



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Desarrollo endocrino del eje reproductivo en ovinos de pelo

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS

P R E S E N T A

Luis Javier Montiel Olguín

TUTOR:
Héctor Jiménez Severiano

COMITÉ TUTORAL:
Héctor Raymundo Vera Ávila
Joel Hernández Cerón



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dedicatoria

A mis padres, gracias por la disciplina inculcada por el estudio...

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México a través de la FES-Cuautitlán, por permitirme realizar los estudios de maestría en su honorable institución.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias por permitirme realizar los estudios experimentales en sus instalaciones, por abrirme las puertas y permitirme conocer esta gran institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo mediante la beca económica.

Al Dr. Héctor Jiménez Severiano por el tiempo, consejos y apoyo brindado durante este tiempo.

Al Dr. Héctor Vera y Dr. Joel Hernández por sus comentarios y esfuerzo realizado para la formación de un servidor.

Al Dr. Eugenio Villagómez, MC. Leticia García, MC. Mario Cárdenas y QFB. Patricia Sánchez por el valioso apoyo en la parte de laboratorio.

A ustedes 3, que siempre me han acompañado, ahí estuvieron... lo sentí en todo momento.

Al MC. Vicente Castañeda, MVZ Cristina Huerta y Martín Martínez porque gracias a su compromiso y apoyo en la parte de campo facilitaron mucho mi trabajo.

Al Dr. Javier Valencia, Dra. Teresa Sánchez Torres, Dr. Jaime Gallegos y Dr. Lorenzo Álvarez por sus valiosos comentarios y sugerencias para enriquecer el contenido del escrito de tesis.

A mis profesores por el esfuerzo realizado durante mi formación y por el conocimiento compartido conmigo, muy en especial al Dr. Héctor Vera, MVZ Marco Asprón, MVZ Héctor Rosillo y Dra. Teresa Peña por ser para mí un ejemplo a seguir, tienen toda mi admiración.

Milton Fajardo muchas gracias Sr. facilitaste una de las etapas más pesadas y estuviste al tanto en las otras. Gracias amigo.

Joaquín Sánchez gracias por estar al tanto y por tus palabras de apoyo. Gracias amigo.

Meyli, Mario, Denisse, Germán, Alejandra, Patricia, Anabel, Antonio y Vicente porque de forma directa cambiaron el significado de mi estancia en ese lugar donde los conocí.

A mis padres, mis hermanas y el resto de mi familia por todo su apoyo (en especial en mis momentos de estrés, gracias por comprenderme y tolerarme).

A ti, que compartiste conmigo este tiempo, estuviste al tanto, me escuchaste, me aconsejaste, me tranquilizaste, por tu buena vibra, tu comprensión, tus buenos deseos. Gracias ;-)

Pido mil disculpas por no mencionar completamente a todas aquellas personas que creyeron que era buena idea, que me dieron palabras de aliento, que en general me apoyaron para realizar este trabajo. Si la teoría es cierta, si ustedes no hubieran estado ahí, las cosas no se hubieran dado como sucedieron.

Gracias.

CONTENIDO	Página
Índice de cuadros	I
Índice de figuras.....	II
Resumen.....	III
Abstract	IV
I. Introducción.....	1
1.2. Objetivo general.....	2
1.2.1. Objetivos particulares	2
1.3. Hipótesis	2
II. Revisión de literatura	3
2.1. Eje reproductivo endocrino.....	3
2.1.1. Hipotálamo.....	4
2.1.2. Hipófisis.....	4
2.1.3. Testículos	5
2.1.3.1. Célula de Leydig.....	6
2.1.3.1.1. Origen	6
2.1.3.1.2. Morfología de la célula de Leydig.....	7
2.1.3.1.3. Receptores y regulación.....	9
2.1.3.2. Ontogenia de la esteroidogénesis.....	11
2.1.3.3. Esteroidogénesis	12
2.1.3.4. Célula de Sertoli.....	13
2.1.3.4.1. Origen	13
2.1.3.4.2. Proliferación y diferenciación posnatal	14
2.1.3.4.3. Morfología	15
2.1.3.4.4. Función en la espermatogénesis.....	16
2.1.3.4.5. Proteínas sintetizadas por las células de Sertoli.....	16
2.2. Desarrollo anatómico e histológico testicular del cordero...	17
2.3. Principales hormonas involucradas en el eje reproductivo del macho	18
2.3.1. Hormona Liberadora de las Gonadotropinas (GnRH)	18

2.3.2. Gonadotropinas	18
2.3.2.1. Hormona Luteinizante (LH)	19
2.3.2.2. Hormona Folículo-Estimulante (FSH).....	19
2.3.3. Testosterona	19
2.3.4. Inhibina y Activina	20
2.4. Desarrollo Endocrino del Eje Reproductivo del Macho	21
2.4.1. Desarrollo embrionario de las gónadas.....	21
2.4.2. Desarrollo de células GnRH	22
2.4.3. Diferenciación sexual del hipotálamo.....	25
2.4.4. Inicio de la pubertad.....	27
2.4.5. Perfiles de secreción durante la etapa postnatal, pubertad y vida adulta	27
2.4.6. Factores que intervienen en el inicio de la pubertad ...	29
2.4.6.1. Kisspeptina.....	30
2.4.6.2. Kiss en el inicio de la pubertad	31
III. Materiales y métodos	33
3.1. Condiciones generales	32
3.2. Estudio 1. Desarrollo de los perfiles de LH y testosterona..	33
3.2.1. Animales y condiciones de manejo.....	33
3.2.2. Plan experimental.....	33
3.2.3. Colección de sangre y almacenamiento de muestras ..	34
3.2.4. Análisis hormonal	34
3.2.5. Detección de los pulsos y análisis estadístico.....	35
3.3. Estudio 2. Desarrollo de la respuesta a los desafíos con GnRH	35
3.3.1. Animales y condiciones de manejo.....	35
3.3.2. Plan experimental.....	35
3.3.3. Desafío con GnRH y colección de muestras sanguíneas	36
3.3.4. Análisis hormonal	36
3.3.5. Análisis de la respuesta hormonal a la administración de GnRH y análisis estadístico.....	36
IV. Resultados.....	38

4.1. Estudio 1. Desarrollo de los perfiles de LH y testosterona..	38
4.1.1. Hormona Luteinizante	38
4.1.2. Testosterona	38
4.2. Estudio 2. Desarrollo de la respuesta a la administración de GnRH	39
4.2.1. Hormona Luteinizante	39
4.2.1.1. Altura máxima de la secreción de LH después de la administración de GnRH.....	39
4.2.1.2. Área bajo la curva de respuesta de LH después de la administración de GnRH.....	41
4.2.1.3. Magnitud de la respuesta (Δ LH) a la administración de GnRH	42
4.2.2. Testosterona	44
4.2.2.1. Altura máxima de la secreción de testosterona después de la administración de GnRH	44
4.2.2.2. Área bajo la curva de respuesta de testosterona después de la administración de GnRH	45
4.2.2.3. Magnitud de la respuesta (Δ Testosterona) a la administración de GnRH.....	46
4.3. Peso y circunferencia escrotal.....	47
V. Discusión.....	48
5.1. Desarrollo de los perfiles de LH y testosterona	48
5.2. Diferencias entre genotipos.....	52
5.3. Sensibilidad durante el desarrollo sexual.....	54
VI. Conclusión	58
VII. Literatura citada.....	59
Anexo A	
Anexo B	
Anexo C	
Anexo D	

Índice de cuadros	Página
Cuadro 1. Promedio \pm EE de las variables de secreción de LH en corderos de pelo.	69
Cuadro 2. Promedio y EE de parámetros de secreción de T en corderos de pelo.	69
Cuadro 3. Efectos e interacciones de las variables analizadas para LH y testosterona.	70
Cuadro 4. Efecto Edad x Genotipo para la variable altura máxima de LH, promedio y EE sin transformar ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).	71
Cuadro 5. Efecto Dosis x Edad para la variable altura máxima de LH, promedio y EE sin transformar ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).	71
Cuadro 6. Efecto Dosis x Edad para la variable área bajo la curva de LH, promedio y EE sin transformar ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot 3\text{ h}^{-1}$).	72
Cuadro 7. Efecto Edad x Genotipo para la variable ΔLH , promedio y EE sin transformar ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).	72
Cuadro 8. Efecto Dosis x Edad para la variable ΔLH , promedio y EE sin transformar ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).	73
Cuadro 9. Efecto Dosis x Edad para la variable altura máxima de testosterona, promedio y EE sin transformar ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).	73
Cuadro 10. Efecto Dosis x Edad para la variable área bajo la curva de testosterona, promedio y EE sin transformar ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot 3\text{h}^{-1}$).	74
Cuadro 11. Efecto Dosis x Edad para la variable $\Delta\text{Testosterona}$, promedio y EE sin transformar ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).	74

Índice de figuras	Página
Figura 1. Biosíntesis de esteroides en las células de Leydig.	75
Figura 2. Efecto de Edad x Genotipo para la variable altura máxima de LH en respuesta a la administración de GnRH.	76
Figura 3. Efecto de Genotipo x Dosis para la variable altura máxima de LH en respuesta a la administración de GnRH.	76
Figura 4. Efecto de Edad para la variable altura máxima de LH en respuesta a la administración de GnRH.	77
Figura 5. Efecto de Genotipo x Dosis para la variable área bajo la curva de LH en respuesta a la administración de GnRH.	77
Figura 6. Efecto de Edad para la variable área bajo la curva de LH en respuesta a la administración de GnRH.	78
Figura 7. Efecto de Genotipo x Dosis para la variable Δ LH en respuesta a la administración de GnRH.	78
Figura 8. Efecto de Genotipo x Edad para la variable Δ LH en respuesta a la administración de GnRH.	79
Figura 9. Efecto de Edad para la variable Δ LH en respuesta a la administración de GnRH.	79
Figura 10. Efecto de Edad para la variable altura máxima de T en respuesta a la administración de GnRH.	80
Figura 11. Efecto de la Edad para la variable área bajo la curva de T en respuesta a la administración de GnRH.	80
Figura 12. Efecto de Edad para la variable Δ T en respuesta a la administración de GnRH.	81
Figura 13. Peso corporal de corderos Blackbelly, Pelibuey y sus cruza desde las 2 hasta las 24 semanas de edad.	81
Figura 14. Circunferencia escrotal de corderos Blackbelly, Pelibuey y sus cruza desde las 4 hasta las 24 semanas de vida.	82

RESUMEN

Los objetivos fueron caracterizar los perfiles de secreción de LH y testosterona (T) (estudio 1) y la respuesta a la administración de GnRH (estudio 2) en corderos de dos razas de pelo y sus cruzas durante el desarrollo postnatal. Los estudios se llevaron a cabo en el estado de Querétaro (20°43'N, 100°15'O). Para el primer estudio se utilizaron 17 corderos nacidos en Marzo, de las razas BlackBelly (n=4), Pelibuey (n=5) y sus cruzas recíprocas (n=8). Durante la lactancia se les ofreció en una trampa para corderos alimento con 13.04% de proteína cruda (PC) y 2.33% de energía metabolizable (EM) y posterior al destete una dieta con 14.05% de PC y 2.65% de EM *ad libitum*. A las 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 semanas de vida se registró la circunferencia escrotal y el peso y se colectaron muestras de sangre cada 15 minutos durante 6 horas. Las variables endocrinas evaluadas fueron las concentraciones promedio y basal, la frecuencia, amplitud y altura de los pulsos de LH y T. No hubo diferencia significativa entre genotipos a ninguna de las edades para ninguna de las variables de LH y T analizadas ($P > 0.05$). El efecto edad fue significativo ($P < 0.05$). La concentración promedio de LH más baja fue en la semana 2 de edad ($P < 0.05$), una elevación fue detectada en la semana 4 ($P < 0.05$), posteriormente hubo un aumento progresivo alcanzando el promedio más alto en la semana 12 para después disminuir en la semana 16 ($P < 0.05$), en la semana 24 hubo nuevamente un incremento ($P < 0.05$). La concentración promedio de T aumentó entre las semanas 2 y 16 ($P < 0.05$), pero entre las semana 16 y 20 no hubo diferencia ($P > 0.05$), en la semana 24 nuevamente hubo un último incremento alcanzándose la máxima concentración promedio. Para el segundo estudio se utilizaron doce corderos nacidos entre el 29 de octubre y el 14 de noviembre, las condiciones de manejo y alimentación fueron similares a las mencionadas para el estudio 1. En las semanas 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 se registró el peso y la CE. Además, los animales fueron desafiados con tres dosis diferentes de GnRH, en días consecutivos: 3, 9 y 27 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ de peso vivo, vía endovenosa; se obtuvieron muestras de sangre a -15, 0, +15, +30, +60, +120 y +180 minutos de la administración de GnRH. Las variables evaluadas para LH y T fueron la altura máxima de la secreción posterior a la administración de GnRH, área bajo la curva y magnitud de la respuesta. El genotipo Pelibuey mostró una mayor capacidad de respuesta de LH al estímulo que el genotipo Blackbelly a las semanas 8 y 12 en la mayoría de las variables estudiadas en las dosis de 9 y 27 ng de GnRH; sin embargo, la respuesta de testosterona no fue diferente entre genotipos aunque en general Blackbelly tendió a presentar una menor respuesta. En conclusión, el desarrollo endocrino sexual para estas razas y sus cruzas no fue diferente en cuanto a los perfiles circulantes de LH y testosterona; sin embargo, existe una mayor capacidad de respuesta por parte de la hipófisis en la raza Pelibuey durante un periodo en el cual se presentan cambios importantes en el desarrollo de la función reproductiva de los corderos, lo cual pudiera tener alguna implicación sobre el desempeño sexual en la vida adulta.

Palabras clave: Blackbelly, Pelibuey, Desarrollo sexual, GnRH, LH, testosterona.

ABSTRACT

The objectives were to characterize the profiles of LH and testosterone (T) (Study 1), and the response to GnRH administration (study 2) in lambs of two hair breeds and their reciprocal crosses, during the postnatal development. The studies were conducted in the state of Querétaro (20° 43'N, 100° 15'W). For the first study, 17 march-born ram lambs were used: Blackbelly (n = 4), Pelibuey (n = 5) and their reciprocal crosses (n = 8). During lactation, lambs were creep fed a diet containing 13.04% crude protein (CP) and 2.33% metabolizing energy (ME); after weaning they were offered a diet with 14.05% CP and 2.65% ME ad libitum. At 2, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 weeks of age scrotal circumference (SC) and body weight (BW) were recorded, and blood samples were collected every 15 minutes for 6 hours. Endocrine variables evaluated were mean and basal concentrations, and frequency, amplitude and height of LH and T pulses. No significant differences among genotypes were detected at any age for any of the LH or T variables analyzed ($P > 0.05$), only the effect of age was significant ($P < 0.05$). The smallest mean concentration of LH was detected on Week 2 ($P < 0.05$), then a constant increase occurred from Weeks 4 to 12 ($P < 0.05$), followed by a decrease on week 16 ($P < 0.05$), and a new increase on Week 24 ($P < 0.05$). The mean concentration of T increased from Weeks 2 to 16 ($P < 0.05$), no difference was detected on Week 20 ($P > 0.05$), and on Week 24 T concentration increased again, reaching the maximum value. For the second study, 12 november-born ram lambs were used (4 lambs/genotype), which were maintained under the same conditions as described for the study 1. On weeks 2, 4, 8, 12, 16, 20 and 24, BW and SC were recorded. In addition, three different doses of GnRH, on consecutive days were administered: 3, 9 and 27 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ body weight, via i.v. Blood samples were obtained at -15, 0, +15, +30, +60, +120 and +180 minutes from GnRH administration. The variables of response evaluated for LH and T were the highest concentration after administration of GnRH, the area under the curve and magnitude of the response. For most of the LH variables studied, Pelibuey ram lambs showed a greater GnRH-stimulated response, as compared with Blackbelly lambs on weeks 8 and 12 at the 9 and 27 ng doses. No differences among genotypes were detected for T response; however, Blackbelly lambs tended to have a smaller response. In conclusion, the sexual endocrine development for ram lambs of the genotypes evaluated was not different in the characteristics of the circulating profiles of LH and T. However, it appears that the pituitary of Pelibuey ram lambs has a greater capacity of response to GnRH, during a period when important changes of the reproductive development occur, which might have some implication on the future sexual performance of the rams, during the adult life.

Keywords: Blackbelly, Pelibuey, sexual development, GnRH, LH, testosterone.

I. Introducción

Diferentes aspectos del desarrollo endocrino sexual han sido descritos en machos de razas de lana (Lucas *et al.*, 1983; Echternkamp y Lunstra, 1984; Rawlings *et al.*, 1991), mientras que en las razas de pelo este tipo de información es casi inexistente.

Existen reportes que indican que los cambios anatómicos e histológicos durante el desarrollo prepuberal están asociados a cambios endocrinos, además, por estudios realizados en corderos de lana se sabe que existe un eje reproductivo funcional en corderos recién nacidos (Lee *et al.*, 1976a; Savoie *et al.*, 1979) y que existe un proceso de maduración del eje reproductivo (Savoie *et al.*, 1979; Echternkamp y Lunstra, 1984) pero este proceso de maduración es diferente entre razas siendo unas más precoces que otras. Se ha encontrado que la precocidad está muy relacionada con la fertilidad y prolificidad de la raza en el adulto (Glatzel, 1988).

Los ovinos de pelo han tomado gran auge en México durante los últimos años, debido principalmente a sus características reproductivas y a su capacidad de adaptación a climas diversos. Entre las razas de pelo más importantes en México están la Pelibuey y la Blackbelly. Algunas de sus características reproductivas han sido descritas, tanto en hembras como en machos. La raza Blackbelly es considerada como una de las más prolíficas en México. A pesar de que mundialmente la Pelibuey no es considerada como raza altamente prolífica, el número de corderos por parto es mayor que el de otras razas criadas en México (Young *et al.*, 1996). En estudios comparativos en hembras entre estas dos razas, se han encontrado diferencias en la edad y peso a la pubertad, se sabe que la hembra Blackbelly es más prolífica y más precoz que la Pelibuey (González *et al.*, 1991; Velázquez *et al.*, 1994), pero no se ha estudiado lo referente a precocidad en los machos de estas razas.

En los ovinos de pelo se desconoce el proceso de maduración endocrino del eje reproductivo y podría ser inadecuado extrapolar información generada en borregos de lana para el manejo de los futuros sementales. Como ya se mencionó estas razas de pelo son importantes en México, y la generación de conocimiento que nos pueda ayudar a entender el comportamiento reproductivo de estas razas nos permitirá aprovecharlas de mejor manera en un futuro.

1.2 Objetivo general

Caracterizar el desarrollo endocrino en corderos Blackbelly, Pelibuey y sus cruzas para identificar posibles diferencias entre estos.

1.2.1 Objetivos particulares

Caracterizar el desarrollo de los perfiles circulantes de LH y testosterona en corderos Blackbelly, Pelibuey y sus cruzas.

Caracterizar la capacidad de respuesta a la administración de GnRH en corderos Blackbelly, Pelibuey y sus cruzas.

1.3 Hipótesis

El desarrollo endocrino sexual de los machos es diferente entre Blackbelly y Pelibuey, ocurriendo más prontamente en la raza Blackbelly.

II. Revisión de literatura

2.1 Eje reproductivo endocrino

El eje reproductivo endocrino o eje hipotálamo-hipófisis-gonadal comprende a tres órganos principales, hipotálamo, hipófisis y gónadas, en un ciclo de retroalimentación negativo bajo el cual funciona este eje en el macho (Senger, 2003). Comprende de manera general en principio al hipotálamo con las neuronas secretoras de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), organizadas en un “*continuum*”, como evidencia de su migración fetal a lo largo de un eje que se extiende desde los bulbos olfatorios al núcleo septal medial, la banda diagonal de Broca y el área pre óptica medial (Herbison, 1994), estas neuronas se encuentran constantemente recibiendo información proveniente del medio interno y externo por medio de otras neuronas que hacen sinapsis con ellas, dicha información es interpretada de tal manera que el impulso recibido puede tener un efecto positivo o negativo sobre la secreción de GnRH (Herbison, 1994). Una vez consensuada la información recibida, se da la secreción de la hormona hacia el sistema porta, donde la adenohipófisis, y específicamente los gonadotropos (células encargadas de producir y secretar gonadotropinas) reciben la señal y como respuesta se produce un pulso de hormona luteinizante (LH) o LH y hormona folículo estimulante (FSH). Este pulso liberado hacia torrente sanguíneo viaja como señal endocrina para llegar al siguiente eslabón del eje, los testículos.

Un pulso como tal de LH estimula a las células de Leydig para la producción de testosterona (Rajaniemi *et al.*, 1989), mientras que la FSH se encarga de estimular a las células de Sertoli de una forma más compleja (como se menciona en el apartado de La célula de Sertoli). Con un incremento en la concentración promedio de testosterona (T) producto de repetidos pulsos de LH en un periodo determinado, el cierre del ciclo del eje reproductivo corre a cargo de los andrógenos, los que a nivel central se encargan de retroalimentar de forma negativa la secreción de GnRH por medio de señales transinápticas (Herbison, 1994). La consecuencia de este hecho es una autorregulación. Existen otros dos circuitos, el que se acaba de describir es el ciclo largo, el segundo circuito es el ciclo corto; hipotálamo-hipófisis y el ciclo paracrino o extra corto que comprende los túbulos seminíferos y el tejido intersticial. Estos otros ciclos no menos

importantes se refieren básicamente a ciclos de regulación a niveles cercanos entre órganos o el mismo órgano sin la necesidad de realizar el ciclo largo para autorregularse.

2.1.1. Hipotálamo

El hipotálamo es una de las regiones cerebrales más conservadas y esenciales de los mamíferos (Cone *et al.*, 2003). Sin lugar a dudas, el hipotálamo es la estructura cerebral principal encargada de mantener la homeostasis. El hipotálamo es también el control neural central de las hormonas reproductivas, la clave principal en su función está en que recibe señales del ambiente externo (luz, dolor, temperatura, olores), a través de los sentidos, e información del ambiente interno (presión sanguínea, osmolaridad de la sangre, niveles de glucosa sanguínea) (Cone *et al.*, 2003). Además, con particular relevancia en el control neuroendocrino, varias hormonas (glucocorticoides, estrógenos, testosterona, hormonas tiroideas), ejercen un efecto de retroalimentación directamente sobre este órgano. El hipotálamo integra éstas señales y provee respuestas coordinadas a través de la secreción de hormonas para regular sitios clave. Esto incluye a la glándula hipófisis, la corteza cerebral, neuronas motoras y promotoras en el cerebro y espina dorsal, y neuronas pre ganglionares autónomas (simpáticas y parasimpáticas). Para el caso específico de la regulación endocrina reproductiva son de suma importancia los axones de las células que producen GnRH, los que se extienden hacia una red capilar especial en el tallo de la adenohipófisis o infundíbulo (Senger, 2003). Esta red capilar constituye el sistema porta hipotálamo-hipofisiario. Los botones terminales de neuronas hipotalámicas liberan péptidos que entran al sistema capilar para llegar a la hipófisis.

