México. 47-75.
4. Asher G. W., Fisher M. W., Fennessy P. F., Suttie J. M., Webster J. R. 1993. *Manipulation of reproductive seasonality of farmed red deer (Cervus elaphus) and fallow deer (Dama dama) by strategic administration of exogenous melatonin..* Animal Reproduction Science. 33: 1-4, 267-287.
5. Bartness T. J., Goldman B. D. and Bittman E. L. 1991. *SCN lesions block responses to systemic melatonin infusions in adult Syberian hamsters.* American Journal of Physiology. 255: 812-822.
6. Bearden H. J., Fuquay J. W. 1992a. *Natural synchronization processes.* Applied Animal Reproduction. 3ª. edition. Prentice Hall. U.S.A. 39–44.
7. Bearden H. J., Fuquay J. W. 1992b. *Seasonal breeders.* Applied Animal Reproduction. 3ª. edition. Prentice Hall. U.S.A. 62-64.
8. Bearden H. J., Fuquay J. W. 1992c. *Spermatogenesis and maturation of spermatozoa.* Applied Animal Reproduction. 3ª. edition. Prentice Hall. U.S.A. 67-69.
9. Chemineau P. 1993. *Environment and animal reproduction.* World Animal Review. No.77, 2-14. Abstract.
10. Cunningham J. G. 1997. *Reproduction and Lactation.* Textbook of Veterinary Physiology. W. B. Saunders Company. 2ª edition. U. S. A. 446-448.
11. García E. 1973. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen.* Universidad Nacional Autónoma de México.
12. Hancock J. L. 1957. *Chapter VI. Morphology of boar spermatozoa.* Journal of Royal Microbiology Society. U K. Vol. 76. 87-97.
13. INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 1987. *Síntesis geográfica del Estado de México.* 11, 188.
14. Jochle W. and Ross L. D. 1980. *Control of normal reproductive functions in domestic animals.* VEB Gustav Fischer Verlag Jena. German Democratic Republic. 132-182.
15. Kennaway D. J., Rowe S. A., Scaramuzzi R. J. (ed.), Nancarrow C. D. (ed.), Doberska C. 1995. *Melatonin binding sites and their role in seasonal reproduction.* Reproduction in domestic ruminants III. Proceedings of the Fourth International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants, Townsville, Australia, 2-6 October 1994. Journal

of Reproduction and Fertility, Supplement. No. 49, 423-435. Abstract.

16. Kusakari N., Tajima, Y.,Itoh S., Sen-Ha K.,Serikawa S., Hatta T., Ohara M., Mori Y. 1991. *Diurnal changes in plasma melatonin and the timing of reproductive onset in anestrous sheep fed with melatonin.* Journal of Veterinary Medicine Science. U. S. A. 457-461.
17. Maywood E. S., Lyndsday J., Karp J., Powers J. B., Williams L. M., Titchener L., Ebling F. J. P., Herbert J. and Hastings M. H. 1991. *Occlusion of the melatonin-free interval blocks the gonadal response to programmed melatonin infusions in the male Syrian hamster.* Journal of Neuroendocrinology. Vol. 3. Pages: 331-337.
18. McMillen J. C., Nowak R., Walker D. W. and Young J. R. 1990. *Maternal pinealectomy alters the daily pattern of fetal breathing in sheep.* American Journal of Physiology. 258: 284-287.
19. McMillen J. C., Houghton D. C., Young, I. R., Scaramuzzi R. J. (ed.)., Nancarrow (ed.). and Doberska C. 1995. *Melatonin and the development of circadian and seasonal rhytmicity.* Reproduction in domestic rumiants III. Proceedings of the Fourth International Symposium on Reproduction in Domestic Rumiants, Townsville, Australia, 2-6 October 1994. Journal of Reproduction and Fertility Supplement. No. 49; 137-146. Abstract.
20. Misztal T., Romanowicz K., Barcikowski B. 1996. *Seasonal changes of melatonin secretion in relation to the reproductive cycle in sheep.* Journal of Animal and Feed Sciences. 5: 1, 35-48.
21. Mukasa E., Mugerwa E., Ezaz Z. 1992. *Relationship of testicular growth and size to age, body weight and onset of puberty in Menz ram lambs.* Theriogenology. 38: 5, 979-988.
22. Mukasa E., Mugerwa E., Lahlou-Kassi A. 1995. *Reproductive performance and productivity of Menz sheep in the Ethiopian highlands.* Small Ruminant Research. 17: 2, 167-177.
23. Programa de Maestria y Doctorado en Ciencias de la Producción Animal. 1998. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. U. N. A. M. México. 2-3.
24. Recabarren M., Todorovic P., Lobos A, Perez F. R, Parilo V. J. 1993. *Advancing the breeding season and increasing pituitary responses to LHRH by melatonin treatment of anoestrous ewes.* Agro-Ciencia. 1993, 9: 2, 107-111. Abstract.
25. Sweeney T., O'Callaghan D., Aurich C., Aurich J.E., Rath D. 1995. *Physiology of seasonal reproductive transitions in the ewe-regulation by photoperiod and other environmental cues.* Comparative and equine reproductive endocrinology. Proceedings of a workshop held at the Brandenburg State Stud farm, Neustadt-Dosse, Germany, 19-22 July, 1995. Reproduction in Domestic Animals. 30: 4, 178-182.
26. Swenson M. J., Reece W. O. 1993. *Endocrine glands.* Duke's Phyisiology of Domestic Animals. 11th edition. Comstock Publishing Associates. A division of Cornell University Press. U. S. A. 637, 672-675.
27. Trejo A. A. 1986. *Control de la reproducción caprina.* Producción de caprinos de Arbiza. A.G.T. editores, México. 194-207, 242-245.
28. Tucker H. A. 1996. *Photoperiodic regulation of growth. Scientific conference on growth promotion in meat*

production. Proceedings, Brussels, Belgium, 29 November to 1 December 1995. 197-212; 38 ref. Abstract.

29. Williams L. M. and Helliwell R. J. A. 1993. *Melatonin and seasonality in the sheep*. Animal Reproduction Science. 33: 1-4, 159-182.

30. Yang, S. K. 1995. *Effects of long days combined with melatonin administration on velvet production and testicular function in Formosan sika deer*. Journal of the Chinese Society of Animal Science. 1995, 24: 2, 163-180. Abstract.