2.1.2. Hipófisis

La glándula hipófisis también llamada pituitaria, está ubicada en la silla turca del hueso esfenoides (Berne *et al.*, 2004), puede ser dividida en dos partes debido a su naturaleza histológica; adenohipófisis y neurohipófisis, la neurohipófisis es una extensión del hipotálamo donde se encuentran axones de neuronas productoras de oxitocina y de la hormona antidiurética, mientras que la adenohipófisis es la parte con tejido glandular y sintetiza y secreta 6 hormonas: LH, FSH, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), prolactina (PL) y hormona del crecimiento

(GH) (Cone *et al.*, 2003). La hipófisis es regulada por tres tipos de señales: a) hipotalámicas (GnRH por ejemplo), b) efectos de retroalimentación de hormonas circulantes (inhibina y activina por ejemplo) y c) secreciones paracrinas y autocrinas.

2.1.3. Testículos

Los testículos son órganos sexuales primarios, están situados fuera de la cavidad abdominal y su función principal es la producción de espermatozoides (función exocrina) (Borland *et al.*, 1984; Herrera-Alarcón *et al.*, 2007) y la producción de hormonas esteroideas (función endocrina) (Saez, 1994; Granner, 2001). Macroscópicamente se identifican dos estructuras; la túnica albugínea o túnica vaginal propia, la cual se encuentra recubriendo la gónada y el parénquima testicular en el cual se encuentran los túbulos seminíferos. La túnica albugínea es una membrana fibrosa que envía proyecciones hacia el interior de los testículos que sirven como sostén para el parénquima testicular, el cual aloja a los túbulos seminíferos, en donde las espermatogonias sufren cambios hasta transformarse en espermatozoides (Senger, 2003). Éstos, una vez producidos, llegan a los conductos eferentes, los cuales llevan a los espermatozoides hacia el epidídimo.

La posición de los testículos en el escroto y la dirección de su eje longitudinal en relación con el cuerpo, varía con las especies. En los rumiantes son pendulosos con su eje longitudinal en posición vertical (Hafez *et al.*, 2000). El escroto además de proteger al testículo, ayuda por medio de su túnica dartos, junto con el músculo cremáster y la disposición anatómica de la vena espermática del plexo pampiniforme a mantener una temperatura adecuada (3°C menos que la temperatura corporal) para que pueda llevarse a cabo la espermatogénesis.

Microscópicamente los testículos están organizados por los túbulos seminíferos, dentro de los cuales se lleva a cabo la espermatogénesis (Samuelson, 2007). Dentro de los túbulos se encuentran las células de Sertoli y células germinales (en diferentes grados de maduración); fuera de los túbulos en el espacio intersticial, se encuentran el tejido y fluido intersticial, el primero compuesto por vasos sanguíneos, linfáticos y células de Leydig. Cada túbulo seminífero termina en un túbulo recto, en conjunto forman la *rete*

testis, formando ya un solo túbulo con el que se inicia el conducto del epidídimo (Samuelson, 2007).

2.1.3.1. Célula de Leydig

Los andrógenos son parte importante para el desarrollo y función del organismo, las células de Leydig, también llamadas células intersticiales, son la mayor fuente de andrógenos en el macho ovino (Schanbacher, 1980), al igual que en todos los mamíferos, y es secretada en respuesta al estímulo de la pituitaria (LH), se encuentran ubicadas en el intersticio del parénquima testicular entre los túbulos seminíferos.

El funcionamiento apropiado de las gónadas es crucial para la reproducción y, por lo tanto, para la supervivencia de las especies. Las hormonas gonadales tienen otras funciones importantes; por ejemplo, efecto anabólico, requerido para el mantenimiento del metabolismo en la piel, huesos y músculos.

2.1.3.1.1. Origen

En cuanto al origen de las células de Leydig en el ovino, pueden clasificarse de la siguiente manera: desarrollo de las células fetales de Leydig y células de Leydig originadas durante el desarrollo puberal que conformarán la población adulta.

En el ovino como en los demás mamíferos, la función esteroideogénica de las células de Leydig es muy activa en etapas fetales debido a la importancia que tiene la testosterona para masculinizar al feto, el análisis ultraestructural de los testículos fetales muestra una gran cantidad de células intersticiales mesenquimatosas localizadas entre los cordones seminíferos, las células de Leydig son células mesenquimatosas diferenciadas localizadas en las crestas genitales durante el desarrollo embrionario temprano (Handagama y Ariyaratne, 2001). Esta generación de células de Leydig fetales desaparece en el periodo alrededor del parto, pero no en su totalidad, algunas (muy pocas) pueden mantenerse hasta la vida adulta (Gnessi *et al.*, 1997).

Posterior al parto, surge una nueva generación de células de Leydig originadas a partir de la diferenciación de fibroblastos intersticiales o células mesenquimatosas (que son estimuladas por la LH para este efecto), originando así la población de células de

Leydig que se mantendrán durante la vida adulta (Gnessi *et al.*, 1997; Handagama y Ariyaratne, 2001).

Al parecer la FSH tiene también un papel importante en el desarrollo de las células de Leydig adultas, ya que el tratamiento con FSH induce hipertrofia e hiperplasia de células intersticiales que se transforman en células de Leydig maduras (Handagama y Ariyaratne, 2001).

2.1.3.1.2. Morfología de la célula de Leydig.

Las células de Leydig se encuentran en el intersticio testicular, el cual está compuesto también por macrófagos, fibroblastos y vasos sanguíneos (Gnessi *et al.*, 1997; Hutson, 2006), todas estas estructuras están embebidas en la matriz extracelular. Las células de Leydig son de forma redondeada u oval y en casos en que células se encuentran más cerca de vasos sanguíneos muestra una forma más bien elíptica (Samuelson, 2007).

El organelo dominante presente en el citoplasma en las células de Leydig es el retículo endoplásmico liso, el cual provee sitios de unión en su superficie para numerosas enzimas necesarias para la esteroidogénesis, el área de superficie del retículo endoplásmico liso es vasta y la forma más común consiste en una red aleatoria de túbulos interconectados. Se sabe que el colesterol sufre un corte en su cadena lateral (Stoccio y Breslow, 2004) en las mitocondrias en la superficie de la cisterna, la cual exhibe varios perfiles que van desde una forma foliada, tubular o formas intermedias. La capacidad de las células de Leydig para elevar la esteroidogénesis hasta 100 veces en unos cuantos minutos después de la estimulación es dependiente de la importación de colesterol de la membrana externa a la interna, un proceso regulado por la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) (Stoccio y Breslow, 2004), sus detalles son mencionados en el apartado de Esteroidogénesis.

Estas células tienen un núcleo colocado excéntricamente, la heterocromatina asociada con la envoltura nuclear es una característica universal de esta célula, el nucleolo es generalmente conspicuo, incluye el nucleolema y áreas densas granulares y área amorfas. El número de inclusiones de lípidos en células de Leydig varía entre especies e incluso entre secciones de un mismo individuo sugiriendo un grado variable de actividad

funcional (Samuelson, 2007). En la mayoría de las especies, las células de Leydig no exhiben gránulos secretorios típicos o vacuolas en el citoplasma.

Los lisosomas son comúnmente observados, estos organelos tienen un diámetro de alrededor de 0.5 micras de diámetro, rodeados por una sola membrana mostrando perfiles circulares o irregulares.

Los peroxisomas también son encontrados en estas células, con un diámetro aproximado de 0.2 micras de diámetro. Estos organelos contienen catalasas y oxidasas, y aunque incrementan en número después de un estímulo con LH (Klinefelter *et al.*, 1987), su función no ha sido establecida. La relación entre la capacidad secretora de testosterona y los organelos celulares tiene una correlación positiva con la cantidad de peroxisomas presentes en la célula (Kerr *et al.*, 1994). La estimulación de las células de Leydig con LH es seguida por un rápido aumento de 3 a 4 veces en el número total de peroxisomas mientras que los otros organelos se mantienen sin cambios. Los peroxisomas contienen proteínas acarreadoras de esteroides por lo que están involucradas con el transporte de colesterol hacia la membrana mitocondrial interna para el subsecuente corte de la cadena lateral.

Los centriolos por momentos se encuentran asociados con el aparato de Golgi. Los microtúbulos y filamentos también están presentes en esta célula (Banks, 1996). El área de superficie de la membrana plasmática de esta célula es muy amplia debido a las extensivas proyecciones de filopodia y microvellosidades (Kerr *et al.*, 1994). Las células de Leydig se encuentran muy cerca de otras células de Leydig y ocasionalmente forman uniones entre ellas. Las uniones GAP son frecuentemente observadas donde el espacio intercelular es tan angosto como 2 nm. Estas uniones tienen normalmente un diámetro de 0.2 a 2 micras. Las uniones herméticas o desmosomas de forma general no son consideradas como parte de la histología normal de estas células, aunque desmosomas rudimentarios han sido observados en algunas especies como los caninos (Kerr *et al.*, 1994). Sitios especiales de contacto entre células de Leydig y macrófagos ocurren frecuentemente, los cuales consisten en proyecciones muy cortas del citoplasma de la célula de Leydig que invaginan cerca de los macrófagos, sugiriendo la posibilidad de que una pequeña cantidad de citoplasma de células de Leydig pueden ser endocitadas por los macrófagos (Hutson, 2006).

2.1.3.1.3. Receptores y regulación

La LH es una hormona de vital importancia para las células de Leydig, y es también la hormona que mayor efecto tiene en regular la esteroidogénesis testicular (Desjardins, 1981). Debido a la presencia de receptores a esta hormona es como se regula la actividad, la respuesta al estímulo de LH depende también de la cantidad de receptores presentes y su funcionalidad, además de la presencia de enzimas esteroidogénicas (Berardinelli *et al.*, 1984; Yarney y Sanford, 1989; Sanford y Baker, 1990; Kerr *et al.*, 1994; Payne y Youngblood, 1995; O'Shaughnessy *et al.*, 2002).

Las hormonas FSH y TSH se unen al receptor de LH aunque con menor afinidad. La estructura del receptor a LH pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G, con 7 dominios transmembranales y regiones ricas en serinas-treoninas (Rajaniemi *et al.*, 1989). El mRNA del receptor a LH es expresado no sólo en los testículos y los ovarios (en células de la teca), sino también en el cerebro y en la tiroides (Kerr *et al.*, 1994).

Los factores involucrados en la biosíntesis y regulación de testosterona por las células de Leydig se presentan a continuación. El colesterol se obtiene de diferentes fuentes: lípidos de baja densidad, lípidos de alta densidad, biosíntesis de colesterol *de novo* y el uso de ésteres de colesterol almacenados en gotas de lípidos. En la célula de Leydig, la fuente predominante de colesterol para la síntesis de esteroides es a partir de síntesis *de novo*. La interacción de la LH con su receptor en la superficie de la célula promueve un aumento en el AMPc intracelular. El aumento en el AMPc resulta en la liberación del ácido araquidónico a partir de fosfolípidos intracelulares y aracidonil-CoA a través de la acción de la fosfolipasa A2 y la tioesterasa acil-CoA conocida como Artista. El ácido araquidónico liberado y la conversión de uno o más de sus metabolitos son requeridos para la biosíntesis de esteroides *de novo*. La combinación de la actividad de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y metabolitos del ácido araquidónico resulta en la síntesis *de novo* de la proteína StAR que rápidamente interactúa con la membrana exterior mitocondrial regulando la transferencia de colesterol de la membrana externa de la mitocondria a la membrana interna de ésta. Es en este momento que por medio de la enzima P450_{scc} el colesterol es convertido a pregnenolona. Es a través de la

actividad del AMPc que se activan factores de transcripción requeridos para la transcripción del gen StAR (Stocco y McPhaul, 1994).

Estudios de la activación de los receptores a LH en la esteroidogénesis implican al AMPc como segundo mensajero, la LH incrementa la actividad de la adenilato ciclase, la proteína cinasa dependiente de AMPc, está presente en las células de Leydig (Saez, 1994) y existe una sinergia en el aumento de testosterona y PKA (Bartke y Voglmayr, 1977). LH es el factor primario requerido para mantener la estructura y función de las células de Leydig, el efecto de la hipofisectomía o la inhibición de la secreción de LH origina la atrofia de las células de Leydig, las cuales pierden la habilidad de secretar testosterona y disminuye el número de receptores de LH por célula (Klinefelter *et al.*, 1987).

La LH es requerida en concentraciones fisiológicas para mantener el número de células de Leydig, los sitios de unión a LH y la respuesta esteroidogénica a la LH, adicionalmente altas dosis de LH inducen las pérdidas de receptores y la actividad esteroidogénica disminuye por la internalización de los receptores (Saez, 1994). Además del proceso de internalización, otros factores que regulan al receptor de LH son la tasa de degradación del receptor y la presencia de mRNA del receptor a LH, esta última es la más importante en la regulación a largo plazo (Saez, 1994).

Una gran cantidad de factores y hormonas son secretados por los diversos tipos celulares presentes en el testículo, se han realizado estudios tratando de identificar el significado de la expresión de estos elementos encontrando que una gran mayoría influyen principalmente en la regulación autocrina y paracrina testicular, a continuación se mencionan algunos de los más importantes.

Se sabe que el factor semejante a la insulina I (IGF-I) tiene un efecto positivo sobre las células de Leydig, el IGF-I es producido por las células de Sertoli y por las células de Leydig, la FSH y la LH incrementan la secreción de este péptido en sus células blanco respectivas (Saez, 1994). El IGF-I tiene un bajo efecto mitógeno sobre las células de Leydig, sin embargo puede potencializar el efecto de LH aumentando el número de sus receptores (Gnessi *et al.*, 1997) así como la actividad y niveles de mRNA de enzimas esteroidogénicas (Payne y Youngblood, 1995).

El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) es producido por las células de Sertoli y su efecto sobre las células de Leydig es negativo disminuyendo el número de

receptores sin afectar la afinidad a la LH (Gnessi *et al.*, 1997). El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) es producido por las células de Leydig, las células de Sertoli, las células germinales y las células peritubulares. La FSH aumenta la expresión de este factor en las células de Sertoli. Las células de Leydig tienen gran afinidad de unión por FGF, mientras que en las células de Sertoli estimula la mitosis y la diferenciación (Saez, 1994), en las células de Leydig disminuye la cantidad de receptores a LH y la cantidad de testosterona producida (Gnessi *et al.*, 1997) disminuyendo la actividad de enzimas esteroidogénicas (Payne y Youngblood, 1995).

La inhibina y la activina son producidas por las células de Leydig y Sertoli, la secreción de éstas hormonas es estimulada en los testículos por la LH y la FSH respectivamente para cada tipo celular, mientras que inhibina estimula la esteroidogénesis, activina tiene un efecto contrario (Gnessi *et al.*, 1997).

La Interleucina I es producida por las células de Leydig, las células de Sertoli y por los macrófagos, su efecto es disminuir el AMPc estimulado por la LH disminuyendo así la producción de testosterona (Saez, 1994). El factor liberador de corticotropinas (CRF) producido por las células de Leydig cuya síntesis es estimulada por la LH disminuye la esteroidogénesis (Saez, 1994). La arginina-vasopresina es producida también por las células de Leydig y las células de Sertoli, tiene un efecto positivo en la esteroidogénesis aguda (Gnessi *et al.*, 1997). Por último, la endotelina producida por las células de Sertoli, cuya expresión es disminuida por FSH, tiene un efecto positivo aumentando la esteroidogénesis (Gnessi *et al.*, 1997).

2.1.3.2. Ontogenia de la esteroidogénesis

Las principales hormonas esteroideas secretadas por los testículos son los andrógenos, siendo la testosterona la más importante. La conversión de colesterol a testosterona comprende tres hidroxilaciones, dos cortes, dos deshidrogenaciones (3β y 17β) y una isomerización (Saez, 1994; Granner, 2001).

La diferenciación sexual en el ovino ocurre alrededor del día 30 a 32 de la vida fetal (Quirke *et al.*, 2001), y la esteroidogénesis comienza en la gónada fetal en este momento (Desjardins, 1981), como ya se mencionó, los andrógenos son necesarios para el proceso de masculinización (George y Wilson, 1994), como se verá en el siguiente

apartado, para que se lleve a cabo la esteroidogénesis son necesarias enzimas, de las cuales, la expresión de StAR, la 3- β hidroxisteroide deshidrogenasa (3- β HSD) y la P450 esteroide hidroxilasa es regulada por un receptor huérfano llamado factor esteroidogénico 1 (SF-1) (Payne y Youngblood, 1995; Parker y Schimmer, 1997). En testículos fetales de borregos, la androstenediona y la testosterona están presentes alrededor del día 30 de la vida fetal (Quirke *et al.*, 2001; Juengel *et al.*, 2002) y por medio de inmunohistoquímica, se ha demostrado la presencia de 3 β HSD en células de Leydig fetales antes y después de la formación de los cordones seminíferos (Quirke *et al.*, 2001).

2.1.3.3. Esteroidogénesis

Todos los andrógenos testiculares son formados y secretados por las células de Leydig (Rajaniemi *et al.*, 1989), las cuales tienen receptores a LH cuya estructura es similar a otros receptores acoplados a proteínas G existentes que contienen siete dominios transmembranales y una región citoplásmica rica en serinas/treoninas susceptible a fosforilación (Rajaniemi *et al.*, 1989; Granner, 2001), una vez activados los receptores estimulan a la adenilato ciclasa y el resultado es un aumento en la producción de AMP cíclico. El AMP cíclico entonces actúa como segundo mensajero para estimular la producción de esteroides (Granner, 2001). Varias vías de señalización pueden causar la activación de diferentes clases de proteínas cinasas, que a su vez alterarán el estado de fosforilación de proteínas específicas. Algunas de estas fosfoproteínas pueden regular la síntesis de proteínas a nivel ribosomal de manera rápida, mientras que la regulación nuclear se da por regulación de la expresión génica. Para la regulación aguda de la esteroidogénesis en células de Leydig, es necesaria la síntesis de proteínas para mantener un 'pool' y puedan activarse vía fosforilación, de esta manera encontramos que LH tiene un efecto a corto plazo en la fosforilación de proteínas y a mediano-largo plazo al estimular la síntesis de las proteínas que actúan en el efecto agudo (Payne y Youngblood, 1995).

La regulación de la síntesis de testosterona en los testículos se lleva a cabo por el aporte de colesterol por diferentes vías. Este es acarreado hacia la membrana de la mitocondria por su transportador activo la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR, por sus siglas en inglés) (Stoccio, 1997; Stoccio *et al.*, 2004),

posteriormente la cadena lateral del colesterol es cortada al interior de la mitocondria por la enzima P450_{scc}, este primer paso, la conversión de colesterol a pregnenolona y aldehído isocaproico, es el paso limitante de la tasa de síntesis y toma lugar en la mitocondria (Stoccio *et al.*, 2004) resultando en la formación de pregnenolona. Las glándulas adrenales y los testículos tienen una vía común para la síntesis de esteroides hasta la formación de androstenediona. Sólo en los testículos la testosterona es formada a partir de la androstenediona por la enzima 17 β hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 3 o a partir del androstenediol por la 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa (Granner, 2001) (Figura 1).

2.1.3.4. Célula de Sertoli

La función de las células de Sertoli en la espermatogénesis fue planteada desde un principio con base a la estrecha relación anatómica con las células germinales. En mamíferos, desde el desarrollo prenatal hasta el inicio de la meiosis y la producción de los gametos, la interrelación entre las células de Sertoli y las células germinales es importante y aparentemente obligatoria (Griswold *et al.*, 2006). Las células de Sertoli apoyan el proceso por medio de una serie de funciones especializadas, las cuales incluyen el establecimiento de la barrera hemo-testicular (Francavilla *et al.*, 1991), el mantenimiento de altas concentraciones de testosterona intratesticular por medio de la producción y secreción de la proteína de ligadora de andrógenos (ABP) (Palmero *et al.*, 1989) y el cuidado de las células germinales en desarrollo (Mita *et al.*, 1982).

2.1.3.4.1. Origen

La diferenciación de los testículos es inducida por la expresión del gen *Sry* en un subtipo de células somáticas que es inducida a diferenciarse a células de Sertoli. Se cree que las células de Sertoli actúan como el centro de organización de la gónada del macho y orquesta la diferenciación de todos los otros tipos celulares (Wilhelm *et al.*, 2006).

Las células de Sertoli son células somáticas y se sabe que son el primer tipo celular en la gónada en diferenciarse a partir de precursores bipotenciales del linaje celular de soporte y son por lo tanto el primer indicador de que la gónada ha pasado de la etapa indiferenciada a la de desarrollo testicular. La diferenciación a partir de células pre-

Sertoli a células de Sertoli es marcada por la polarización de las células cuando ellas a partir de agregados celulares se ensamblan y forman los cordones testiculares (Wilhelm *et al.*, 2006).

De forma paralela a la diferenciación de las células de Sertoli, la gónada incrementa marcadamente su talla debido al aumento en la proliferación y migración de las células del mesonefros adyacente. Este proceso ocurre sólo en machos después del inicio de la expresión de Sry. Las células mesoneféricas inmigrantes dan origen a las células mioideas peritubulares, a las células endoteliales que forman la musculatura lisa específica de los testículos y también a las células de Leydig (Wilhelm *et al.*, 2006).

2.1.3.4.2. Proliferación y diferenciación posnatal

La proliferación de las células de Sertoli ocurre durante un tiempo limitado entre la diferenciación sexual y la pubertad (Sharpe *et al.*, 2003; Griswold *et al.*, 2006; Herrera-Alarcón *et al.*, 2007), una vez que alcanzan el nivel de diferenciación de Sertoli adultas pierden la capacidad de seguir multiplicándose. El factor de proliferación más importante es la FSH (Singh y Handelsman, 1996; Sharpe *et al.*, 2003), sin embargo las hormonas tiroideas también son importantes en determinar la duración del periodo de proliferación contribuyendo a modificar el número total de células de Sertoli en el animal adulto (Van Haaster *et al.*, 1993). Esto se sabe gracias a trabajos en los que se ha observado que la inducción de hipotiroidismo neonatal resulta en animales con testículos más grandes y con mayor producción de espermatozoides (Hess *et al.*, 1993). El hipotiroidismo neonatal incrementa el número de células de Sertoli en el adulto extendiendo el tiempo de proliferación de éstas. Por el contrario, el hipertiroidismo induce un cese prematuro de la proliferación de las células de Sertoli y estimula eventos de maduración (Holsberger *et al.*, 2005). El mecanismo que apoya esta observación es vía acción directa de la hormona tiroidea sobre las células de Sertoli (Bunick *et al.*, 1994; Cooke *et al.*, 1994). Las hormonas tiroideas actúan directamente sobre su receptor TR α 1 (Holsberger *et al.*, 2005), el cual es expresado en grandes niveles en células de Sertoli en proliferación, para posteriormente declinar la producción del receptor conforme finaliza el período proliferativo (Buzzard *et al.*, 2000). Se ha reportado que en cruces de Romanov el período en el que se detiene la capacidad de proliferar de estas células es entre los 40 y

los 80 días (Monet-Kuntz *et al.*, 1984), en otras razas de lana el número se incrementa incluso hasta los 100-120 días de edad (Hochereau-de-Reviers *et al.*, 1987), mientras que en las razas de pelo (Blackbelly) es alrededor de los 105 días (Herrera-Alarcón *et al.*, 2007).

2.1.3.4.3. Morfología

Las células de Sertoli tienen una forma columnar inusual compleja en los tejidos debido a su interacción con las células germinales. La posición estratégica de las células de Sertoli al interior de los túbulos seminíferos y la relación intrínseca con las células de Sertoli vecinas y las células germinales ha sido observada en una gran variedad de especies vertebradas e invertebradas. Las extensiones citoplasmáticas que caracterizan la topografía de las células son posiblemente las más complicadas que se hayan descrito en cualquier otro epitelio (Kerr *et al.*, 1994). Las células de Sertoli deben cambiar su forma constantemente para adecuarse a las transformaciones y movilización de las células germinales que van desde la base hasta la luz del epitelio seminífero. En general la forma de la célula es alta, columnar irregular y posee numerosos procesos delgados laterales e invaginaciones cilíndricas para acomodar la presencia de las espermátidas alargadas (Kerr *et al.*, 1994).

Justo antes de la liberación de las espermátidas, la cabeza de la espermátida es retenida por las células de Sertoli vía su asociación con largas proyecciones llenas de retículo endoplásmico liso. Después de la espermiación las masas membranosas son transportadas hacia la base de cada célula de Sertoli (Kerr *et al.*, 1994). Las células de Sertoli contienen cantidades variables de cuerpos densos usualmente referidos como colecciones de lisosomas, cuerpos multivesiculares y vacuolas heterofágicas. El papel de los microtúbulos en generar los cambios de forma al interior de las células de Sertoli. Los microtúbulos muestran variaciones regionales en su distribución, son abundantes en las criptas donde se alojan las espermátidas alargadas, en el largo axis del tronco de las células de Sertoli y alrededor de las cabezas de espermátidas en desarrollo (Vogl, 1988).

Una propiedad muy conocida de las células de Sertoli es la capacidad que tienen para crear un microambiente y favorecer a las células germinales desde sus etapas más tempranas hasta ya alcanzado un alto grado de madurez. La barrera hemo-testicular

reside en el interior del epitelio seminífero y es debido principalmente a la presencia de varios tipos de uniones herméticas o estructuras tipo desmosomas asociadas con la membrana plasmática de las células de Sertoli. Se sabe que esta barrera no está presente al nacimiento, pero con la madurez sexual (durante la pubertad) aparecen este tipo de uniones herméticas.

2.1.3.4.4. Función en la espermatogénesis

Trabajos concernientes a la regulación de la espermatogénesis proponen que las células de Sertoli sirven como un intermediario entre los factores presentes en plasma, incluyendo hormonas y las células germinales. Una vía por la cual las células de Sertoli contribuyen a la espermatogénesis es regulando el ambiente en el cual las células germinales se desarrollan. La barrera hemo-testicular, que está formada por uniones herméticas entre células de Sertoli adyacentes, es importante para esta función (Dym y Fawcett, 1970). La barrera hemo-testicular mantiene aislados de la sangre a los compartimientos adluminales de los túbulos, por lo tanto sólo el compartimiento basal de la célula de Sertoli tiene acceso directo con los componentes sanguíneos (Orth y Christensen, 1978). Esto sugiere que las células de Sertoli pueden responder a la estimulación por parte de los factores de crecimiento circulantes y sustancias mitogénicas. A su vez la señal es conducida hacia la estimulación de las células germinales por medio de la íntima asociación entre estos tipos celulares (Borland *et al.*, 1984). Debido a la variedad de funciones que desempeñan las células de Sertoli, es posible pensar que su número total puede establecer el límite máximo de producción de espermatozoides en un testículo. La producción espermática por día está relacionada con el número total de células de Sertoli, y esta relación es lineal (Berndtson *et al.*, 1987). Tanto la talla testicular como la producción espermática diaria están correlacionadas positivamente con el número total y tamaño de las células de Sertoli (Almquist *et al.*, 1976).

2.1.3.4.5. Proteínas sintetizadas por las células de Sertoli

Durante la etapa postnatal, las células de Sertoli empiezan a producir altas cantidades de proteínas características de la célula joven y adulta (Palmero *et al.*, 1989; Kirby *et al.*, 1992; Bunick *et al.*, 1994). No es la intención de este apartado enumerar la

enorme cantidad de proteínas sintetizadas por las células de Sertoli, simplemente se trata de apreciar la gran cantidad de señales endocrinas que se cruzan con esta célula y exhibir su compleja regulación. Se sabe que las células de Sertoli poseen receptores para FSH, IGF-I, GHRH, TGF-B, testosterona, insulina y hormonas B-adrenérgicas (Borland *et al.*, 1984; Gondos y Berndston, 1993; Srivastava *et al.*, 1994). También hay reportes que indican la expresión del gen que codifica para el receptor de la hormona tiroidea, C-erbA α , el cual es producido por las células pre-Sertoli (Hirobe *et al.*, 1992). Cabe mencionar que las células de Sertoli están involucradas en la regresión de los conductos de Müller, produciendo la hormona Anti-Mülleriana (AMH) (Hirobe *et al.*, 1992).

2.2. Desarrollo anatómico e histológico testicular del cordero

Los testículos en el cordero recién nacido presentan ciertas diferencias con la anatomía e histología del adulto. A continuación se enumeran algunas de las características más notorias que hacen diferentes a los testículos del animal joven del adulto:

Al nacimiento

- No hay túbulos seminíferos sino cordones seminíferos
- Los gonocitos se localizan en el centro del cordón espermático
- No hay divisiones meióticas pero si mitóticas.
- No hay barrera hemo-testicular

La curva de crecimiento testicular es de tipo sigmoidea (Skinner, 1971; Herrera-Alarcón *et al.*, 2007) y para corderos de pelo se ha encontrado que el peso testicular incrementa a mayor velocidad entre las 9 y las 15 semanas de edad (Herrera-Alarcón *et al.*, 2007). El cordón espermático del cordero recién nacido es una estructura tubular sin luz formada por células de Sertoli y con los monocitos al centro (células germinales), rodeada por una membrana basal y más superficialmente por una capa de células mioides peritubulares (Curtis y Amann, 1981). El peso testicular y el diámetro de los túbulos seminíferos incrementa con la edad (Skinner, 1971; Yilmaz y Aygun, 2002), asociado a la proliferación de las células de Sertoli y las células germinales; la aparición de la luz de lo que ya se puede nombrar como túbulos seminíferos es consecuencia de una mayor secreción y acumulación de fluido tubular producido por las células de Sertoli (Herrera-

Alarcón *et al.*, 2007). Una vez establecido el número total de la población de las células de Sertoli (al perder su capacidad de proliferar) y alcanzando éstas su madurez funcional, junto con la migración de los gonocitos hacia la periferia de los túbulos se conforma la barrera hemo-testicular al aparecer el primer espermatozoides en paquiteno (Steinberger y Steinberg, 1971). El evento de la aparición de este tipo celular ha sido observado en la mayoría de los túbulos seminíferos alrededor de las 12 semanas de vida en borregos de pelo (Herrera-Alarcón *et al.*, 2007). La espermatogénesis, proceso que se mantendrá durante toda la vida adulta en condiciones normales, inicia cuando los gonocitos se dividen para producir espermatogonias, las que a su vez desarrollarán tipos celulares más diferenciados (Aponte *et al.*, 2005). Cuando los espermatozoides (células germinales más diferenciadas), aparecen por primera vez en el lumen de los túbulos seminíferos, el animal ha culminado la primera onda espermiática.

2.3. Principales hormonas involucradas en el eje reproductivo del macho

2.3.1. Hormona Liberadora de las Gonadotropinas (GnRH)

Como su nombre lo indica la GnRH controla la liberación de las dos gonadotropinas hipofisiarias: la LH y la FSH. Es una hormona de naturaleza polipeptídica, compuesta por 10 aminoácidos (Herbison, 1994). En el macho la producción tónica de esta hormona estimula la secreción de las gonadotropinas para mantener un adecuado funcionamiento testicular. La GnRH actúa principalmente a nivel de adenohipófisis, aunque puede tener funciones importantes a nivel de sistema nervioso central como neurotransmisor (Herbison, 1994). En el mercado existe la hormona como tal y análogos, ambos son utilizados con mucha frecuencia con fines terapéuticos en la hembra (más en ganado bovino). Sin embargo también han sido utilizados ampliamente para fines de investigación en ambos sexos (Bremner *et al.*, 1976; Wilson y Lapwood, 1979a; Tyrrell *et al.*, 1980; Clarke *et al.*, 1998; Jiménez-Severiano *et al.*, 2007).

2.3.2. Gonadotropinas

Como su nombre lo indica, estas hormonas tienen la función principal de estimular el funcionamiento de las gónadas tanto masculinas como femeninas. En el macho la LH estimula la producción de testosterona por las células de Leydig, mientras

que la FSH estimula en las células de Sertoli, la conversión de estos andrógenos a estrógenos, la secreción de inhibina, y la producción de la proteína ligadora de andrógenos (ABP) (Bousfield *et al.*, 1994). Tanto la LH como la FSH son necesarias para que se inicie la espermatogénesis.

2.3.2.1. Hormona Luteinizante (LH)

La LH es una de las gonadotropinas, tiene un peso de 30 KDa, y una actividad biológica media de 30 minutos (Hafez *et al.*, 2000). Es sintetizada por los gonadotropos, es de naturaleza gluco-polipeptídica compuesta de dos subunidades; α y β . La subunidad α es común para las hormonas FSH, TSH y en los primates también a la hGC (Bousfield *et al.*, 1994). La subunidad β es la subunidad específica de la hormona. Se le llamó hormona luteinizante porque en la hembra, durante el ciclo estral sucede el pico preovulatorio de LH, el cual luteiniza las células presentes en el folículo. Sin embargo en el macho no es así, en el macho la LH se encarga de estimular a las células de Leydig para la producción de andrógenos así como para la sobrevivencia de estas células (Bousfield *et al.*, 1994).

2.3.2.2. Hormona Folículo-Estimulante (FSH)

La FSH es también una gonadotropina sintetizada por los gonadotropos, es de naturaleza gluco-polipeptídica y al igual que LH está compuesta por 2 subunidades: α y β . La subunidad β es la específica de esta hormona. Se le llama hormona folículo estimulante porque en la hembra una de sus funciones es la de estimular el desarrollo de los folículos en el ovario (Hafez *et al.*, 2000). Sin embargo en el macho su función es diferente, se encarga de llevar a cabo la espermatogénesis a través de las células de Sertoli, las cuales tienen receptores para esta hormona (Bousfield *et al.*, 1994).

2.3.3. Testosterona

La testosterona es un andrógeno de 19 carbonos sintetizado en el tejido intersticial de los testículos por las células de Leydig con una limitada cantidad producida por la corteza suprarrenal. El precursor inmediato de los esteroides gonadales, así como de los esteroides suprarrenales, es el colesterol (Granner, 2003). La testosterona es transportada

en la sangre por una alfa globulina de unión para esteroides. Aproximadamente 98% de la testosterona circulante está unida (Griffin y Wilson, 2003). La testosterona restante se encuentra libre para entrar a la célula blanco, donde una enzima (5 α reductasa) en el citoplasma la convierte en dihidrotestosterona (DHT), la cual puede actuar en el receptor nuclear de la testosterona pero con un mayor efecto debido a su mejor afinidad (Bousfield *et al.*, 1994; Granner, 2003), también puede ser transformada a estradiol (por la enzima p450 aromatasas) por ejemplo, a nivel central donde cumple la importante función durante el desarrollo sexual en el ovino como un factor de retroalimentación negativa en el macho (ver apartado Diferenciación sexual del hipotálamo). Entre las funciones de la testosterona se mencionan las siguientes; a) estimular los estados tardíos de la espermatogénesis y prolongar el lapso de vida del espermatozoide en el epidídimo, b) promover el crecimiento, desarrollo y la actividad secretoria de los órganos sexuales accesorios de los machos y c) mantener las características sexuales secundarias y el comportamiento sexual o libido del macho (Hafez *et al.*, 2000).

2.3.4. Inhibina y Activina

Son miembros de la familia de factores de crecimiento TGF β , la inhibina es un heterodímero de dos subunidades, una α y la otra β , ya sea A o B. Mientras que la activina está formada por la dimerización de dos subunidades β , de esta manera se puede encontrar, activina A ($\beta_A \beta_A$), activina B ($\beta_B \beta_B$) y activina AB ($\beta_A \beta_B$) (Bilezikjian *et al.*, 2006). Las gónadas son la fuente principal de estas hormonas. Las células de Sertoli las producen en el macho mientras que en la hembra se producen en las células de la granulosa. La inhibina es secretada por vía linfática en el macho, mientras que en la hembra es por la sangre venosa (Hafez *et al.*, 2000). La inhibina y formas de la subunidad α de inhibina pueden actuar como reguladores paracrinos y autocrinos en los testículos (Schneyer *et al.*, 1991; Gnessis *et al.*, 1997). La inhibina reduce la secreción de FSH sin alterar la secreción de LH, la inhibina es responsable en parte de la secreción diferenciada de las dos gonadotropinas (Bilezikjian *et al.*, 2006). Además de la regulación de FSH hipofisiaria, proteínas relacionadas con la inhibina regulan la función de las células de Sertoli (Jeong y Kaiser, 1994).

2.4. Desarrollo Endocrino del Eje Reproductivo del Macho

2.4.1. Desarrollo embrionario de las gónadas

La primera manifestación de las gónadas se aprecia en el embrión en forma de un par de eminencias longitudinales llamadas crestas o pliegues gonadales, situados a ambos lados de la línea media entre el mesonefros y el mesenterio dorsal (Márquez y Gutiérrez, 2006). Las células germinales primordiales son células grandes, de citoplasma claro y núcleo grande y redondo, localizadas en la pared del saco vitelino cerca del alantoides. Estas células tienen gran capacidad de proliferación y van a migrar desde el endodermo del intestino y el epitelio del saco vitelino, a través del mesenterio y hasta las crestas gonadales. La primera manifestación estructural de diferenciación sexual se detecta en la gónada de los machos en donde las células germinales se localizan en la médula. En los embriones de los mamíferos las gónadas primordiales es el único tejido que tiene 2 posibles vías a tomar para formar a los testículos o a los ovarios (Cederroth *et al.*, 2007). La manifestación de estas gónadas primordiales aparecen muy temprano en el desarrollo, pudiendo ser detectadas a mitad de la gastrulación (Márquez y Gutiérrez, 2006). Durante el desarrollo de los ovarios y testículos más de 1000 genes son expresados (Cederroth *et al.*, 2007). Uno de los cambios morfológicos tempranos que ocurren durante la determinación sexual es un incremento en la talla de la gónada XY, 48 horas después de expresado el gen *Sry*, las gónadas aumentan de tamaño por la proliferación y migración celular (Cederroth *et al.*, 2007). Los testículos embrionarios del macho secretan 3 hormonas principales: a) AMH secretada por células de Sertoli la cual induce la regresión de los conductos paramesonéfricos, b) testosterona por las células de Leydig, implicada en el desarrollo de los conductos mesonéfricos y la masculinización de los genitales externos y c) Insulin-like3 (InsI3), la cual media el descenso testicular (Cederroth *et al.*, 2007).

Bajo la influencia de secreciones testiculares, el fenotipo masculino es formado; primero por la AMH la cual ejerce un efecto de defeminización y posteriormente por la testosterona y dihidro-testosterona esta última con un efecto más potente, las cuales ejercen la acción de masculinización (Foster *et al.*, 2006). Los esteroides sexuales prenatales tienen una actividad encargada de organizar o programar el funcionamiento para la vida adulta a nivel central, mientras que esteroides postnatales tienen una acción

encargada principalmente de mantener y regular dicho funcionamiento. Debido a que los borregos son una especie precoz, el periodo crítico de organización de testosterona se lleva a cabo tanto prenatalmente como postnatalmente (Foster *et al.*, 2006).

La diferenciación de los testículos inicia cuando los cordones sexuales se separan del epitelio celómico como consecuencia de los arreglos producidos por una invasión del mesénquima y vasos sanguíneos que provoca la compactación de los cordones ahora denominados cordones testiculares. Las células del embrión que rodean a los cordones testiculares se diferencian para formar varios tipos celulares; células mioideas, fibroblastos, endotelio y células de Leydig. Posteriormente, los cordones testiculares dan origen a los túbulos seminíferos que contienen el epitelio que producirá los espermatozoides al llegar a la pubertad.

De forma clásica, son 2 pasos involucrados en la determinación sexual del mamífero: el paso genético de cromosomas para la formación de las gónadas y el paso controlado por las gónadas para el fenotipo. La vía genética en la diferenciación de los testículos es controlada por la presencia de un “switch” maestro, el factor determinante del testículo. En ausencia de este switch, la gónada indiferenciada posteriormente forma al ovario. Los testículos embrionarios dan el segundo paso por la producción de hormonas gonadales. La producción de la AMH en machos señala el inicio de la fase hormonal de diferenciación sexual, entonces se sintetiza la testosterona y sus derivados, los que son responsables de la diferenciación de las estructuras del macho (Wilhem y Koopman, 2006).

2.4.2. Desarrollo de células GnRH

El sistema secretor GnRH hipofisiotrópico es aquella población de neuronas que secretan GnRH (células GnRH) originadas en el periodo embrionario fuera del sistema nervioso central (SNC), en la placoda olfatoria media (Tobet y Schwarting, 2006). Las células GnRH se originan en los flancos de los dominios adenohipofisarios y dominios craneales de las crestas neurales (Whitlock *et al.*, 2006). Se ha reportado que el epitelio sensorial olfatorio da origen a neuronas sensoriales, células de soporte, células gliales y células neuroendocrinas que contienen péptidos GnRH (Whitlock *et al.*, 2006).

Estas células GnRH posteriormente migran de la región nasal hacia el cerebro a lo largo de los axones olfatorio-vomeronasal (Wray, 1994), así el soma celular de las neuronas que forman a este sistema secretor en el mamífero adulto como un “continuum” a través del cerebro rostral basal del septum medial al hipotálamo mediobasal (Ebling, 2005). La mayoría de los cuerpos celulares son encontrados en áreas rostrales, particularmente en el septo medial, la banda diagonal de Broca, y el núcleo preóptico (POA), al nivel del *organum vasculosum* de la lamina terminal (OVLT) (Ebling, 2005). Estudios revelan que la gran mayoría de neuronas GnRH extienden sus proyecciones axonales hacia capilares en OVLT y la eminencia media (Witkin, 1990). Aunque ramificaciones extensas también resultan en la innervación de sitios en el cerebro medio donde GnRH hipotéticamente facilita el comportamiento reproductivo (Ebling, 2005). A mediados de la gestación, el número de neuronas GnRH en corderos fetales de ambos sexos es comparable con el de adultos (Kim *et al.*, 1999). En el ovino adulto se encuentran en promedio 3000 neuronas GnRH (Caldani *et al.*, 1988). Referente a la maduración de las neuronas GnRH en etapas embrionarias, un estudio encontró lo siguiente: (i) cultivos de neuronas GnRH de la placoda olfatoria secretaron GnRH de una manera pulsátil y la frecuencia y amplitud fueron similares a los reportados en ovinos castrados, (ii) la secreción pulsátil no se presentó sino hasta después de 17-24 días *in vitro*, indicando la maduración individual de neuronas y el desarrollo de su sincronización (Duittoz y Balailier, 2000).

Existen diferencias entre sexos en ciertos aspectos, por ejemplo las neuronas GnRH de hembras reciben aproximadamente el doble de sinapsis que los corderos machos (Kim *et al.*, 1999). El número de sinapsis de neuronas GnRH de hembras androgenizadas jóvenes, fue similar a los de machos jóvenes, sugiriendo que esteroides prenatales dan la diferencia sexual en las sinapsis de neuronas GnRH (Kim *et al.*, 1999).

Se ha identificado que ciertas moléculas tienen efecto sobre la migración de las células GnRH, por ejemplo la colecistocinina (CCK), tanto el mRNA como la proteína son expresados en células sensoriales en el epitelio olfatorio en desarrollo y órgano vomeronasal así como sus receptores (CCK1R y CCKR2), encontrados en axones olfatorios a través del desarrollo prenatal (Giacobini *et al.*, 2004). En un experimento la aplicación exógena de CCK redujo la migración celular de neuronas GnRH, dicha

inhibición en la migración es mediada a través de CCK 1R (Giacobini *et al.*, 2004). Estos resultados indican que CCK provee una influencia inhibitoria sobre la migración neuronal de GnRH.

Recientemente la atención se ha centrado en señales intercelulares de neuronas GnRH, a la fecha el ácido gamma amino butírico (GABA), el glutamato y la serotonina han demostrado que regulan la migración neuronal de GnRH (Herbison, 1994). Todas estas moléculas están distribuidas en forma de gradientes, tanto en el sistema olfatorio periférico como en el cerebro, e influyen en el movimiento apropiado de neuronas GnRH a lo largo de su ardua migración.

La ruta migratoria tiene al menos 3 regiones; al interior del compartimiento nasal, cruzando el plato cribiforme y al interior del cerebro frontal anterior. Todas estas regiones tienen distintas señales moleculares (Tobet y Schwarting, 2006). Durante el desarrollo embrionario temprano, neuronas GnRH en el compartimiento nasal, se mueven intermitentemente, a una velocidad relativamente baja, con movimientos de 12-13 micrómetros por hora en promedio. Sus movimientos siguen una trayectoria exacta a la de las fibras del nervio vómero nasal (VNN), por las cuales son guiadas (Bless *et al.*, 2000). Cuando ellas entran al cerebro, incrementa la velocidad de movimiento. Las neuronas GnRH siguen al VNN sólo hasta que éste se dirige en dirección caudal, después de entrar al SNC, después cambian su modo de migración una vez liberados de aquellas fibras (Bless *et al.*, 2000).

La migración de neuronas GnRH también tiene muchos atributos comparados con la migración de las células de crestas neurales de ratón. Algunas moléculas expresadas intrínsecamente que influyen a las células de la cresta neural craneal del murino han sido identificadas. Muchos factores pueden influenciar la migración de neuronas GnRH incluyendo neurotransmisores (serotonina y epinefrina), neuropéptidos (como ya se mencionó CCK), factores de crecimiento (IGF-1) y quimiorreceptores clásicos (Netrin1) (Tobet y Schwarting, 2006). Están también presentes en las células en el sistema olfatorio en desarrollo y durante la migración de neuronas GnRH por ejemplo, familia de las ephrins/Eph, netrin1 y moléculas de adhesión celular neural polisializadas (Tobet y Schwarting, 2006). Particularizando, la señalización de Ephrin/Eph es importante para las células cresta migratorias, y según datos recientes puede ser también importante para

la migración de neuronas GnRH en su entrada al SNC (Gamble *et al.*, 2005). En células cretales neurales derivadas del intestino usan Netrin1 como quimioatrayente para su migración y netrin 1 y su receptor es importante para la migración neuronal de GnRH (Shwartzing *et al.*, 2004). Recientemente Endotelina-1, un péptido conocido por su papel en el desarrollo de la migración de células de la cresta neural, ha mostrado que influye en la proliferación y movimientos de una línea celular inmortalizada de GnRH (Romanelli *et al.*, 2005). Otros elementos que influyen en la migración es GABA y la activación de su receptor GABA A, que causa disminución en el movimiento de neuronas GnRH (Bless *et al.*, 2000). Al parecer múltiples señales involucradas en la migración de estas células pueden converger en la señalización de Ca⁺ como un regulador general de la migración neuronal. Recientes estudios sugieren que usan canales de calcio tipo N para este propósito (Toba *et al.*, 2005). Por ejemplo, la activación de receptores GABA influyen el movimiento de neuronas GnRH por mecanismos dependientes de Ca⁺, por si mismo GnRH puede influenciar la migración de neuronas GnRH mediada por mecanismos autocrinos que involucran señales de Ca⁺ (Romanelli *et al.*, 2005). El factor derivado de células del estroma es un regulador de la migración celular, regulador potencial de la migración neuronal de GnRH, el cual usa también señales de Ca⁺. La expresión del receptor de GnRH, la señalización de activación de GnRH dependiente de Ca⁺ y la regulación autocrina de secreción de GnRH son características de neuronas GnRH fetales y pueden proveer un mecanismo de expresión génica y secreción regulada de GnRH durante la migración embrionaria (Martínez *et al.*, 2004).

2.4.3. Diferenciación sexual del hipotálamo

Los procesos de diferenciación incluyen a los centros nerviosos superiores del cerebro. Esta diferenciación influirá sobre vida postnatal para el momento de inicio de la pubertad. El inicio de la pubertad generalmente difiere entre sexos, y puede ser debido a diferencias sexuales en la organización de sistemas de retroalimentación de hormonas esteroides (Foster *et al.*, 2006). Al considerar diferencias sexuales en el comienzo de la pubertad, es decir el momento en que GnRH muestra una actividad mayor en cuanto a la frecuencia de su secreción, indica que las señales permisivas específicas pueden ser interpretadas de diferente manera (Foster *et al.*, 2006).

Las hembras de la especie ovina inician la pubertad a las 30 semanas en respuesta a una mayor cantidad de LH presente, lo cual dirige la primera fase folicular con un aumento en la cantidad de estrógenos y termina generando el pulso preovulatorio de GnRH seguido por repetidos ciclos ovulatorios que consisten en 3 días de fase folicular y 13-14 días de fase lútea. Mientras que en el macho el aumento de LH inicia a una edad mucho más temprana y con un marcado incremento gradual en la cantidad de testosterona secretada por los testículos (Foster *et al.*, 2006). El relativamente bajo pero gradual desarrollo de la función testicular, requiere 2 meses para completar la espermatogénesis la cual una vez iniciada es mantenida casi de manera constante (Foster *et al.*, 2006).

La borrega joven es capaz de producir al igual que el adulto una alta frecuencia de pulsos GnRH desde una temprana edad postnatal, sin embargo el grado de cómo esta alta frecuencia innata es expresada depende de la sensibilidad a la retroalimentación negativa ejercida por los esteroides (Foster *et al.*, 2006). Cuando el sistema de inhibición es muy sensible, muy bajas cantidades de esteroides pueden ejercer su acción de retroalimentación negativa. En contraste, cuando la sensibilidad del sistema es muy bajo, se requieren altas cantidades de esteroides para producir la misma acción (Foster *et al.*, 2006). La capacidad de producir alta frecuencia de secreción de GnRH desde una edad temprana en la borrega sexualmente inmadura y que sólo lo hace hasta que inicia la pubertad tiene una explicación, dicha capacidad no es totalmente expresada debido a la presencia de esteroides gonadales (presentes en bajas cantidades) y la extrema sensibilidad del sistema reproductivo, el cual se mantiene bajo un efecto inhibitorio por parte de los esteroides (Foster *et al.*, 2006).

En la hembra ovina, a partir de las 27 semanas se observa cómo el efecto de retroalimentación negativa de los estrógenos comienza a disminuir. Por lo tanto, antes de la pubertad los estrógenos son capaces de suprimir la secreción pulsátil de GnRH, pero van perdiendo su efectividad conforme se va acercando la edad a la pubertad. Este cambio en la retroalimentación negativa por parte de los estrógenos también se hace presente en el macho, pero a una edad más temprana (Foster y Jackson, 1994).

Una posibilidad planteada para explicar la diferencia entre los sexos en el momento de llegada a la pubertad es por la testosterona prenatal. La exposición prenatal de la hembra a la testosterona reduce la sensibilidad postnatal a la retroalimentación

negativa ejercida por los estrógenos adelantando en tiempo el aumento en la actividad de GnRH y por lo tanto iniciando más prontamente la pubertad. El periodo crítico de exposición observado es entre los 30 y 90 días de vida embrionaria (Foster *et al.*, 2006). En el borrego al igual que en otras especies, la testosterona es aromatizada a estradiol y éste último es el principal retroalimentador negativo en la secreción de GnRH tanto en el macho como en la hembra. En el macho la progesterona no está presente en cantidades considerables, debido a que no existe la capacidad biológica, sin embargo, en un estudio comparativo se demostró que el macho no es sensible al efecto inhibitorio de progesterona a las mismas cantidades que la hembra para lograr un efecto inhibitorio sobre la secreción de GnRH, pero una exposición prenatal a testosterona de la hembra disminuye la sensibilidad al efecto inhibitorio de progesterona sobre GnRH al igual que el macho (Robinson *et al.*, 1999). Estas diferencias sexuales se desarrollan en útero bajo el control de andrógenos de los testículos fetales (Kim *et al.*, 1999).

2.4.4. Inicio de la pubertad

La pubertad precede a la madurez sexual, ya que el organismo continúa su crecimiento y maduración hasta expresar su máximo potencial reproductivo. La pubertad es el momento de transición para la adquisición de la capacidad reproductiva, y recae en la integración de información de una gran variedad de señales tanto internas como del medio ambiente. La secreción de GnRH representa el resultado de la integración de la información de una compleja red neuronal que regula la fertilidad (Clarkson y Herbison, 2006; Foster *et al.*, 2006). El patrón pulsátil de secreción de GnRH dirige la secreción pulsátil de gonadotropinas que es crítica para la activación y funcionamiento apropiado de las gónadas (Belchetz *et al.*, 1978). Algunas señales permisivas importantes para el inicio de la pubertad han sido determinadas, como el estatus nutricional, así como las alteraciones en la sensibilidad a la retroalimentación negativa por parte de los estrógenos, cercano a la pubertad (Lee *et al.*, 1976a; Plant y Barkrer-Gibb, 2004).

2.4.5. Perfiles de secreción durante la etapa postnatal, pubertad y vida adulta

El periodo prepuberal se origina con el inicio de la descarga hipotalámica de GnRH y las gonadotropinas por la adenohipófisis, de una forma más frecuente (Amann,

1983; Chase *et al.*, 1988). Hay una cercana relación entre las concentraciones séricas de LH, los pulsos de LH y la concentración de testosterona en toros y borregos jóvenes (McCarthy *et al.*, 1979; Sandford *et al.*, 1982; Lunstra *et al.*, 1987; Yarney y Sanford, 1989). El aumento de la actividad esteroidogénica testicular de corderos en la estación reproductiva es debido en parte a un incremento en la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH y a la mayor capacidad de respuesta testicular a LH (Sanford *et al.*, 1977; Frager *et al.*, 1981; Katt *et al.*, 1985; Bo y Boime, 1992). El mayor determinante de la concentración promedio de LH es la frecuencia de los pulsos (Foster *et al.*, 1978; Klindt *et al.*, 1985). En corderos Romney se reporta que la concentración promedio de LH fue generalmente alta entre las 4 y 16 semanas de edad y después hay una disminución en la frecuencia de la liberación de LH (Wilson y Lapwood, 1979b). Rawlings *et al.* (1991) encontraron en corderos de razas de lana un incremento en la concentración promedio de LH a la semana 10 para después disminuir a la semana 15 y mantenerse sin cambios al menos hasta la semana 35 de vida. Otro grupo de investigadores reporta que en corderos Suffolk existe un incremento en la frecuencia de los pulsos aunque con una disminución en la altura de ellos entre las 6 y 22 semanas de vida (Sanford *et al.*, 1977). La disminución en la concentración promedio circulante de LH durante la segunda parte del periodo puberal (después de 16 semanas de edad en corderos de lana), a los niveles del adulto ha sido atribuida a una mayor inhibición en la retroalimentación negativa dada por los esteroides testiculares sobre el eje reproductivo (Wilson y Lapwood, 1979a). En la raza de pelo Blackbelly se reporta este hecho (como una tendencia) a partir de la semana 6 (Herrera-Alarcón *et al.*, 2007). Durante el periodo prepuberal, la concentración promedio de LH en plasma aumenta más rápidamente en corderos de razas más prolíficas que en aquellos de razas menos prolíficas (Pelletier *et al.*, 1981; Glatzel, 1988; Lunstra y Echterkamp, 1988). Los autores sugieren que el aumento temprano de LH y las altas tasas de crecimiento testicular pudieran deberse a una menor sensibilidad de las razas prolíficas a la retroalimentación negativa de esteroides gonadales (Land, 1978). Sin embargo otro estudio no apoya esta aseveración al no existir diferencias entre dos grupos con características reproductivas de prolificidad distintas (Lucas *et al.*, 1983).

En la literatura existe cierta controversia referente a cuando la testosterona alcanza la máxima concentración. En corderos cruzados de la raza Targhee la producción

máxima de testosterona ocurre después de las 16 semanas de edad (Schanbacher *et al.*, 1974). Sin embargo, el primer incremento significativo de la concentración de testosterona en corderos Romney (Wilson y Lapwood, 1978) y Suffolk (Yarney *et al.*, 1990) ocurrió a las 24 semanas con un incremento progresivo en todas las características de secreción de LH entre las 4 y las 16 semanas de edad, en corderos de pelo se reporta el primer incremento a las 12 semanas (Herrera-Alarcón *et al.*, 2007). Rawlings *et al.* (1991) reportan un incremento progresivo a partir de la quinta semana de vida y el mayor incremento a las 30 semanas de vida. Wilson y Lapwood (1979b) encontraron que los mayores incrementos en los niveles de testosterona fueron precedidos por una disminución en la concentración promedio de LH desde las 16 hasta las 22 semanas de edad. La concentración máxima de LH ha sido observada antes de las 16 semanas de vida, después de que la frecuencia de los pulsos de LH aumentó, mientras que la altura y la concentración promedio de LH disminuía. La concentración de testosterona en los artículos revisados incrementó después de las 22 semanas de vida, implicando que la concentración de testosterona en mayor medida es más dependiente de la frecuencia de pulsos de LH que de la concentración sérica de LH.

2.4.6. Factores que intervienen en el inicio de la pubertad

Como se mencionó anteriormente, a la fecha, no hay una claridad de cómo las neuronas GnRH son activadas para iniciar la pubertad, esto se debe a la gran cantidad de neurotransmisores que están involucrados en modular el comportamiento de neuronas GnRH. En mamíferos incluido el hombre, la capacidad reproductiva adquirida después de la pubertad, posterior a una serie de eventos neuroendocrinos y de desarrollo culminan en la total activación del generador de pulsos de GnRH, mejorando la frecuencia de secreción de gonadotropinas y completando la total maduración y función de las gónadas (Ojeda y Skinner, 2005).

Tanto los neurotransmisores como las células gliales están involucrados en la regulación de mecanismos de activación de neuronas GnRH que dan inicio a la pubertad (Grumbach, 2002) como glutamato, GABA, NPY, kisspeptina (Kiss), esta última implicada en la activación de GnRH en mamíferos (Clarkson *et al.*, 2006). Se sabe que el GABA y el glutamato son los principales neurotransmisores inhibitorios y estimulatorios

en el cerebro adulto respectivamente. En cultivos de células de la placoda nasal de ratas se encontró que las neuronas GnRH embrionarias expresan receptores funcionales a GABA A, mientras que las respuestas a los receptores glutamato fueron observadas sólo después de 10 d de cultivo (aproximadamente al tiempo de nacimiento *in vivo*). Estos hallazgos sugieren que la señalización por glutamato no ocurre sino hasta poco antes y poco después del nacimiento, esto para generar la pulsatilidad neonatal de GnRH (Clarkson *et al.*, 2006). La señalización del GABA y del glutamato a nivel de los cuerpos celulares de GnRH cambia significativamente sobre el curso del desarrollo sexual.

Como ya se mencionó, la biosíntesis y liberación de GnRH está bajo un complejo control de neuronas, neurotransmisores inhibitorios y estimulatorios y factores neurotróficos que pueden actuar a muchos niveles de las células GnRH o en células gliales (Gore *et al.*, 1996). El IGF-1 es usualmente un estímulo positivo para las neuronas GnRH y los gonadotropos. En los mamíferos hay cambios en las concentraciones circulantes de IGF-1 en momentos específicos, se incrementa durante la pubertad en los roedores, los rumiantes y en el humano (Roberts *et al.*, 1990), lo cual es consistente con la posibilidad de que las concentraciones elevadas de IGF-1 inicien o aceleren el inicio de la pubertad.

2.4.6.1. Kisspeptina

En fechas recientes una hormona peptídica ha causado revuelo en diversos grupos de investigadores, la kisspeptina (kiss) y su receptor GPR54. En 1999 GPR54 fue clonado y se consideró como un receptor huérfano hasta 2001. En el 2003 se descubre que kiss es el ligando de GPR54. La proteína kiss originalmente fue identificada como supresor de metástasis (Castellano *et al.*, 2005). El gen *kiss* fue identificado por primera vez en Hershey PA (Dungan *et al.*, 2006), y es en el año 2003 cuando se le asocia en un papel fundamental de kiss en el control del eje gonadotrópico. Esto con base a fenotipos reproductivos de humanos y ratones con mutaciones en el receptor GPR54 (Kotani *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2002), los cuales mostraban hipogonadismo idiopático (de Roux *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003). De esta manera se asoció a la hormona kiss con su receptor GPR54.

Sus efectos primarios tienen que ver con la activación de neuronas GnRH e inducir la secreción de GnRH (Castellano, 2005; Messenger *et al.*, 2005). Sin embargo, el neuropéptido recientemente ha sido implicado en un papel crítico en la activación de las neuronas GnRH cerca de la pubertad (Clarkson y Herbison, 2006). kiss logra tener efecto sobre la secreción de LH con una administración tanto intracerebroventricular como IV, IP y SC (Seminara, 2005). La administración exógena de kiss tiene un profundo efecto positivo sobre la secreción de gonadotropinas en borregos, macacos y humanos (Dhillon *et al.*, 2005; Messenger *et al.*, 2005; Shahab *et al.*, 2005). Otro estudio demostró que si no hay GPR54, no hay estímulo sobre LH al administrar kiss exógena (Messenger *et al.*, 2005).

2.4.6.2. Kiss en el inicio de la pubertad

El mecanismo de la activación de las neuronas GnRH está bajo intensa investigación. Un posible mecanismo es a través de neuronas que sintetizan kiss y que activan neuronas GnRH para iniciar la pubertad (Clarkson y Herbison., 2006). La fisiología de kiss en el contexto del inicio de la pubertad y el control de la función reproductiva se mantiene poco definido. Esto incluye la ontogenia del efecto activacional de kiss sobre GnRH y secreción de gonadotropinas (un fenómeno que puede tener implicaciones interesantes en términos del momento de llegada a la pubertad) (Castellano *et al.*, 2005). La administración central crónica de kiss en ratas hembras inmaduras sexualmente induce una apertura vaginal temprana (Navarro *et al.*, 2004).

Aunque la respuesta de LH a bajas dosis de kiss aparentemente aumenta en la pubertad, kiss fue capaz de activar el sistema GnRH en etapas tempranas de maduración postnatal (Castellano *et al.*, 2005). Los cambios en la sensibilidad de la respuesta de LH a kiss son notorios conforme se acerca la edad a la pubertad, entre más cercano a la pubertad se encuentre, hay una mayor sensibilidad a kiss por parte del eje. Se ha reportado un incremento de la sensibilidad de kiss y la eficiencia de la señalización de GPR54 durante la maduración postnatal del ratón y la capacidad de GPR54 para estimular la actividad neuronal aumenta con el desarrollo (Dungan *et al.*, 2006).

El efecto de kiss sobre la secreción de GnRH-LH en etapas tempranas del desarrollo postnatal *in vivo* ejerció un efecto de secreción para LH a cualquier edad. *In*

in vitro, kiss estimula significativamente la liberación de GnRH de tejidos neonatales infantiles y juveniles. Sin embargo se requiere una mayor dosis de kiss para estimular la secreción de LH en comparación con el ratón adulto (Han *et al.*, 2005).

El contenido hipotalámico de RNAm de kiss y GPR54 incrementan a lo largo del desarrollo postnatal (Navarro *et al.*, 2004), sugiriendo que la señalización kiss-GPR54 en el hipotálamo es incrementada cercano del tiempo de inicio de la pubertad. Los niveles de transcripción de GPR54 por neuronas GnRH aparentemente no cambian a lo largo de la pubertad. En contraste, la cantidad de mRNA para kiss expresado por células incrementa 7 veces en el núcleo anteroventral periventricular (AVPV) en este periodo (Han *et al.*, 2005). Esto indica que la mejora en el tono de kiss toma lugar durante la pubertad y que la activación farmacológica de GPR54 es aparentemente suficiente para iniciar los eventos neuroendocrinos dados al inicio de la pubertad. El eje GnRH-kiss en la pubertad refleja un fenómeno dual que involucra no sólo el incremento del tono de kiss sino también la mejora en la eficiencia de activación a las neuronas GnRH, probablemente a través de cambios post-transcripcionales en la señalización de GPR54 (Han *et al.*, 2005). Estos hallazgos encontrados reflejan una mayor actividad de kiss sobre el desarrollo pospuberal. El sistema kiss opera como el mayor estimulador sobre la secreción de GnRH, teniendo una función esencial en la activación del eje gonadotrópico en la pubertad, así como su regulación (como efector central de señales regulatorias de retroalimentación) en el adulto (Tena-Sempere, 2006).

III. Materiales y métodos

3.1. Condiciones generales

Todos los protocolos y procedimientos fueron aprobados por el Subcomité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (SICUAE) de la FMVZ, UNAM. Los estudios se realizaron en las instalaciones del CENID Fisiología y Mejoramiento Animal del INIFAP en el municipio de Colón, Querétaro, situado en una latitud norte de 20°42' y una longitud oeste de 100°01', con una altitud de 1970 msnm (Google Earth, 2009). El clima predominante en la región es templado, semiseco, con una temperatura media anual de 17.4 °C. El período de precipitaciones pluviales se presenta en verano con un promedio de 574.1 milímetros anuales (INAFED, 2005).

Se realizaron dos estudios, en el primero se evaluó el desarrollo de los perfiles circulantes de LH y testosterona, mediante muestreos seriados, mientras que en el segundo estudio se evaluó el desarrollo de la respuesta de los corderos a un desafío con diferentes dosis de GnRH.

3.2. Estudio 1. Desarrollo de los perfiles de LH y testosterona.

3.2.1. Animales y condiciones de manejo

Para este estudio se utilizaron 17 corderos nacidos entre el 2 y el 29 de marzo de 2008. Estos corderos fueron mantenidos con sus madres hasta el destete a las 10 semanas de edad (70±1 d). Cuando los animales cumplían la edad de muestreo eran transportados a corraletas individuales, antes del destete con la madre y hermanos y posterior al destete, solos. Durante la lactancia se les ofreció un alimento que contenía 16.9% de PC y 2.74% de EM (“creep feeding” o trampa para corderos), mientras que las madres fueron alimentadas con una dieta de lactancia que contenía 13.04% de PC y 2.33% de EM. Posterior al destete los corderos fueron alimentados con una dieta que contenía 14.05 % de PC y 2.65 % de EM *ad libitum*.

3.2.2. Plan experimental

Se formaron tres grupos homogéneos de borregos con base en el peso al nacimiento, tipo de parto y edad y número de partos de la madre, un grupo con 4

Blackbelly puros, otro con 5 Pelibuey puros y un tercer grupo con 8 Cruzados (5 Blackbelly x Pelibuey y 3 Pelibuey x Blackbelly). Un día antes de que los animales cumplieran 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 semanas de vida (± 1 d) se pesaban, se les midió la circunferencia escrotal (CE), y se les colocó un catéter en la vena yugular. Al día siguiente se tomaban las muestras seriadas de sangre. Al colocar el catéter y al finalizar el muestreo se les administró complejo B (tiamina 0.15 g, riboflavina 0.2 g, nicotinamina 0.3 g, piridoxina 0.2 g, cianocobalamina 90.0 mcg y D-pantenol 0.15 g), para prevenir posibles problemas de anemia y oxitetraciclina de larga acción ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PV), para prevenir la entrada de posibles infecciones por la presencia del catéter.

3.2.3. Colección de sangre y almacenamiento de muestras

Se hicieron muestreos seriados, obteniéndose entre 3 y 3.5 ml de sangre (según la edad), en tubos con heparina, cada 15 minutos durante 6 horas (0700 a 1300 h). Las muestras fueron centrifugadas a 720 g por 15 min a 4 °C. El plasma recuperado fue colocado en alícuotas de 0.5ml, las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta el análisis hormonal.

3.2.4. Análisis hormonal

Las concentraciones de LH fueron determinadas en todas las muestras por un RIA de doble anticuerpo (Jiménez-Severiano *et al.*, 1996). El límite de detección del ensayo fue de $95 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 8.6 y 9.5 %, respectivamente.

Las concentraciones de testosterona fueron determinadas por medio de un RIA de fase sólida (Coat-A-Count®, Siemens Medical Solutions Diagnostic; Los Ángeles, CA, USA). Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron 4.9 y 7.1 %, respectivamente. La sensibilidad fue de $0.04 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Las variables endocrinas evaluadas fueron las concentraciones promedio y basal ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), la frecuencia ($\text{pulsos}\cdot 6\text{h}^{-1}$), amplitud y altura de los pulsos ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) para ambas hormonas.

3.2.5. Detección de los pulsos y análisis estadístico

La detección de los pulsos se realizó usando algoritmos computacionales (Merriam y Watcher, 1982; Software Pulsar modificado para IBM-PC por J.F. Gitzen y V.D. Ramirez). Los valores G usados para LH fueron: G(1)=10.0, G(2)=2.6, G(3)=1.9, G(4)=1.5 y G(5)=1.1, mientras que para T fueron: G(1)=3.8, G(2)=2.6, G(3)=1.9, G(4)=1.5 y G(5)=1.1. La desviación estándar del ensayo usada en el algoritmo fue modelada como una función cuadrática de la dosis para cada hormona.

Todos los datos fueron analizados como un diseño completamente al azar, usando el procedimiento MIXED de SAS (SAS Institute Inc., Cary NC, USA) para mediciones repetidas, con el comando “repeated”, la opción sub=animal (genotipo) y la estructura de la covarianza autoregresiva (1), dentro de animal (Littell *et al.*, 1996). Para el análisis del peso y la CE se juntó la información de los dos estudios y se utilizó como bloque cada estudio. El genotipo, la edad y la interacción fueron incluidas en el modelo. Las variables endocrinas evaluadas de ambas hormonas fueron transformadas $\text{Log}_n(Y+1)$, para cumplir con los supuestos del análisis de varianza.

3.3. Estudio 2. Desarrollo de la respuesta a los desafíos con GnRH

3.3.1. Animales y condiciones de manejo

Doce corderos nacidos entre el 29 de octubre y el 14 de noviembre fueron usados para este estudio. Las condiciones de manejo y alimentación fueron similares a las mencionadas para el Estudio 1.

3.3.2. Plan experimental

Tres grupos homogéneos de borregos fueron establecidos con base en el peso al nacimiento, tipo de parto y edad de la madre, un grupo con 4 Blackbelly puros, otro con 4 Pelibuey puros y un tercer grupo con 4 Cruzados (3 Blackbelly x Pelibuey y 1 Pelibuey x Blackbelly). El plan experimental fue similar al mencionado en el Estudio 1, realizando los desafíos con GnRH y los muestreos sanguíneos en las semanas 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 de edad.

3.3.3. Desafío con GnRH y colección de muestras sanguíneas

Se utilizó la secuencia natural de GnRH en forma de sal de acetato (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.). Los animales fueron desafiados con tres dosis diferentes de GnRH; 3, 9 y 27 ng•kg⁻¹ de peso vivo, vía endovenosa, en días consecutivos, iniciando a la edad antes mencionada, con la dosis más baja. Las dosis fueron establecidas en un orden ascendente exponencial, la dosis más baja fue establecida con base en una prueba realizada con borregos adultos, donde se calculó que la administración de 3 ng•kg⁻¹ generaba un pulso de LH con características similares a los pulsos endógenos en borregos adultos (Jimenez-Severiano, 2001). Por lo tanto, ésta fue considerada inicialmente como una dosis fisiológica.

Se colectaron 3 a 3.5 ml de sangre (según la edad) a los siguientes tiempos; -15, 0, 15, 30, 60, 120 y 180 minutos, con relación al momento de la administración de GnRH, empezando a las 0700 y terminando a las 1015 h. Las muestras fueron centrifugadas a 720 g por 15 min a 4 °C y el plasma fue recuperado y colocado en alícuotas de 0.5 ml y congeladas a -20 °C hasta el análisis hormonal.

3.3.4. Análisis hormonal

Las concentraciones de LH fueron determinadas en todas las muestras por un RIA de doble anticuerpo (Jiménez-Severiano *et al.*, 1996). El límite de la detección del ensayo fue de 95 pg•ml⁻¹. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 14.2 y 7.0 % respectivamente.

Las concentraciones de testosterona fueron determinadas por medio de un RIA de fase sólida (Coat-A-Count®, Siemens Medical Solutions Diagnostic; Los Ángeles, CA, USA). Los CV intra e inter-ensayo fueron 5.0 y 5.9%, respectivamente. La sensibilidad fue de 0.04ng•ml⁻¹.

3.3.5. Análisis de la respuesta hormonal a la administración de GnRH y análisis estadístico

Las variables de la respuesta hormonal evaluadas, tanto para LH como para T, fueron la altura máxima de la secreción (calculada como el punto más alto alcanzado

posterior a la administración de GnRH), área bajo la curva (utilizando el programa Sigma Plot 10.0, el cual usa un algoritmo con una base trapezoidal independiente de la equidistancia de los puntos, el área fue calculada a partir de la concentración promedio inicial hasta las 3 horas posteriores al estímulo) y magnitud de la respuesta (ΔLH y ΔT), calculada como la altura máxima menos la concentración promedio inicial, utilizando como covariable la concentración promedio inicial, para ambas hormonas.

Todos los datos fueron analizados como un diseño completamente al azar, con arreglo factorial, usando el procedimiento MIXED de SAS (SAS Institute Inc., Cary NC, USA) para mediciones repetidas, con el comando “repeated”, la opción sub=animal (genotipo) y la estructura de la covarianza autoregresiva(1), dentro de animal. Genotipo, edad, dosis y las interacciones fueron incluidas en el modelo. Las variables endocrinas fueron transformadas $\text{Log}_n (Y+1)$, para cumplir con los supuestos del análisis de varianza.

IV. Resultados

4.1. Estudio 1. Desarrollo de los perfiles de LH y testosterona.

4.1.2. Hormona Luteinizante

Los efectos de la interacción genotipo x edad y del genotipo no fueron significativos para ninguna de las variables evaluadas de los perfiles de LH ($P > 0.1$), sólo se observó efecto de la edad ($P < 0.05$) en todos los casos (Cuadro 1). La concentración promedio más baja fue en la semana 2 de edad ($P < 0.05$), una elevación fue detectada en la semana 4 ($P < 0.05$), posteriormente hubo un aumento progresivo alcanzando el promedio más alto en la semana 12 para después disminuir en la semana 16 ($P < 0.05$), en la semana 24 hubo nuevamente un incremento ($P < 0.05$). La máxima concentración promedio se alcanzó en las semanas 12 y 24. La concentración basal se incrementó de forma gradual desde la semana 2 hasta la semana 24. La frecuencia de los pulsos fue mayor en la semana 8 mientras que la menor se detectó en las 24 semanas de vida. Las semanas 2, 4, 12, 16 y 20 no fueron diferentes ($P > 0.05$) entre sí en cuanto a la frecuencia de los pulsos. Pulsos de menor amplitud fueron detectados en la semana 2 de edad, incrementándose drásticamente la magnitud de los pulsos en la semana 4, la mayor amplitud fue detectada en la semana 12.

4.1.3. Testosterona

Los efectos de la interacción genotipo x edad y del genotipo no fueron significativos para ninguna de las variables evaluadas de los perfiles de T ($P > 0.1$), sólo se observó efecto de la edad ($P < 0.05$) en todos los casos (Cuadro 2). La concentración promedio aumentó entre las semanas 2 y 16 ($P < 0.05$), pero entre las semana 16 y 20 no hubo diferencia ($P > 0.05$), en la semana 24 nuevamente hubo un último incremento alcanzándose la máxima concentración promedio. La concentración basal no cambió entre las semanas 2 y 8 ($P > 0.05$), hubo un aumento en la semana 12 ($P < 0.05$) y se mantuvo en la semana 16, finalmente dos últimos incrementos en las semanas 20 y 24 ($P < 0.05$). Se detectaron pulsos de baja magnitud en algunos animales desde las dos semanas de edad, pero la frecuencia fue muy baja y fue diferente del resto de las edades ($P < 0.05$); la frecuencia más alta fue en la semana 12 de edad, pero no fue diferente de las

semanas 8, 16, 20 y 24 ($P>0.05$). La amplitud de los pulsos fue baja y no cambió entre las semanas 2 y 12, aumentando en la semana 16 y volvió a aumentar en la semana 20 ($P<0.05$), sin más cambios posteriormente.

4.2. Estudio 2. Desarrollo de la respuesta a la administración de GnRH.

4.2.1. Hormona Luteinizante

4.2.1.1. Altura máxima de la secreción de LH después de la administración de GnRH.

El efecto de la interacción genotipo x edad x dosis no fue significativo ($P=0.46$). La interacción edad x genotipo fue significativa ($P=0.046$; Figura 2). Dentro de cada edad, en las semanas 2 y 4 no hubo diferencias ($P>0.05$), pero en la semana 8 Cruza y Pelibuey fueron similares entre sí, con promedios de 12.8 ± 3.3 y 16.8 ± 3.7 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente, pero diferentes ($P<0.05$) del grupo Blackbelly con 6.3 ± 1.6 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, mientras que en la semana 12 los genotipos Blackbelly y Cruza fueron similares entre sí, con 6.7 ± 1.2 y 8.4 ± 1.5 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente, pero diferentes ($P<0.05$) del grupo Pelibuey con 14.1 ± 2.1 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. En las semanas 16 y 20 no hubo diferencias entre genotipos ($P>0.05$); en la semana 24 el genotipo Pelibuey fue diferente de Cruza con 11.6 ± 2.3 y 6.4 ± 1.0 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente, de forma intermedia se mantuvo Blackbelly con 7.1 ± 1.0 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, no siendo diferente de Pelibuey y Cruza ($P>0.05$). En la misma interacción pero dentro de cada genotipo (Cuadro 4), en los corderos Blackbelly la altura máxima de la secreción se alcanza hasta la semana 16 ($P<0.05$) para permanecer sin cambios ($P>0.05$) hasta el final del estudio (con una tendencia descendente), sin embargo para los genotipos Cruza y Pelibuey se alcanza desde la semana 8 ($P<0.05$), en la Cruza hay un descenso en la semana 12 ($P<0.05$) y vuelve a aumentar en la 16 ($P<0.05$) para nuevamente descender en la semana 20 ($P<0.05$) y permanecer sin cambios ($P>0.05$) en la semana 24. Por su parte, Pelibuey se mantiene sin cambios ($P>0.05$) desde la semana 8 hasta la 16 para disminuir ($P<0.05$) en la 20 y una tendencia ascendente, aunque no significativa al final del estudio en la semana 24 ($P>0.05$).

La interacción genotipo x dosis también fue significativa ($P=0.006$; Figura 3). Para la dosis de 3 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso no hubo diferencias entre Blackbelly, Cruza y

Pelibuey con 2.9 ± 0.4 , 2.7 ± 0.4 y 3.14 ± 0.4 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ respectivamente, pero a las dosis de 9 y 27 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$, el genotipo Pelibuey tuvo mayor respuesta que los otros genotipos ($P < 0.05$). A las dosis de 9 y 27 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ el promedio de la altura máxima de Blackbelly, Cruza y Pelibuey fue de 7.1 ± 0.7 , 8.1 ± 0.8 y 10.8 ± 1.1 y 10.5 ± 1.0 , 12.2 ± 1.3 y 19.0 ± 1.6 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ respectivamente.

La interacción dosis x edad fue significativa ($P < 0.001$). Dentro de cada dosis, se observaron diferencias a todas las edades ($P < 0.05$), mostrando una tendencia de incremento en la magnitud de respuesta a mayor dosis administrada (Cuadro 5). Dentro de cada dosis (Cuadro 5), se encontró que con la dosis de 3 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ se observa una tendencia a incrementar la respuesta alcanzando el valor máximo en la semana 12 ($P < 0.05$) permaneciendo sin cambios ($P > 0.05$) hasta la semana 16, para posteriormente disminuir ($P < 0.05$) en la semana 20 y permanecer así sin cambios ($P > 0.05$). Sin embargo, para la dosis de 9 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ la tendencia fue diferente a lo observado con la dosis más baja, durante la semana 2 y 4 no hubo diferencias ($P > 0.05$), en la semana 8 se observó el primer incremento ($P < 0.05$) en la variable de respuesta permaneciendo así hasta la semana 12 ($P > 0.05$), fue en la semana 16 cuando alcanzó el máximo ($P < 0.05$) para posteriormente disminuir en la semana 20 y permanecer sin cambios ($P > 0.05$) hasta el final del estudio. La dosis más alta se comportó de manera diferente a las otras dosis, la menor respuesta fue en la semana 2 diferente ($P < 0.05$) de la semana 4, en las semanas 8 y 16 se alcanza la mayor respuesta ($P < 0.05$), en la semana 12 hubo una disminución ($P < 0.05$) en la magnitud de respuesta siendo diferente ($P < 0.05$) de la semana 8 y 16 y no diferente ($P > 0.05$) de la semana 20 y 24.

El efecto genotipo fue significativo ($P = 0.002$), los corderos Pelibuey tuvieron una mayor respuesta (11.0 ± 0.9 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$), comparada con los otros genotipos, Blackbelly 6.9 ± 0.5 y Cruza y 7.7 ± 0.7 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, sin diferencias ($P = 0.32$) entre estos últimos. El efecto de la edad también fue significativo ($P < 0.001$; Figura 4), las semanas 2 y 4 no fueron diferentes siendo las mediciones de esta variable las más bajas durante el estudio con 3.8 ± 0.4 y 5.3 ± 0.7 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ respectivamente, en la semana 8 se da el primer incremento en la magnitud de la respuesta, con 12.5 ± 2.0 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ manteniéndose sin diferencias durante la semana 12 con 9.8 ± 1.1 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, en la semana 16 se alcanza la altura máxima de la secreción con un promedio de 13.1 ± 1.4 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ para finalmente descender el promedio en

la semana 20 con $8.3 \pm 0.8 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ y permanecer sin cambios ($P=0.98$) por lo menos hasta la semana 24 con $8.5 \pm 1.0 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$. El efecto de la dosis fue significativo ($P<0.001$), las tres dosis fueron diferentes ($P<0.01$) entre sí con una media de 3.0 ± 0.2 , 8.8 ± 0.5 y $14.1 \pm 0.9 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, respectivamente, para 3, 9 y $27 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ de peso corporal.

4.2.1.2. Área bajo la curva (ABC) de respuesta de LH después de la administración de GnRH.

Los efectos de las interacciones genotipo x edad x dosis ($P=0.21$) y genotipo x edad ($P=0.46$) no fueron significativos. La interacción genotipo x dosis tendió a ser significativa ($P=0.06$; Figura 5). Para la dosis de $3 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ de peso no hubo diferencias ($P>0.05$) entre Blackbelly, Cruza y Pelibuey, a la dosis de $9 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ el genotipo Blackbelly fue diferente de Pelibuey ($P=0.01$) mientras que Cruza se mantuvo intermedio ($P>0.05$) entre éstos. A la dosis de $27 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$, el genotipo Pelibuey fue diferente de los otros ($P<0.01$).

La interacción dosis x edad fue significativa ($P<0.001$; Cuadro 6). Dentro de cada edad, las 3 dosis fueron diferentes ($P<0.05$) excepto para la semana 2 y 12. En la semana 2 las dosis de 3 y $9 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ no fueron diferentes entre si ($P>0.05$), pero ambas fueron diferentes ($P<0.05$) de la dosis de $27 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$, mientras que en la semana 12, la dosis de $3 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ fue diferente ($P<0.05$) de las dosis de 9 y $27 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$, estas últimas no fueron diferentes ($P>0.05$) entre si. En la misma interacción pero dentro de cada dosis (Cuadro 6), con la dosis de $3 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ se observa una tendencia a incrementar la respuesta alcanzando el valor máximo en la semana 12 ($P<0.05$) permaneciendo sin cambios ($P>0.05$) (con una tendencia descendente) hasta la semana 16 para posteriormente disminuir ($P<0.05$) en las semanas 20 y 24 sin diferencias entre éstas y las semanas 2 y 4 ($P>0.05$). Sin embargo, para la dosis de $9 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ la tendencia fue diferente a lo observado con la dosis más baja, durante la semana 2 y 4 no hubo diferencias ($P>0.05$), en las semanas 8 y 12 se observó el primer incremento ($P<0.05$), fue en la semana 16 cuando se alcanzó el máximo ($P<0.05$) para posteriormente disminuir en la semana 20 y permanecer sin cambios ($P>0.05$) hasta el final del estudio. La dosis más alta se comportó de manera diferente a las otras dosis, la menor respuesta fue en la semana 2 diferente ($P<0.05$) de la semana 4, en las semanas 8 y 16 se alcanza la mayor respuesta ($P<0.05$),

en la semana 12 hubo una disminución ($P<0.05$) en la magnitud de la respuesta siendo diferente ($P<0.05$) de la semana 8 y 16 y no diferente ($P>0.05$) de la semana 20 y 24.

El efecto genotipo fue significativo ($P=0.01$), los corderos Blackbelly y Cruzados no fueron diferentes ($P>0.05$) entre sí con 489.4 ± 32.5 y 501.4 ± 35.2 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot 3\text{h}^{-1}$, respectivamente, pero ambos fueron diferentes ($P<0.05$) del grupo Pelibuey con una media de 689.1 ± 47.7 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot 3\text{h}^{-1}$. El efecto de la edad fue significativo ($P<0.001$; Figura 6). La semana 2 con 271.9 ± 22.0 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot 3\text{h}^{-1}$ fue diferente ($P<0.05$) de la semana 4 con 345.4 ± 29.1 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot 3\text{h}^{-1}$, las semanas 8, 12 y 16 con 732.1 ± 88.8 , 705.1 ± 60.7 y 786.0 ± 62.7 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot 3\text{h}^{-1}$ respectivamente no fueron diferentes entre si ($P>0.05$) y fue durante este tiempo que la media del ABC se mantuvo más alto, en las semanas 20 y 24 hubo un descenso en la media con 576.8 ± 55.7 y 586.0 ± 64.3 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot 3\text{h}^{-1}$ respectivamente no siendo diferentes entre si ($P>0.05$). El efecto de la dosis también fue significativo ($P<0.001$) siendo diferentes las tres dosis entre sí con 314.6 ± 21.3 , 554.9 ± 32.8 y 825.8 ± 46.0 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot 3\text{h}^{-1}$, respectivamente para las dosis 3, 9 y 27 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$.

4.2.1.3. Magnitud de la respuesta (ΔLH) a la administración de GnRH.

El efecto de la interacción genotipo x edad x dosis ($P=0.44$) no fue significativa. La interacción genotipo x dosis fue significativa ($P=0.03$; Figura 7). Para la dosis de 3 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ no hubo diferencias ($P>0.05$) con 1.2 ± 0.2 , 1.5 ± 0.3 y 1.7 ± 0.4 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente, para Blackbelly, Cruza y Pelibuey. Para la dosis de 9 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ la respuesta más baja se obtuvo en la raza Blackbelly con 5.3 ± 0.7 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ diferente ($P<0.05$) de Pelibuey con 9.1 ± 1.0 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, el grupo Cruza se mantuvo intermedio entre estos dos con 6.6 ± 0.8 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Finalmente para la dosis de 27 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ los genotipos Blackbelly y Cruza no fueron diferentes ($P>0.05$) entre si con 8.8 ± 0.9 y 10.8 ± 1.3 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ respectivamente, pero ambos fueron diferentes ($P<0.05$) de Pelibuey, este último con 17.3 ± 1.6 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

La interacción edad x genotipo tendió a ser significativa dentro de cada edad ($P=0.06$; Figura 8), en las semanas 2 y 4 no hubo diferencias ($P>0.05$), pero en la semana 8 Cruza y Pelibuey fueron similares entre si, con un promedio de 11.2 ± 3.2 y 14.9 ± 3.8 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente, pero diferentes ($P<0.05$) del grupo Blackbelly con 4.9 ± 1.6 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, mientras que en la semana 12 los genotipos Blackbelly y Cruza fueron similares

entre sí, con 4.6 ± 1.1 y 5.8 ± 1.7 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, respectivamente, pero diferentes ($P < 0.05$) del grupo Pelibuey con 11.1 ± 2.4 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$. En las semanas 16 y 20 no hubo diferencias entre genotipos ($P > 0.05$); en la semana 24 el genotipo Pelibuey (10.6 ± 2.1 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) fue diferente ($P < 0.05$) de Cruza (5.7 ± 1.1 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) y Blackbelly (5.0 ± 1.1 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$). En la misma interacción, pero dentro de cada genotipo (Cuadro 7), en los corderos Blackbelly la mayor delta se alcanza hasta la semana 16 ($P < 0.05$) para posteriormente tener una tendencia descendente hasta el final del estudio, sin embargo para los genotipos Cruza y Pelibuey se alcanza desde la semana 8 ($P < 0.05$), para Cruza hay un descenso en la semana 12 ($P < 0.05$) y vuelve a aumentar en la 16 ($P < 0.05$) para nuevamente descender en la semana 20 ($P < 0.05$) y permanecer sin cambios ($P > 0.05$) en la semana 24. Por su parte, el grupo Pelibuey se mantiene sin cambios ($P > 0.05$) desde la semana 8 hasta la 16 para disminuir ($P < 0.05$) en la 20 sin cambios significativos ($P > 0.05$) hasta el final del estudio.

La interacción dosis x edad fue significativa ($P < 0.001$; Cuadro 8). Dentro de cada edad, a todas las edades las tres dosis fueron diferentes ($P < 0.05$) entre sí con la tendencia de a mayor dosis mayor respuesta, excepto en la semana 12 en la que las dosis de 9 y 27 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ no fueron diferentes ($P = 0.25$) entre sí. En la misma interacción pero dentro de cada dosis (Cuadro 8), para la dosis de 3 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ no hubo diferencias desde la semana 2 hasta la 8 ($P > 0.05$), en la semana 12 se incrementa la magnitud de la variable de respuesta alcanzando el valor máximo en la semana 12 ($P < 0.05$), posterior a esto la tendencia fue descendente hasta la semana 20 sin diferencias con la semana 24 ($P > 0.05$). Para la dosis de 9 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ la tendencia fue diferente a lo observado con la dosis más baja, durante la semana 2 y 4 no hubo diferencias ($P > 0.05$), en las semanas 8 y 12 se observó el primer incremento ($P < 0.05$), fue en la semana 16 cuando alcanzó el máximo ($P < 0.05$) para posteriormente disminuir en la semana 20 y permanecer sin cambios ($P > 0.05$) hasta el final del estudio. La dosis más alta se comportó de manera diferente a las otras dosis, la menor respuesta fue en la semana 2, diferente ($P < 0.05$) de la semana 4, en las semanas 8 y 16 se alcanza la mayor respuesta ($P < 0.05$), en la semana 12 hubo una disminución ($P < 0.05$) en la magnitud de respuesta siendo diferente ($P < 0.05$) de la semana 8 y 16 y no diferente ($P > 0.05$) de las semanas 20 y 24.

El efecto del genotipo fue significativo ($P=0.002$). El grupo Pelibuey (9.4 ± 0.9 ng•ml⁻¹) fue diferente de los grupos Blackbelly y Cruza con 5.1 ± 0.5 y 6.3 ± 0.7 ng•ml⁻¹ respectivamente, estos últimos sin diferencias ($P>0.05$) entre ellos.

El efecto edad también fue significativo ($P<0.001$; Figura 9). Las semanas 2 y 4 no fueron diferentes siendo las respuestas más bajas durante el estudio con 3.1 ± 0.4 y 4.3 ± 0.7 ng•ml⁻¹ respectivamente, en la semana 8 se da el primer incremento en la magnitud de respuesta con 10.8 ± 2.0 ng•ml⁻¹ para después disminuir en la semana 12 con 7.3 ± 1.1 ng•ml⁻¹, en la semana 16 hubo un nuevo incremento con 10.6 ± 1.4 ng•ml⁻¹ para después disminuir y permanecer sin cambios durante la semana 20 y 24 con 6.8 ± 0.8 y 7.2 ± 1.0 ng•ml⁻¹ respectivamente. El efecto dosis fue significativo ($P<0.001$), las tres dosis fueron diferentes ($P<0.01$) entre sí con una media de 1.5 ± 0.2 , 7.0 ± 0.5 y 12.4 ± 0.9 ng•ml⁻¹ respectivamente para 3, 9 y 27 ng•kg⁻¹ de peso corporal.

4.2.2. Testosterona

4.2.2.1. Altura máxima de la secreción de testosterona después de la administración de GnRH.

El efecto de las interacciones genotipo x edad x dosis ($P=0.67$), genotipo x dosis ($P=0.41$) y genotipo x edad ($P=0.43$) no fueron significativos. La interacción dosis x edad fue significativa ($P<0.001$; Cuadro 9). Dentro de cada edad, en las semanas 2 y 4 no hubo diferencias en la respuesta a ninguna de las dosis ($P>0.05$), a partir de la semana 8 la dosis de 3 ng•kg⁻¹ fue diferente ($P<0.01$), siendo menor a las dosis de 9 y 27 ng•kg⁻¹, éstas últimas no fueron diferentes entre sí ($P>0.05$). En la misma interacción, pero dentro de cada dosis (Cuadro 9), se observó una tendencia ascendente general para las 3 dosis conforme incrementaba la edad, con la dosis de 3 ng•kg⁻¹ no hubo diferencias ($P>0.05$) desde la semana 2 hasta la semana 12, posteriormente hubo un incremento gradual ($P<0.05$) en las semanas 16 y 20 para finalmente aumentar drásticamente en la semana 24 ($P<0.05$). Las dosis 9 y 27 se comportaron de manera similar, la semana 2 y 4 no fueron diferentes entre sí ($P>0.05$), pero ambas diferentes ($P<0.05$) de la semana 8 y 12, estas últimas sin diferencias entre sí ($P>0.05$), posteriormente se observó un incremento gradual ($P<0.05$) para la semana 16, 20 y 24. El efecto genotipo no fue significativo

aunque se observó cierta tendencia a serlo ($P=0.11$), el grupo Blackbelly ($3.1\pm 0.4 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) fue diferente ($P=0.04$) del grupo Cruza ($3.6\pm 0.3 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) mientras que Pelibuey se mantuvo intermedio entre estos dos con $3.4\pm 0.4 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. El efecto edad también fue significativo ($P<0.001$; Figura 10), las semanas 2 y 4 no fueron diferentes siendo las alturas más bajas durante el estudio con 0.49 ± 0.08 y $0.74\pm 0.10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ respectivamente, en la semana 8 se da el primer incremento en la magnitud de respuesta con $1.34\pm 0.13 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ manteniéndose sin diferencias estadísticas también durante la semana 12 con $1.75\pm 0.19 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ en promedio, en las semanas 16, 20 y 24 se aprecia un incremento a cada edad mencionada con 3.61 ± 0.30 , 5.23 ± 0.38 y 7.85 ± 0.43 respectivamente. El efecto de la dosis fue significativo ($P<0.001$), las tres dosis fueron diferentes ($P<0.05$) entre sí con una media de 2.33 ± 0.31 , 3.74 ± 0.37 y $3.84\pm 0.36 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ respectivamente para las dosis 3, 9 y $27 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal.

4.2.2.2. Área bajo la curva de respuesta de testosterona después de la administración de GnRH.

El efecto de las interacciones genotipo x edad x dosis ($P=0.68$), genotipo x dosis ($P=0.41$) y genotipo x edad ($P=0.64$) no fueron significativos. La interacción dosis x edad fue significativa ($P=0.002$; Cuadro 10). Dentro de cada edad, en la semana 2 la dosis de $3 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ fue la de menor ABC, diferente ($P<0.05$) de la dosis $27 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$, mientras que la dosis $9 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ fue intermedia. En la semana 4 las dosis 3 y $9 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ no fueron diferentes ($P>0.05$) entre sí y ambas menores ($P<0.05$) que la dosis de $27 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$. De la semana 8 a la 20 se comportaron sin cambios siendo la dosis de $3 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ diferente ($P<0.05$) de 9 y $27 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$, estas dos últimas sin diferencias entre ellas ($P>0.05$). Finalmente, en la semana 24 las tres dosis fueron diferentes ($P<0.05$) entre sí. Para la misma interacción pero dentro de cada dosis (Cuadro 10), se observó una tendencia ascendente general para las 3 dosis conforme incrementaba la edad, para la dosis de $3 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ no hubo diferencias ($P>0.05$) entre las semanas 2 y 4, posteriormente hubo un incremento progresivo desde la semana 8 hasta la semana 16 ($P<0.05$), para permanecer sin cambios hasta el final del estudio ($P>0.05$). Para la dosis de $9 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ las semanas 2 y 4 no fueron diferentes ($P>0.05$), en la semana 8 se observó un incremento ($P<0.05$) en la respuesta permaneciendo sin cambios ($P>0.05$) hasta la semana 12, en la semana 16 nuevamente se

observó un incremento ($P < 0.05$) y sin cambios ($P > 0.05$) hasta la semana 24. Finalmente, para la dosis de $27 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ hubo un incremento gradual desde la semana 2 hasta la semana 8 ($P < 0.05$) permaneciendo sin cambios ($P > 0.05$) hasta la semana 12, finalmente en las semanas 16 y 20 hubo aumentos consecutivos ($P < 0.05$), sin cambios en la semana 24 ($P > 0.05$).

El efecto del genotipo tendió a ser significativo ($P = 0.08$), el grupo Blackbelly ($231.8 \pm 28.5 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot 3\text{h}^{-1}$) fue diferente ($P = 0.03$) del grupo Cruza ($281.8 \pm 29.2 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot 3\text{h}^{-1}$) mientras que Pelibuey se mantuvo intermedio entre estos dos con $282.8 \pm 35.9 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot 3\text{h}^{-1}$. El efecto de la edad fue significativo ($P < 0.001$; Figura 11), las semanas 2, 4, 8, 12, 16 y 20 fueron diferentes ($P < 0.05$) con 26.3 ± 4.9 , 42.0 ± 6.5 , 105.1 ± 12.1 , 171.2 ± 19.5 , 378.4 ± 32.6 y $541.6 \pm 39.3 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot 3\text{h}^{-1}$ respectivamente, la semana 24 ($553.7 \pm 58.1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot 3\text{h}^{-1}$) no fue diferente ($P = 0.78$) de la semana 20. El efecto dosis también fue significativo ($P < 0.001$); las tres dosis fueron diferentes ($P < 0.01$) entre sí con una media de 136.0 ± 16.3 , 288.4 ± 29.2 y $372.1 \pm 38.7 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot 3\text{h}^{-1}$ respectivamente para las dosis 3, 9 y $27 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal.

4.2.2.3. Magnitud de la respuesta (Δ Testosterona) a la administración de GnRH.

El efecto de las interacciones genotipo x edad x dosis ($P = 0.65$), genotipo x dosis (0.16) y genotipo x edad ($P = 0.71$) no fueron significativos. La interacción dosis x edad fue significativa ($P < 0.001$; Cuadro 11). Dentro de cada edad, en la semana 2 no hubo diferencia entre las tres dosis ($P > 0.05$). En la semana 4 las dosis 3 y $9 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ no fueron diferentes ($P > 0.05$) entre sí y ambas fueron menores ($P < 0.05$) que $27 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$. A partir de la semana 8 la dosis menor fue diferente ($P < 0.05$) de 9 y $27 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$, estas dos últimas sin diferencias entre ellas ($P > 0.05$). Para la misma interacción pero dentro de cada dosis (Cuadro 11), se observó una tendencia ascendente general e idéntica para las 3 dosis conforme incrementaba la edad, no hubo diferencias ($P > 0.05$) entre la semana 2 y 4, posteriormente hubo un incremento en la semana 8, que se mantuvo en la 12 ($P < 0.05$), a partir de la semana 16 y hasta el final del estudio hubo incrementos en cada edad ($P < 0.05$).

El efecto del genotipo tendió a ser significativo ($P = 0.08$). El grupo Blackbelly ($1.5 \pm 0.2 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) fue diferente ($P = 0.04$) del grupo Cruza ($2.0 \pm 0.3 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) mientras que

Pelibuey se mantuvo intermedio entre estos dos con $1.9 \pm 0.3 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$. El efecto de edad también fue significativo ($P < 0.001$; Figura 12). La semana 2 y 4 no fueron diferentes ($P > 0.05$) con promedios de 0.25 ± 0.06 y $0.36 \pm 0.08 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, en la semana 8 incrementó ($P < 0.05$) ΔT , manteniéndose hasta la semana 12 sin diferencias ($P > 0.05$) con 1.04 ± 0.14 y $0.86 \pm 0.16 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ respectivamente. Las semanas 16, 20 y 24 fueron diferentes ($P < 0.05$) con 1.69 ± 0.23 , 3.02 ± 0.41 y $5.14 \pm 0.52 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ respectivamente. El efecto de la dosis fue significativo ($P < 0.001$), las tres dosis fueron diferentes ($P < 0.05$) entre sí con una media de 0.91 ± 0.22 , 2.11 ± 0.26 y $2.36 \pm 0.28 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ respectivamente para las dosis 3, 9 y 27 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ de peso corporal.

4.3. Peso y circunferencia escrotal

El efecto de la interacción genotipo x edad sobre el peso corporal fue significativo ($P = 0.01$). De la semana 12 en adelante se encontraron diferencias ($P < 0.05$), la tendencia fue siempre la misma, siendo el grupo Blackbelly el más ligero, el grupo Cruza el más pesado y manteniéndose Pelibuey de forma intermedia (Figura 13). El efecto del genotipo fue significativo ($P = 0.002$) siendo el grupo Blackbelly el menos pesado con $18.1 \pm 1.2 \text{ kg}$, diferente ($P < 0.001$) del grupo cruzado con $22.5 \pm 1.4 \text{ kg}$, el grupo Pelibuey no fue diferente de Cruza con $20.3 \pm 1.4 \text{ kg}$ ($P > 0.05$). El efecto edad también fue significativo ($P < 0.001$) en todas las edades ($P < 0.001$).

Referente a la CE, la interacción genotipo x edad y el efecto genotipo no fueron significativos ($P = 0.28$ y $P = 0.32$ respectivamente). El efecto edad fue significativo ($P < 0.001$), encontrando diferencias en todas las edades (Figura 14).

V. Discusión

5.1. Desarrollo de los perfiles de LH y testosterona

La curva de crecimiento tipo sigmoidea coincide con datos reportados para razas de pelo (González *et al.*, 2002; Wheaton y Godfrey, 2003). Las cruza en general mostraron un mayor peso a partir de las 12 semanas posiblemente debido al efecto de la heterosis (Freking *et al.*, 2000). Sin embargo este efecto no se hizo notorio en el crecimiento testicular en nuestro estudio, lo cual contrasta con lo reportado por Notter *et al.* (1985), esto debido posiblemente porque las razas utilizadas en ese estudio fueron Finn x Dorset y el hecho de ser razas tan diferentes entre ellas (en comparación con las usadas en el presente estudio) pudiera potencializar el efecto de la heterosis. Los mismos autores cuando encuentran diferencias en comparaciones entre otras razas en el mismo estudio lo atribuyen al efecto del peso, nosotros probamos incluir el peso como covariable en el modelo y resultó que tampoco había interacción ni efecto de genotipo.

Un resultado inesperado fue que no hubiera diferencias significativas entre genotipos a ninguna de las edades para ninguna de las variables endocrinas analizadas. Creemos que una posible explicación a esto es que debido al origen común de estas razas (Mason, 1980) tuvieran desarrollos endocrinos similares. Estos hallazgos contrastan con diferencias encontradas en cuanto a edad y peso a la pubertad y prolificidad en las hembras de estas razas (González *et al.*, 1991; Velázquez, 1994; Segura *et al.*, 1996). Una posible respuesta a esto es que la hembra Blackbelly sea realmente más precoz que la hembra Pelibuey, mientras que, debido a las diferencias existentes entre sexos en los ovinos en cuanto a edad a la pubertad (Foster y Jackson, 1994) ponga en igualdad de condiciones en cuanto a precocidad a las dos razas en los machos.

Estudios anteriores han descrito histológicamente el crecimiento de los testículos en corderos Blackbelly (Herrera-Alarcón *et al.*, 2007), como reflejo de los cambios morfológicos y funcionales asociados al inicio de la espermatogénesis, que finalmente conllevan a alcanzar la pubertad y la madurez sexual (Klindt *et al.*, 1985). Asimismo, también se ha reportado el punto de inflexión para el crecimiento testicular en esta raza (Jiménez-Severiano *et al.*, 2010). Es posible con base a estos hallazgos suponer hasta ahora que el desarrollo testicular y endocrino es similar entre estas razas.

Según estos resultados, la concentración promedio de LH durante la madurez sexual sigue un patrón similar a lo reportado previamente en la raza Blackbelly (Herrera-Alarcón *et al.*, 2007) y en varias razas de lana (Lee *et al.*, 1976a; Foster *et al.*, 1977; Echternkamp y Lunstra, 1984; Yarney y Sanford, 1989; Rawlings *et al.*, 1991), iniciando con concentraciones bajas durante las primeras semanas de vida (Lee *et al.*, 1976a; Rawlings *et al.*, 1991), alcanzando un máximo, a edades variables, dependiendo de la raza, para después disminuir y mantenerse con pocas variaciones hasta alcanzar la madurez.

Los cambios en la frecuencia y la magnitud de las descargas, así como en los niveles de la concentración basal son los mayores determinantes de la concentración promedio de LH (Foster *et al.*, 1978; Klindt *et al.*, 1985). En nuestro estudio la concentración promedio más alta fue alcanzada a las 8 y 12 semanas de vida, en otro estudio realizado en la raza Blackbelly, tomando una sola muestra cada tres semanas, encontraron que a la semana 6 de edad hay un aumento en la concentración promedio de LH, manteniéndose sin cambios hasta la semana 21, aunque con una tendencia descendente (Herrera-Alarcón *et al.*, 2007). En razas de lana la edad a la que se observa la mayor concentración promedio varía dependiendo de la raza: a los 90 días (12.8 semanas) en cruces Dorset x Leicester x Suffolk (Yarney y Sanford, 1989); a las 11.4 semanas en Suffolk x Finn x Rambouillet (Klindt *et al.*, 1985); a las 8 semanas en Shropshire y Suffolk (Foster *et al.*, 1977), a las 8 y 12 semanas en Finn y Suffolk (Echternkamp y Lunstra, 1984) y a las 5 y 11 semanas en Merino x Corridale (Lee *et al.*, 1976b). Este incremento puede ser interpretado como un cambio en la sensibilidad del eje reproductivo (disminución del efecto de retroalimentación negativa de los esteroides gonadales), representando tal vez el inicio de la pubertad (Lee *et al.*, 1976b; Herrera-Alarcón *et al.*, 2007). El hecho de que este aumento de LH se presente a diferentes edades puede estar relacionado con la prolificidad y/o la precocidad de la raza, observándose más temprano en razas prolíficas (Pelletier *et al.*, 1981; Glatzel, 1988; Lunstra y Echternkamp, 1988; Herrera-Alarcón *et al.*, 2007). Igualmente, este aumento en la concentración promedio de LH se presenta más temprano en razas más precoces (Echternkamp y Lunstra, 1984).

La concentración basal de LH en nuestro estudio fue incrementándose paulatinamente, coincidiendo con lo observado por Yarney y Sandford (1989), pero en contraste con lo reportado por Klindt *et al.* (1985) y Rawlings *et al.* (1991) en corderos de lana, donde la tendencia de esta variable fue similar a la concentración promedio. En razas de lana, otros autores también han reportado que la concentración promedio de los intervalos entre pulsos se mantiene constante (Foster *et al.*, 1978). Aparte del factor genético, las variaciones entre estudios pueden deberse a los diferentes esquemas de muestreos utilizados, a las edades en que se realizaron y a los criterios utilizados para definir las variables de los perfiles hormonales.

Según estos resultados, desde las 2 semanas de vida encontramos la presencia de pulsos, coincidente con lo reportado en la literatura científica para razas de lana (Foster *et al.*, 1977; Savoie *et al.*, 1979; Echterkamp y Lunstra, 1984) indicando que existe un eje reproductivo funcional.

En cuanto a la amplitud de los pulsos, a los 30 días de vida en el presente estudio se tienen valores similares a los reportados en razas de lana a esta edad (Savoie *et al.*, 1979; Yarney y Sanford, 1989), sin embargo en nuestros animales la frecuencia es más alta desde las 2 semanas de vida comparado con lo reportado al mes de vida en corderos de lana (Yarney y Sanford, 1989). En este estudio es hasta los 90 días que la frecuencia de los pulsos de los corderos alcanza un nivel similar al de nuestros animales.

Como ya se mencionó, el mayor determinante de la concentración promedio de LH es la frecuencia de los pulsos (Foster *et al.*, 1978; Klindt *et al.*, 1985); en el presente estudio la mayor frecuencia se observa en la semana 8, pero la mayor concentración promedio se observa en la semana 12, reflejando el hecho del incremento en la frecuencia iniciado un mes antes. Quizá este hecho es el punto que marca el inicio de la pubertad en nuestros corderos (Lee *et al.*, 1976b; Herrera-Alarcón *et al.*, 2007). Otros determinantes de la concentración promedio son los cambios en la magnitud de las descargas, así como la concentración basal (Foster *et al.*, 1978; Klindt *et al.*, 1985); en este estudio la concentración basal alcanza niveles más altos a la semana 12 coincidiendo con la mayor amplitud de los pulsos de LH y la mayor concentración promedio de esta hormona.

En el presente estudio encontramos que entre las 2 y 12 semanas hay un aumento ligero en las concentraciones promedio de T para aumentar drásticamente a las 16

semanas y mantenerse así hasta la semana 20, finalmente a la semana 24 se da un último incremento, lo que coincide con trabajos realizados en razas de pelo como la Blackbelly (Herrera-Alarcón *et al.*, 2007) y en razas de lana (Lee *et al.*, 1976a; Echterkamp y Lunstra, 1984; Klindt *et al.*, 1985; Glatzel, 1988; Yarney y Sanford, 1989). En el presente estudio se observó que la concentración promedio de T a las 2 semanas de edad es menor que para borregos de lana, sin embargo en la semana 8 son similares (Savoie *et al.*, 1979). A las 24 semanas nuestros animales tuvieron valores dentro del mismo rango que corderos de la raza Targhee a la misma edad (Schanbacher *et al.*, 1974); cabe mencionar que estas comparaciones no son directas y deben tomarse con precaución.

El aumento progresivo de la concentración promedio de T hasta las 12 semanas de vida es debido al incremento en la concentración promedio de LH (Foster *et al.*, 1977) y al aumento de la capacidad de respuesta de los testículos al estímulo con LH (Foster *et al.*, 1977; Yarney y Sanford, 1989; Rawlings *et al.*, 1991). Después de alcanzarse los valores más altos de LH en la semana 12, se observó una disminución, probablemente como resultado del establecimiento de los mecanismos de retroalimentación negativa de los esteroides gonadales, principalmente T (Schanbacher, 1980; Rawlings *et al.*, 1991). Las concentraciones de testosterona continuaron aumentando hasta la semana 24, debido probablemente al aumento del número de células de Leydig (Tapanainen *et al.*, 1984; Berardinelli *et al.*, 1984; Monet-Kuntz *et al.*, 1984). También hay mayor actividad esteroidogénica debida a un aumento en el número de receptores para LH (Berardinelli *et al.*, 1984; Yarney y Sanford, 1989; O'Shaughnessy *et al.*, 2002), una mejor actividad enzimática y mayor disponibilidad de colesterol al interior de las células de Leydig (Sanford y Baker, 1990; O'Shaughnessy *et al.*, 2002); esto último como consecuencia del cambio en la frecuencia de los pulsos (Chase *et al.*, 1988). La concentración basal de testosterona fue incrementándose paulatinamente como sucede en corderos de lana (Echterkamp y Lunstra, 1984; Yarney y Sanford, 1989). Se reporta que existe una correlación positiva entre la concentración basal de LH y la concentración promedio y basal de testosterona (Klindt *et al.*, 1985; Chase *et al.*, 1988). La amplitud de los pulsos de testosterona fue aumentando conforme avanzaba la edad de los animales, coincidente con lo reportado para razas de lana (Savoie *et al.*, 1979; Klindt *et al.*, 1985; Yarney y Sanford, 1989).

5.2. Diferencias entre genotipos

El desarrollo de las diversas variables de los perfiles hormonales, sin estimulación exógena, fue similar entre los genotipos estudiados. Sin embargo, al desafiarlos con diferentes dosis de GnRH fue posible identificar algunas diferencias. Las concentraciones promedio antes de cada desafío fueron similares a las concentraciones promedio de los perfiles a edades comparables, lo que permite utilizar como referencia a nuestro primer estudio para explicar las diferencias encontradas en el segundo, a pesar de ser dos estudios diferentes llevados a cabo en épocas distintas, pero en condiciones de manejo y alimentación similares.

En la interacción genotipo x dosis para las variables ALMAX, ABC y Δ LH (Figura 3, 5 y 7 respectivamente), en la dosis más baja (dosis que genera un pulso de LH con características fisiológicas en un animal adulto, ver material y métodos) no se presentaron diferencias entre los tres genotipos, dando soporte a nuestros hallazgos en el estudio 1. De igual forma en las variables ABC y Δ LH tampoco hubo interacción significativa entre genotipo x edad reforzando aún más al primer estudio. A nivel testicular también hay hallazgos en la secreción de testosterona que respaldan los resultados del primer estudio, para ninguna de las variables analizadas hubo interacción significativa en las interacciones genotipo x dosis y genotipo x edad. A pesar de que el efecto genotipo mostró cierta tendencia indicando que hay diferencias entre los grupos estudiados, las razas puras no fueron diferentes entre sí.

Sin embargo, con las dosis mayores (9 y 27 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$) la altura máxima de LH fue mayor en los corderos Pelibuey, lo que indica una mayor capacidad de respuesta por parte de la hipófisis (Evans *et al.*, 1991). De igual forma, la respuesta de los corderos Pelibuey fue superior a los Blackbelly en las semanas 8 y 12. Es precisamente en esas edades cuando se empiezan a presentar los cambios en las características de secreción de GnRH-LH lo que da inicio a la pubertad, según nuestro primer estudio y también a nivel histológico, según lo reportado por Herrera-Alarcón *et al.* (2007). Estos autores observaron que a esas edades también se presenta la mayor tasa de crecimiento de los testículos. En nuestros resultados, los corderos Pelibuey y Cruza alcanzan la altura máxima más temprano (8 semanas antes) que los Blackbelly. Los corderos Pelibuey

tienen una mayor capacidad de respuesta de LH al estímulo exógeno en ciertas edades, pero esto no es suficiente para presentar diferencias a nivel testicular (interacción genotipo x edad no significativa en las variables ALMAX, ABC y ΔT). Estos datos juntos indican una mayor capacidad de respuesta por parte de la hipófisis de los corderos Pelibuey, pero esta mayor capacidad de respuesta no se hace evidente o no tiene repercusiones en cuanto al proceso fisiológico de madurez endocrino (estudio 1). Es posible que este hallazgo pudiera tener algún valor para predecir el desempeño en la vida adulta o en la progenie (Haley *et al.*, 1989; Evans *et al.*, 1991a), sin embargo en el presente estudio no es posible comprobarlo.

Hay que resaltar que las diferencias encontradas son evidentes al administrar GnRH en forma exógena y en dosis supra fisiológicas. Considerando esto, surge otra posible respuesta al no existir diferencias entre genotipos para la dosis de $3 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ (o dosis que generaría un pulso de características fisiológicas en un animal adulto). A pesar de que los corderos Pelibuey tienen una capacidad de respuesta superior que los otros genotipos, es posible que endógenamente sólo se genere el estímulo necesario por parte del hipotálamo para desencadenar los cambios endocrinos asociados con la pubertad por lo que no es diferente del genotipo Blackbelly como se observa en el estudio 1 (Evans *et al.*, 1991a).

Se han realizado trabajos con corderos de diferentes razas donde principalmente buscan diferencias de respuesta en el tiempo a la administración de GnRH; sin ser comparaciones directas, se reporta que para la variable altura máxima en la raza Romney fue alcanzada a las 6 semanas de edad para después disminuir la magnitud de la respuesta conforme aumentaba la edad (Wilson y Lapwood, 1979a). Esto concuerda con nuestros resultados indicando que es posible adquirir esa capacidad de respuesta desde las 8 semanas de vida en borregos Pelibuey. Los resultados que muestran al genotipo Pelibuey con la respuesta más temprana y con la mayor capacidad de respuesta a ciertas edades para la variable altura máxima contrastan con los resultados de un estudio realizado en corderos de lana (Finn, Finngalway y High Fertility), en el que a las 4 y 8 semanas de edad no encontraron efecto en la interacción raza x dosis al desafío con 5, 10, 50 y 100 μg de GnRH (Hanrahan *et al.*, 1981). Cabe mencionar que estas dosis son muy grandes en comparación a las aplicadas en nuestro estudio (a nuestros animales les aplicamos

alrededor de 1µg con la dosis más alta pesando ya casi 40 kg al final del estudio, una quinta parte de la dosis más baja del estudio citado).

5.3. Sensibilidad durante el desarrollo sexual

El efecto dosis fue significativo en todas las variables analizadas tanto de LH como de testosterona y la tendencia siempre fue la misma, a mayor dosis mayor respuesta de la variable, lo cual concuerda con otros trabajos realizados en corderos que fueron desafiados con diferentes dosis de GnRH y mostraron un efecto dependiente de la dosis en la respuesta de LH (Tyrrel *et al.*, 1980; Hanrahan *et al.*, 1981). Ahora bien, nuestros resultados contrastan con lo reportado por Post *et al.* (1987) en bovinos, quienes sólo encontraron respuesta dosis-dependiente en LH mientras que el efecto en testosterona no fue significativo. Una posible explicación a esto es que en el estudio hecho en bovinos, utilizaron dosis extremadamente altas (la dosis más baja fue de 31.25 ng•kg⁻¹ y la más alta de 2000 ng•kg⁻¹). Esta información sugiere que en corderos de pelo la respuesta de los testículos, en términos de secreción de testosterona, también es dosis-dependiente (al menos en el rango de las dosis que aplicamos) y que el rango en el cual la respuesta a un estímulo dosis dependiente es más amplia para LH que para testosterona.

De igual forma el efecto edad es también significativo en nuestro estudio, las dosis administradas durante el desarrollo adquieren matices diferentes en la respuesta para cada edad y cada hormona. Para LH y testosterona las variables Altura máxima y Δ se comportaron de una forma muy similar (solo una sutil deferencia a la semana 8 para LH) conforme avanzaba la edad, la primera variable nos indica la capacidad máxima de respuesta al estímulo, pero ésta puede verse influenciada por la concentración inicial antes del estímulo exógeno, es por esto que decidimos utilizar como covariable la concentración promedio de LH y testosterona antes de aplicar la GnRH resultando significativo el efecto de la covariable.

La variable altura máxima de LH se presentó durante edades tempranas (hasta la semana 4) con la menor respuesta lo que coincide con trabajos que reportan una menor sensibilidad y capacidad de respuesta a edades tempranas (Lee *et al.*, 1976b; Savoie *et al.*, 1979; Glatzel, 1988; Yarney y Sanford, 1989). Posteriormente se percibe un incremento en la magnitud de respuesta provocada por lo que algunos autores interpretan

como el inicio de los cambios endocrinos que inducen los “cambios” fisiológicos asociados con el desarrollo puberal (Foster y Jackson, 1994). Este aumento en la respuesta es producto de la disminución del efecto de la retroalimentación negativa ejercido por los esteroides (Foster *et al.*, 1977) y permite una mayor frecuencia del estímulo ejercido por el hipotálamo, reflejando un incremento en la frecuencia de los pulsos de LH (también fue percibido en nuestro primer estudio a la semana 8), este estímulo provocado por la GnRH endógena propicia una mayor cantidad de receptores a GnRH a nivel de los gonadotropos (Frager *et al.*, 1981; Katt *et al.*, 1985), lo que a su vez genera una mayor síntesis y secreción de LH por parte de la adenohipófisis (Yarney y Sanford, 1989; Bo y Boime, 1992). Este hecho provoca a nivel testicular un efecto de diferenciación de células mesenquimatosas hacia células de Leydig (Berardinelli *et al.*, 1984; Tapanainen *et al.*, 1984; Gnessi *et al.*, 1997; Handagama y Ariyaratne, 2001) y un incremento en su capacidad esteroidogénica (Berardinelli *et al.*, 1984; Yarney y Sanford, 1989; Sanford y Baker, 1990; O’Shaughnessy *et al.*, 2002). Este efecto se ve reflejado en el incremento en la respuesta de testosterona conforme aumenta la edad (Lee *et al.*, 1976a; Savoie *et al.*, 1979). Después de la semana 12 el eje se hace más sensible al efecto de la retroalimentación negativa de testosterona (Schanbacher, 1980; Desjardins, 1981) disminuyendo a la semana 20 la altura máxima de la respuesta de LH manteniéndose sin cambios hasta el final del estudio. Sin embargo, la respuesta de testosterona en la altura máxima y Δ continua aumentando conforme avanza la edad, hasta el final del estudio, en la variable ABC de testosterona deja de verse incrementada hasta la semana 20, reflejo de un proceso de madurez endocrino a nivel testicular (Wilson y Lapwood, 1979b; Yarney y Sanford, 1989). La variable ABC de LH nos indica que entre las semanas 8 y 16 no hay diferencias en la cantidad de LH secretada, pero la altura máxima y Δ LH de la semana 12 en adelante se aprecia una tendencia descendente en la respuesta, esto debido posiblemente a la cantidad de gonadotropinas presentes en la pituitaria (Yarney y Sanford, 1989; Evans *et al.*, 1991b).

La interacción dosis x edad fue significativa para todas las variables analizadas de ambas hormonas, y nos brinda información importante en lo referente a la sensibilidad durante el desarrollo sexual en los corderos. Llama la atención la variable Δ LH y T una vez que la comparamos con la variable Amplitud en el estudio 1 en ambas hormonas. La

dosis de $3\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ fue calculada desde un principio como una dosis que genera pulsos de LH con características fisiológicas en un borrego adulto. Ahora bien, si observamos el desarrollo de la variable Amplitud del estudio 1 y lo comparamos con la variable Δ del segundo estudio en la interacción dosis x edad observamos que la magnitud de la respuesta es más parecida a la dosis de $9\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ que a la de $3\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$. A partir de esto podemos decir que en borregos en desarrollo, la hipófisis y los testículos son incapaces de responder como lo haría un animal adulto a un mismo estímulo (GnRH exógena) debido en parte a que la regulación de la secreción de gonadotropinas es diferente en un animal en desarrollo que en un animal adulto (Olster y Foster, 1988).

En general, el comportamiento de LH y testosterona fue muy similar a lo reportado en otros estudios, el ejemplo más claro es en la variable altura máxima (Cuadro 4), observamos que a mayor dosis y edad existe una mayor respuesta hasta que se alcanza el punto máximo de respuesta en la edad (en nuestro estudio a la semana 12) y comienza una disminución ejercida por el efecto de retroalimentación negativa de testosterona que en nuestro estudio se hizo evidente a la semana 16. Sin embargo a pesar de este efecto de retroalimentación sigue habiendo una diferencia en la respuesta a diferentes dosis en la semana 20 y 24.

Un hallazgo interesante es un fenómeno que sucede entre la semana 8 y 16, es justo a esta edad cuando el efecto de retroalimentación negativa de testosterona se establece y que en nuestro estudio se hace evidente. La altura máxima de LH para la dosis de $3\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ se alcanza a las 12 semanas, mientras que para la dosis de $9\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ es a las 16 semanas y para $27\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ es a la semana 8, sin embargo para la dosis de $27\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ a la semana 12 hay una disminución en la magnitud de respuesta y después se ve incrementada nuevamente en la semana 16. En las tres dosis se hace evidente el efecto de la retroalimentación negativa en las semanas 20 y 24. Esta misma tendencia general se aprecia para las variables ABC y Δ LH. Viéndolo desde otro punto de vista, a la semana 12 al parecer hay una tendencia a disminuir la respuesta para las dosis más altas en las variables ABC y Δ LH, no hay diferencias entre las dosis de 9 y $27\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ a esta edad. En un estudio realizado en corderos de lana machos y hembras (Border-Leicester x Merino) aplicaron dos dosis supra fisiológicas (30 y 60 μg de GnRH) a diferentes edades, encontraron un fenómeno similar a lo que sucede en este estudio en la semana 12 para las

dosis más altas (ellos lo reportan a las 21 semanas de vida). En dicho estudio perciben un descenso en la magnitud de respuesta de los machos y una ligera tendencia de incremento un mes después en el macho sin ser diferente estadísticamente mientras que en las hembras si fue significativo (Tyrrel *et al.*, 1980). Los autores argumentan que este fenómeno en el macho pudiera ser por efecto del fotoperíodo y en la hembra por la misma causa aunado a cambios asociados con la pubertad. Sin embargo, en corderos de pelo que son menos sensibles al efecto del fotoperíodo (Mason, 1980) pudiera explicarse más bien como parte del proceso de madurez endocrino (establecimiento de procesos de retroalimentación) que se lleva a cabo a esta edad (Yarney y Sandford, 1989; Evans *et al.*, 1991b).

En síntesis, el proceso de maduración endocrino del eje reproductivo no es diferente entre las razas de pelo estudiadas. En borregos en desarrollo, la hipófisis y los testículos son incapaces de responder como lo haría un animal adulto a un mismo estímulo. La capacidad de respuesta de la hipófisis del genotipo Pelibuey es mayor y más precoz. Se detectó un eje reproductivo activo y funcional desde las 2 semanas de vida. El efecto de retroalimentación negativa de los andrógenos se hace evidente entre las semanas 12 y 16 de vida. Las dosis supra fisiológicas de GnRH usadas son capaces de generar una respuesta del eje, a nivel de la hipófisis ésta es dosis dependiente no así a nivel testicular.

VI. Conclusión

Estos resultados indican que el proceso de maduración endocrino del eje reproductivo no es diferente entre las razas de pelo estudiadas, sin embargo la capacidad de respuesta de la hipófisis del genotipo Pelibuey al desafío con GnRH exógena es mayor y más precoz. Las evidencias encontradas no apoyan nuestra hipótesis de trabajo.

VII. Literatura citada

- Almquist, JO, Branas, RJ and Barber, KA. 1976. Postpuberal changes in semen production of charolais bulls ejaculated at high frequency and the relation between testicular measurements and sperm output. *J Anim Sci.* 42:670-676.
- Amann, RP. 1983. Endocrine changes associated with onset of spermatogenesis in Holstein bulls. *J Dairy Sci.* 66:2606-2622.
- Aponte, PM, de Rooij, DG and Bastidas, P. 2005. Testicular development in Brahman bulls. *Theriogenology.* 64:1440-1455.
- Banks, WJ. 1996. Aparato reproductor masculino. En: *Histología Veterinaria Aplicada. Segunda edición en español. Manual Moderno.*
- Bartke, A and Voglmayr, JK. 1977. Effects of gonadotropins on androgen levels in *rete testis* fluid of the ram. *Biol Reprod.* 16:274-280.
- Belchetz, PE, Plant, TM, Nakai, Y, Keogh, EJ, and Knobil, E. 1978. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophthalmic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 202, 631-633.
- Berardinelli, JG, Allrich, RD, Ford, JJ, Christenson, RK and Anderson, LL. 1984. Characterization of luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin receptor and its relationships to testicular development and steroidogenesis during sexual maturation in boars. *Endocrinology.* 114:240-246.
- Berndtson, WE, Igboeli, G and Pickett, BW. 1987. Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. *J anim Sci.* 64:241-246.
- Berne, RM, Levy, MN, Koeppen, BM, and Stanton, BA, 2004. *Physiology.* Fifth edition. 819-839.
- Bilezikjian, LM Blount, AL, Donaldson, CJ and Vale, WW. 2006. Focus on TGF- β signalling pituitary actions of ligands of the TGF- β family: activins and inhibins. *Reproduction.* 132:207-215.
- Bless, EP, Westaway, WA, Schwarting, GA and Tobet, SA. 2000. Effects of aminobutyric acidA receptor manipulation on migrating gonadotropin-releasing hormone neurons through the entire migratory route *in vivo* and *in vitro*. *Molecular and cellular Endocrinology.* 141:254-262
- Bo, M and Boime, I. 1992. Identification of the transcriptionally active genes of the chorionic gonadotropin β gene cluster *in vitro*. *J Biol Chem.* 267:3179-3184.
- Borland, K, Mita, M, Oppenheimer, CL, Blinderman, LA, Massague, J, Hall, PF and Czech, MP. 1984. The actions of insulin-like growth factors I and II on cultured Sertoli cells. *Endocrinology.* 114:240-246.
- Bousfield, GR, Jia, L and Ward, DN. Gonadotropins: chemistry and biosynthesis. In: Knobil E, Neil JD (eds.). *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. New York: Raven Press Ltd: 1994: 1581-1625.
- Bremner, WJ, Findlay, JK, Cumming, IA, Hudson, B and De Kretser, DM. 1976. pituitary-testicular responses in rams to prolonged infusions of luteinizing hormone-releasing hormone (LH RH). *Biol Reprod.* 15:141-146.
- Bunick, D, Kirby, J, Hess, RA and Cooke, PS. 1994 . Developmental expression of testis messenger ribonucleic acids in the rat following propylthiouracil-induced neonatal hypothyroidism. *Biol Reprod* 51:706-713.

- Buzzard, JJ, Morrison, JR, O'Bryan, MK, Song, Q and Wreford, NG. 2000. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol Reprod* 62:664–669.
- Castellano, JM, Navarro, VM, Fernández-Fernández, R, Nogueiras, R, Tovar, S, Roa, J, Vázquez, MJ, Vigo, E, Casanueva, FF, Aguilar, E, Pinilla, L, Dieguez, C and Tena-Sempere, M. 2005. Changes in hypothalamic Kiss-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* 146, 3917–3925.
- Cederroth, CR, Pitetti, JL, Papaioannou, MD and Nef, S. 2007. Genetic programs that regulate testicular and ovarian development. *Mol Cell Endo.* 265–266. 3–9.
- Chase, DJ, Schanbacher, BD and Lundstra, DD. E. 1988. Effects of pulsatile and continuous luteinizing hormone (LH) infusions on testosterone responses to LH in rams actively immunized against gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology.* 123:816-826.
- Clarke, IJ, Brown, BW, Tran, VV, Scott, CJ, Fry, R, Millar, RP and Rao, A. 1998. Neonatal immunization against gonadotropin-releasing hormone (GnRH) results in diminished GnRH secretion in adulthood. *Endocrinology.* 139:2007-2014.
- Clarkson, J and Herbison, AE. 2006. Development of GABA and glutamate signaling at the GnRH neuron in relation to puberty. *Mol Cell Endo.* 254–255. 32–38.
- Cone, RD, Low, MJ, Elmquist, JK and Cameron, JL. Neuroendocrinology. Section two: Hypothalamus and pituitary. In: Reed, PL, Kronenberg, HM, Melmed, S and Polonsky, KS. *Williams Textbook of Endocrinology*, 3th ed. Pennsylvania: Elsevier Science; 2003:81-176.
- Cooke, PS, Zhao, YD and Bunick, D. 1994. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. *Biol Reprod.* 51:1000–1005.
- Curtis, SK and Amann, RP. 1981. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. *J Anim Sci.* 53(6)1645:1657.
- de Roux, N, Genin, E, Carel, JC, Matsuda, F, Chaussain, JL and Milgrom, E. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the Kiss1-derived peptide receptor GPR54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 10972–10976.
- Desjardins, C. 1981. Endocrine signaling and male reproduction. *Biol Reprod.* 24:1-21.
- Dhillon, WS, Chaudhri, OB, Patterson, M, Thompson, EL, Murphy, KG, Badman, MK, McGowan, BM, Amber, V, Patel, S, Ghatei, MA, and Bloom, SR. 2005. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 12:6609–6615
- Duittoz, AH and Batailler, M 2000. Pulsatile GnRH secretion from primary cultures of sheep olfactory placode explants. *Journal of Reproduction and Fertility.* 120:391–396.
- Dungan, HM, Clifton, DK and Steiner, RA. 2006. Kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology.* 147:1154–1158.
- Dym, M and Fawcett, D. 1970. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentalization of the seminiferous epithelium. *Biol reprod.* 3:308-326.
- Ebling, JP. 2005. The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction.* 129, 675-683.

- Echternkamp, SE and Lunstra, DD. 1984. Relationship between LH and testicular development in progesterone-implanted prepubertal ram lambs. *J Anim Sci.* 59:441-453.
- Evans, NP, Land, RB, McNeilly, JR and Webb b, R. 1991. Role of gonadal negative feedback on the gonadotrophin responses to gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in ram lambs from two lines of sheep selected for their luteinizing hormone response to GnRH. *J Reprod Fert.* 93:549-558.
- Evans, NP, McNeilly, JR, Springbett, AJ and Webb, R a. 1991. Alterations in pituitary gland sensitivity in ram lambs to physiological doses of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH), after divergent selection based on the luteinizing hormone response to a pharmacological GnRH challenge. *J Reprod Fert.*93:559-567.
- Foster, DL and Jackson, LM. Puberty in sheep. In: Knobil E, Neil JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. New York: Raven Press Ltd; 1994:2127-2185.
- Foster, DL, Jackson, LM and Padmanabhan, V. 2006. Programming of GnRH feedback controls timing puberty and adult reproductive activity. *Molecular and Cell Endocrinology.* 254–255. 109-119.
- Foster, DL, Mickelson, IH, Ryan, KD, Coon, GA, Drongowski, RA and Holt, JA. 1977. Ontogeny of pulsatile luteinizing hormone and testosterone secretion in male lambs. *Endocrinology.* 102 4:1137-1146.
- Foster, DL, Mickelson, IH, Ryan, KD, Coon, GA, Drongowski, RA and Holt, JA. 1978. Ontogeny of pulsatile luteinizing hormone and testosterone secretion in male lambs. *Endocrinology.* 102 4:1137-1146.
- Fragar, MS, Pieper, DR, Tonetta, S, Duncan, JA and Marshal, JC. 1981. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors: effects of castrations, steroid replacement, and the role of GnRH in modulating receptors in the rat. *J Clin Invest.* 67:615-623.
- Francavilla, S, Cordeschi, G, Properzi, G, Di Cicco, L, Jannini, EA, Palmero, S, Fugaza, JE, Loras, B and D´Amiento. 1991. Effect of thyroid hormona on the pre- and post-natal development of the rat testis. *J Endocrinol.* 129:35-42.
- Freking, BA, Leymaster, KA and Young, LD. 2000. Evaluation of Dorset, Finnsheep, Romanov, Texel, and Montadale breeds of sheep: I. Effects of ram breed on productivity of ewes of two crossbred populations. *J. Anim. Sci.* 78:1422–1429.
- Gamble, JA, Karunadasa, DK, Pape, JR, Skynner, MJ, Todman, MG, Bicknell, RJ, Allen, JP and Herbison, AE. 2005. Disruption of ephrin signaling associates with disordered axophilic migration of the gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci.* 25:3142–3150
- George, FW and Wilson, JD. Sex determination and differentiation. In: Knobil E, Neil JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. New York: Raven Press Ltd; 1994: 3–28.
- Giacobini, P, Kopin, AS, Beart, PM, Mercer, LD, Fasolo, A and Wray, S. 2004. Cholecystokinin modulates migration of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *The Journal of Neuroscience.* 24:4737– 4748.
- Glatzel, P. 1988. Variation in hormonal feedback and reproductive performance in rams of different genotypes from birth through puberty. *Institut Agronomique et Veterinaire. Morocco. Octobre. Vol.30. No.4.*

- Gnessi, L, Fabbri, LA and Spera, G. 1997. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocrine Reviews*. Vol 18. No. 4. 541-609.
- Gondos, PD and Berndston, WE. 1993. Postnatal and pubertal development. *The Sertoli Cell*. By Rusell, LD and Griswold, MD. Cache River Press. Clearwater FL. pp 115.153.
- González, AR, Valencia, MJ, Foote, WC and Murphy, BD. 1991. Hair sheep in México: reproduction in the Pelibuey sheep. *Anim. Breed. Abstr.* 59, 509-524.
- González, GR, Torres, HG y Castillo, AM. 2002. Crecimiento de corderos BlackBelly entre el nacimiento y el peso final en el trópico húmedo de México. *Vet. Méx.* 33(4).
- Google Earth. 2009. Google, Inc., California, USA. <http://www.earth.google.com> Consultado en línea el 10 de diciembre de 2009.
- Gore, AC, Wu, TJ, Rosenberg, JJ and Roberts, JL. Gonadotropin-releasing hormone and NMDA receptor gene expression and colocalization change during puberty in female rats. *J. Neurosci.* 16:5281–5289, 1996.
- Granner, DK. Hormonas de las gónadas. En: Murray, RK, Granner, DK, Mayes, PA and Rodwell, VW. 2001. *Bioquímica de Harper. Manual Moderno*.
- Granner, DK. La diversidad del sistema endocrino. In: Murray, RK, Granner, DK, Mayes, PA and Rodwell, VW. *Harper Bioquímica Ilustrada*. 16th edition. Manual Moderno. 2003. 485-507.
- Griffin, JE and Wilson, JD. Disorders of the testes and the male reproductive tract. In: Larsen, PR, Kronenberg, HM, Melmed, S and Polonsky, KS (eds.), *Williams Textbook of Endocrinology*, 10nd ed. Philadelphia: Elsevier Science; 2003:709-769.
- Griswold MD, McLean D. The Sertoli cell. In: Neill JD, editor. 3rd ed., *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, vol. 1, 3rd ed. St. Louis, MO: Elsevier Academic Press; 2006. pp. 949–75.
- Hafez, ESEa. Anatomía del aparato reproductor del macho. En: Hafez, ESE and Hafez, B. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 7° ed. McGraw-Hill Interamericana. 2000:3-12.
- Hafez, ESEb, Jainudeen, MR and Rosnina, Y. Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. En: Hafez, ESE and Hafez, B. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 7° ed. McGraw-Hill Interamericana. 2000:33-55.
- Haley, CS, Lee, GJ, Fordyce, M, Baxter, G, Land, RB and Webb, R. 1989. Study of LH response to GnRH in the young male as a criterion of genetic merit for female reproduction in sheep. *J Reprod Fert.* 86:119-133.
- Han, SK, Gottsch, ML, Lee, KJ, Popa, SM, Smith, JT, Jakawich, SK, Clifton, DK, Steiner, RA, Herbison, AE. 2005. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by Kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci.* 25:11349–11356
- Handagama, CM and Ariyaratne, S. 2001. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod.* 65:660-671.
- Hanrahan, JP, Quirke, JF and Gosling, JP. 1981. Effect of lamb age, breed and sex on plasma LH after administration of GnRH. *J Anim Sci.* 61:281-288.
- Herbison, AE. Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network. In: Knobil E, Neil JD (eds.). *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. New York: Raven Press Ltd; 1994: 1415–1482.

- Herrera-Alarcón, J, Villagómez-Amézcuca, E, González-Padilla, E and Jiménez-Severiano, H. 2007. Stereological study of postnatal testicular development in Blackbelly sheep. *Theriogenology*. 68(4):582-591.
- Hess, RA, Cooke, PS, Bunick, D and Kirby, JD. 1993. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. *Endocrinology* 132: 2607–2613.
- Hirobe, S, He, WW, Lee, MM and Donahoe, PK. 1992. Mullerin inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinology*. 131:854-862.
- Hochereau-de-Reviere MT, Monet-Kunts C, Courot M. 1987. Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *J Reprod Fertil. Suppl.* 34:101–14.
- Holsberger, DR, Kiesewetter, SE and Cooke, PS. 2005. Regulation of neonatal Sertoli cell development by thyroid hormone receptor $\alpha 1$. *Biol Reprod*. 73:396-403
- Hutson, JC. 2006. Physiologic interactions between macrophages and Leydig cells. *Exp Biol Med*. 231:1–7.
- INAFED. 2005. Enciclopedia de los municipios de Querétaro, Colón. <http://www.inafed.gob.mx/work/templates/enciclo/queretaro/municipios/22005a.htm> Consultado en línea el día 22 de septiembre de 2009.
- Jeong, KH and Kaiser, UB. Gonadotropin-releasing hormone regulation of gonadotropin biosynthesis and secretion. In: Knobil E, Neil JD (eds.). *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. New York: Raven Press Ltd; 1994:1635-1677.
- Jiménez-Severiano H, Jiménez-Krassel F, Menéndez-Trejo M. 1996. Endocrine and testicular responses of prepubertal Zebu crossbred bulls to active immunization against testosterone. *Anim Reprod Sci.* 41:169–81.
- Jiménez-Severiano, H, MJ D’Occhio, DD Lunstra, ML Mussard, TL Davis, WJ. Enright and JE Kinder. 2007. Comparative response of rams and bulls to long-term treatment with gonadotropin-releasing hormone analogs. *Anim Reprod Sci. Anim Reprod Sci.*, 98(3-4):204-224.
- Jiménez-Severiano, H, Reynoso, L, Román-Ponce, S and Robledo, V. 2010. Evaluation of mathematical models to describe testicular growth in Blackbelly ram lambs. (in press). DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.05.007.
- Jiménez-Severiano, H. 2001. Endocrine and testicular responses of male cattle and sheep to chronic treatment with analogs of GnRH. PhD Diss. Nebraska State Univ., Lincoln.
- Juengel, JL, Sawyer, HR, Smith, PR, Quirke, LD, Heath, DA, Lun, S, Wakefield, SJ and McNatty, K.P. 2002. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191. 1-10.
- Katt, JA, Duncan, JA, Herbon, L, Barkan, A and Marshall, JC. 1985. The frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation determines the number of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology*. 116:2113-2115.
- Kerr, JB, Loveland, KL, O’Byrne, MK and Krester, DM. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. In: Knobil E, Neil JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. New York: Raven Press Ltd; 1994: 3–28.
- Kim, S, Foster, DL, and Wood, RI. 1999. Prenatal testosterone masculinizes synaptic input to gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Biol Reprod*. 61, 599-605.

- Kirby, JD, Jetton, AE, Cooke, PS, Hess, RA, Bunick, D, Ackland, JF, Turek, FW and Schwartz, NB. 1992. Developmental hormonal profiles accompanying the neonatal hypothyroidism-induced increase in adult testicular size and sperm production in the rat. *Endocrinology*. 131:559-565.
- Klindt, J, Ohlson, DL, Davis, SL and Schanbacher, BD. 1985. Ontogeny of growth hormone, prolactin, luteinizing hormone, and testosterone secretory patterns in the ram. *Biol Reprod*. 33:436-444.
- Klinefelter, GR, Hall, PF and Ewing, LL. 1987. Effect of luteinizing hormone deprivation in situ on steroidogenesis of rat leydig cells purified by a multistep procedure. *Biol Reprod*. 36:769-783.
- Kotani, M, Detheux, M, Vandenberghe, A, Communi, D, Vanderwinden, JM, Le Poul, E, Brezillon, S, Tyldesley, R, Suarez-Huerta, N, Vandeput, F, Blanpain, C, Schiffmann, SN, Vassart, G and Parmentier, M. 2001. The metastasis suppressor gene Kiss-1 encodes Kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem*. 276, 34631–34636.
- Land, RB. 1978. Reproduction in young sheep: Some genetic and environmental sources of variation. *J Reprod Fertil*. 52:427-436.
- Lee VW, Cumming IA, de Kretser DM, Findlay JK, Hudson B, Keogh EJ a. Regulation of gonadotrophin secretion in rams from birth to sexual maturity II. Response of the pituitary-testicular axis to LH-RH infusion. *J Reprod Fertil* 1976;46:7–11.
- Lee VW, Cumming IA, de Kretser DM, Findlay JK, Hudson B, Keogh EJ b. Regulation of gonadotrophin secretion in rams from birth to sexual maturity II. Response of the pituitary-testicular axis to LH-RH infusion. *J Reprod Fertil* 1976;46:7–11.
- Littell, RC, Milliken, GA, Stroup, WW, Wolfinger, RD., 1996. SAS® System for Mixed Models. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Lucas, JR, Notter, DR, McClaugherty, FS, Anderson, GW and Gwazdauskas, FS. 1983. Breed differences in testicular growth and gonadotropin secretion in prepubertal ram lambs. *Theriogenology*. 19(5):749-758.
- Lunstra, DD and Echtenkamp, SE. 1988. Repetitive testicular biopsy in the ram during pubertal development. *Theriogenology*. Vol 29. 4:803-810.
- Lunstra, DD, Ford, JJ and Echtenkamp, SE. 1978. Puberty in beef bulls: hormone concentration, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. *J Anim Sci*. 46:1054-1062.
- Márquez, YC y Gutiérrez, C. 2006. Desarrollo embrionario y diferenciación sexual. En: Galina, C y Valencia, J (eds.). *Reproducción en Animales Domésticos*. México, DF. Limusa. 11-26.
- Martinez, AJ, Hu, L, Krsmanovic, LZ and Catt, KJ. 2004. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor expression and membrane signaling in early embryonic GnRH neurons: role in pulsatile neurosecretion. *Mol Endocrinol*. 18:1808–1817.
- Mason, IL. 1980. Prolific Tropical Sheep. Paper No. 17. FAO. Rome.
- McCarthy, MS, Hafs, HD and Convey, M. 1979. Serum hormone patterns associated with growth and sexual development in bulls. *J Anim Sci*. 49:1012-1020.
- Merriam, GR, Wachter, KW. 1982. Algorithms for the study of episodic hormone secretion. *Am J Physiol*. 243, E310–E318.
- Messenger, S, Chatzidaki, EE, Ma, D, Hendrick, AG, Zahn, D, Dixon, J, Thresher, RR, Malinge, I, Lomet, D, Carlton, MB, Colledge, WH, Caraty, A and Aparicio, SA,

2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone secretion via G protein-coupled receptor 54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1761–1766.
- Mita, M, Prince, JM and Hall, PF. 1982. Stimulation by follicle-stimulating hormone of synthesis of lactate by Sertoli cells from rat testis. *Endocrinology*. 110:1535-1541.
- Monet-Kuntz, C, Hochereau-de-Reviere Marie-Térèse and Terqui, M. 1984. Variations in testicular androgen receptors and histology of the lamb testis from birth to puberty. *J Reprod Fert.* 70:203-210.
- Muir, AI, Chamberlain, L, Elshourbagy, NA, Michalovich, D, Moore, DJ, Calamari, A, Szekeres, PG, Sarau, HM, Chambers, JK, Murdock, P, Stepkowski, K, Shabon, U, Miller, JE, Middleton, SE, Darker, JG, Larminie, CGC, Wilson, S, Bergsma, DJ, Emson, P, Faull, R, Philpott, KL and Harrison, DC. 2001. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide Kiss-1. *J. Biol Chem.* 276, 28969–28975.
- Navarro, VM, Fernandez-Fernandez, R, Castellano, JM, Roa, J, Mayen, A, Barreiro, ML, Gaytan, F, Aguilar, E, Pinilla, L, Dieguez, C and Tena- Sempere, M, 2004. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by Kiss-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J. Physiol.* 561, 379–386.
- Notter, DR, Lucas, JR, McClagherty, FS and Copenhaver, JS. 1985. Breed group differences in testicular growth patterns in spring-born ram lambs. *J Anim Sci.* 60:622-631.
- O’Shaughnessy, PJ, Willerton, L and Baker, PJ. 2002. Changes in Leydig Cell Gene Expression During Development in the Mouse. *Biol Reprod.* 66:966-975.
- Ojeda SR and Skinner, MK. 2005. Puberty in the rat. In: Neill JD, ed. *The physiology of reproduction*. 3rd ed. San Diego: Academic Press/Elsevier; 2061–2126.
- Olster, DH and Foster, DL. 1988. Control of gonadotrophin secretion during the pubertal and seasonal transitions in the male sheep. *J Reprod Fert.* 82:179-191.
- Orth, JM and Christensen, AK. 1978. Autoradiographic localization of specifically bound I125-labeled follicle stimulating hormone on spermatogonia of the rat testis. *Endocrinology.* 103:1944-1951.
- Palmero, S, De Marchis, M, Gallo, G and Fugaza, e. 1989. Thyroid hormona affects the development of sertoli cell function in the rat. *J Endocrinol.* 123:105-111.
- Parker, KL and Schimmer, BP. 1997. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocrine Reviews.* Vol. 18. No. 3. 361-377.
- Payne, AH and Youngblood, JL. 1995. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in leydig cells. *Biol Reprod.* 52:217-225.
- Pelletier J, Carrez-Camous S and Thiery JC. 1981. Basic neuroendocrine events before puberty in cattle, sheep and pigs. *J Reprod Fert. Suppl.* 30:91–102.
- Plant, TM, Barker-Gibb, ML, 2004. Neurobiological mechanisms of puberty in higher primates. *Hum. Reprod. Update* 10, 67–77.
- Post, TB, Reich, MM, and Bindon, BM. 1987. Characterization of LH and testosterone responses to intramuscular injection of GnRH in tropical postpuberal bulls. *Theriogenology.* 27:305-315.
- Quirke, LD, Juengel, JL, Tisdall, DJ and Lun, S, Heath, DA and McNatty, KP. 2001. Ontogeny of steroidogenesis in the fetal sheep gonad. *Biol Reprod.* 65:216-228.
- Rajaniemi, H.J., Keinanen, K.P., Kellokumpu, S., Petaja-Repo, U.E. and Metsikko, M.K. 1989. Molecular structure of the luteinizing hormone receptor. *Biol Reprod.* 40:1-12.

- Rawlings, NC, Churchill, IJ, Currie, WD and Joseph, IBJK. 1991. Maturational changes in opioidergic control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in ram lambs. *J Reprod Fert.* 93:1-7.
- Robinson, JE, Forsdike, RA and Taylor, JA. 1999. In utero exposure of female lambs to testosterone reduces the sensitivity of the GnRH neuronal network to inhibition by progesterone. *Endocrinology* 140, 5797–5805.
- Romanelli, RG, Barni, T, Maggi, M, Luconi, M, Failli, P, Pezzatini, A, Morelli, A, Maggi, R, Zaninetti, R, Salerno, R, Ambrosini, S, Marini, M, Rotella, CM, Vannelli, GB. 2005. Role of endothelin-1 in the migration of human olfactory gonadotropin-releasing hormone-secreting neuroblasts. *Endocrinology.* 146: 4321–4330
- Saez, JM. 1994. Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocrine Reviews.* Vol. 15. No. 5. 574-626.
- Samuelson, DA. Male reproductive system. In: Samuelson, DA. *Textbook of Veterinary Histology.* 1st ed. Missouri: Saunders Elsevier; 2007: 418-441.
- Sandford, LM, Palmer, WM and Howland, BE. 1982. Influence of age and breed on circulating LH, FSH and testosterone levels in the ram. *Can J Anim Sci.* 62:767-776.
- Sanford, LM and Baker, SJ. 1990. Enhanced testosterone secretion in adult rams after establishment of a high-frequency, low-amplitude pattern of LH pulses in the nonbreeding season occurs without changes in the number or binding affinity of testicular LH receptors. *Euro J Endo.* Vol 122 1:55-61.
- Sanford, LM, Palmer, WM and Howland, BE. 1977. Changes in the profiles of serum LH, FSH and testosterone, and in mating performance and ejaculate volume in the ram during the ovine breeding season. *J Anim Sci.* 45:1382-1391.
- Savoie, S, Forest, MG, Bourel, B, Saez, JM, Collu, R, Bertrand, J and Ducharme, JR. 1979. Perinatal activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the lamb. I. Circulating levels of LH, FSH, prolactin and testosterone and in vivo response to hCG in the first two months of life. *Biol Reprod.* 21:1051-1056.
- Schanbacher, BD, Gomes, WR and VanDemark, NL. 1974. Developmental changes in spermatogenesis, testicular carnitine acetyltransferase activity and serum testosterone in the ram. *J Anim Sci.* 39:889-892.
- Schanbacher, BD. 1980. Testosterone regulation of Luteinizing Hormone and Follicle Stimulating Hormone secretion in young lambs. *J Anim Sci.* Vol. 51. 3:679-684.
- Schneyer, A, Sluss, P, Whitcomb, R, Martin, K, Sprengel, R and Crowley, J. 1991. Precursors of alpha inhibin modulate follicle-stimulating hormone receptor binding and biological activity. *Endocrinology.* 129:1987:1990.
- Segura, JC, Sarmiento, L and Rojas, O. 1996. Productivity of Pelibuey and Blackbelly ewes in Mexico under extensive management. *S Rm Res.* 21:57-62.
- Seminara, SB, Messenger, S, Chatzidaki, EE, Thresher, RR, Acierno, JS, Shagoury, JK, Bo-Abbas, Y, Kuohung, W, Schwino, KM, Hendrick, G, Zahn, D, Dixon, J, Kaiser, UB, Slaugenhaupt, SA, Gusella, JF, O’Rahilly, S, Carlton, MB, Crowley, WF, Aparicio, SA and Colledge, WH. 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New Engl J Med.* 349, 1614–1627.
- Seminara, SB. 2005. Kisspeptin and the male gonadal axis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* December. 90. 6738–6740.

- Senger, PL. Regulation of reproduction- nerves, hormones and target tissues. In: Senger, PL. Pathways to pregnancy and parturition. 2nd ed. Washington: Current Conceptions, Inc. 2003:102-127.
- Shahab, M, Mastronardi, C, Seminara, SB, Crowley, WF, Ojeda, SR and Plant, TM. 2005. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci.* 102:2129–2134.
- Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *J Reprod Fertil.* 125:769–84.
- Singh J and Handelsman DJ. 1996. Neonatal administration of FSH increases Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *J Endocrinol.* 151:37–48.
- Skinner, JD. 1971. Post-natal development of the reproductive tract in the Dorper ram. *Agroanimalia.* 3:7-12.
- Srivasatava, CH, Kelley, MR, Monts, BS, Wilson, TM, Breyer, PR and Pescovitz, OH. 1994. Growth hormone-releasing hormone receptor mRNA is present in rat testis. *Endocrine* 2:607–610.
- Steinberger A, Steinberg E. 1971. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis *in vivo* and in organ culture. *Biol Reprod.*4:84–7.
- Stocco, DM. 1997. A StAR Search: Implications in controlling steroidogenesis. *Biol Reprod.* 56:328-336.
- Stocco, RE and Breslow, JL. 2004. Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1150-1160.
- Stocco, DM and McPhaul, MJ. Physiology of testicular steroidogenesis. In: Knobil E, Neil JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. New York: Raven Press Ltd; 1994:2127-2185.
- Tapanainen, J, Kuopio, T, Pelliniemi, LJ and Huhtaniemi, I. 1984. Rat testicular endogenous steroids and number of Leydig cells between the fetal period and sexual maturity. *Biol Reprod.* 31:1027-1035.
- Tena-Sempere, M. 2006. GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Hum Reprod Upd.* Vol.12, No.5 pp. 631–639.
- Tobet, SA and Schwarting, GA. 2006. Recent progress in gonadotropin-releasing hormone neuronal migration. *Endocrinology.* 147: 1159–1165.
- Tyrrell, RN, Starr, BG, Restall, BJ and Donnelly, JB. 1980. Repeatability of LH responses by lambs to monthly challenge with synthetic gonadotrophin releasing hormone (GnRH). *Anim Reprod Sci.* 3:155-160.
- Van Haaster LH, De Jong FH, Docter R, De Rooij DG. 1993. High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. *Endocrinology.* 133:755–60.
- Velázquez, MPA, 1994. Crossbreeding among tropical and temperate breeds of sheep. *Memorias del curso de actualización de ovinos.* Toluca. Edo de México. México. 165-173.
- Vogl, AW. 1988. Changes in the distribution of microtubules in rat Sertoli cells during Spermatogenesis. *Anat Rec.* 222:34-41.

- Wheaton, JE and Godfrey, RW. 2003. Plasma LH, FSH, testosterone, and age at puberty in ram lambs actively immunized against an inhibin α -subunit peptide. *Theriogenology*. 60:933-941.
- Whitlock, KE, Illing, N, Brideau, NJ, Smith, KM and Twomeya, S. 2006. Development of GnRH cells: setting the stage for puberty. *Mol and Cell Endo*. 254–255. 39–50.
- Wilhelm, D and Koopman, P. 2006. The makings of maleness: towards an integrated view of male sexual development. *Nat Rev Genet*. 7:620–631.
- Wilson, PR and Lapwood, KR a. 1979. Studies of reproductive development in Romney rams, I. Basal levels and plasma profiles of LH, testosterone and prolactin. *Biol Reprod*. 20:965-970.
- Wilson, PR and Lapwood, KR b. 1979. Studies of reproductive development in Romney rams: ii. LH and testosterone secretion following single or repeated doses of gonadotropin releasing hormone (GnRH). *Biol Reprod*. 20:971-975.
- Wilson, PR and Lapwood, KR. 1978. Studies of hormone secretion in Romney rams : luteinizing hormone, testosterone and prolactin plasma profiles, LH/testosterone interrelationships and the influence of seasons. *Theriogenology*. 9:279-293.
- Yarney, TA and Sanford, LM. 1989. Pubertal changes in the secretion of gonadotropic hormones, testicular gonadotropic receptors and testicular function in the ram. *Dom Anim Endo*. Vol. 6(3):219-229.
- Yarney, TA, Sanford, LM and Palmer, WM. 1990. Pubertal development of ram lambs: body weight and testicular size measurements as indices of postpubertal reproductive function. *Can J Anim Sci*. 70:139-147.
- Young, LD, Fahmy, MH and Torres, HG. 1996. North america. In: Fahny, MH (ed.) *Prolific Sheep*. CAB International. Wallingford, United Kingdom, pp. 336.
- Yilmaz, A and Aygun, T. 2002. Some testis characteristics of Norduz male lambs. *J Agric Sci*. 12(1):21-26.

Cuadro 1. Promedio \pm EE de las variables de secreción de LH en corderos de pelo.

Edad (semanas)	Concentración promedio (ng•ml ⁻¹)	Concentración basal (ng•ml ⁻¹)	Frecuencia (pulsos•6 h ⁻¹)	Amplitud (ng•ml ⁻¹)
2	1.18 \pm 0.24 ^a	0.71 \pm 0.18 ^a	2.35 \pm 0.33 ^{ab}	2.74 \pm 0.46 ^a
4	2.16 \pm 0.34 ^b	0.89 \pm 0.19 ^{ab}	2.29 \pm 0.21 ^{ab}	8.02 \pm 1.46 ^{bc}
8	2.52 \pm 0.43 ^{bc}	1.07 \pm 0.23 ^{ab}	2.59 \pm 0.26 ^b	7.31 \pm 1.11 ^{bc}
12	3.42 \pm 0.35 ^{cd}	1.94 \pm 0.31 ^c	1.76 \pm 0.32 ^{ab}	11.11 \pm 1.78 ^c
16	2.33 \pm 0.25 ^b	1.40 \pm 0.20 ^{bc}	1.71 \pm 0.21 ^{ab}	7.97 \pm 1.03 ^{bc}
20	2.48 \pm 0.27 ^{bc}	1.76 \pm 0.25 ^c	2.06 \pm 0.29 ^{ab}	6.00 \pm 1.17 ^b
24	3.77 \pm 0.39 ^d	2.87 \pm 0.35 ^d	1.65 \pm 0.24 ^a	6.56 \pm 1.07 ^{bc}

a, b, c, d. Valores dentro de una columna sin una literal común indica diferencias (P<0.05).

Cuadro 2. Promedio \pm EE de parámetros de secreción de T en corderos de pelo.

Edad (semanas)	Concentración promedio (ng•ml ⁻¹)	Concentración basal (ng•ml ⁻¹)	Frecuencia (pulsos•6h ⁻¹)	Amplitud (ng•ml ⁻¹)
2	0.07 \pm 0.01 ^a	0.04 \pm 0.00 ^a	0.40 \pm 0.16 ^a	0.69 \pm 0.21 ^a
4	0.17 \pm 0.03 ^{ab}	0.04 \pm 0.00 ^a	1.20 \pm 0.26 ^b	1.00 \pm 0.16 ^a
8	0.33 \pm 0.07 ^b	0.09 \pm 0.02 ^a	1.60 \pm 0.21 ^{bc}	0.95 \pm 0.15 ^a
12	0.76 \pm 0.14 ^c	0.30 \pm 0.09 ^b	2.00 \pm 0.31 ^c	1.85 \pm 0.28 ^a
16	1.69 \pm 0.22 ^d	0.46 \pm 0.11 ^b	1.87 \pm 0.19 ^{bc}	4.51 \pm 0.43 ^b
20	2.01 \pm 0.29 ^d	0.70 \pm 0.15 ^c	1.60 \pm 0.13 ^{bc}	5.13 \pm 0.73 ^c
24	2.31 \pm 0.22 ^e	1.03 \pm 0.23 ^d	1.47 \pm 0.17 ^{bc}	5.59 \pm 0.48 ^c

a, b, c, d. Valores dentro de una columna sin una literal común indica diferencias (P<0.05).

Cuadro 3. Efectos e interacciones de las variables analizadas para LH y testosterona.

	LH	Pr > F	Testosterona	Pr > F
ALMAX	Genotipo	0.0024	Genotipo	0.1053 NS
	Edad	0.0001	Edad	0.0001
	Dosis	0.0001	Dosis	0.0001
	Genotipo x Edad	0.0457	Genotipo x Edad	0.4246 NS
	Genotipo x dosis	0.006	Genotipo x dosis	0.4055 NS
	Edad x Dosis	0.0001	Edad x Dosis	0.0007
	Genotipo x Edad x Dosis	0.4576 NS	Genotipo x Edad x Dosis	0.6639 NS
ABC	Genotipo	0.0116	Genotipo	0.0804 NS
	Edad	0.0001	Edad	0.0001
	Dosis	0.0001	Dosis	0.0001
	Genotipo x Edad	0.4647 NS	Genotipo x Edad	0.6444 NS
	Genotipo x dosis	0.06	Genotipo x dosis	0.4054 NS
	Edad x Dosis	0.0001	Edad x Dosis	0.0021
	Genotipo x Edad x Dosis	0.2073 NS	Genotipo x Edad x Dosis	0.6758 NS
Delta	Genotipo	0.0021	Genotipo	0.0822 NS
	Edad	0.0001	Edad	0.0001
	Dosis	0.0001	Dosis	0.0001
	Genotipo x Edad	0.0629 NS	Genotipo x Edad	0.7116 NS
	Genotipo x dosis	0.0341	Genotipo x dosis	0.1609 NS
	Edad x Dosis	0.0001	Edad x Dosis	0.0001
	Genotipo x Edad x Dosis	0.4438 NS	Genotipo x Edad x Dosis	0.6468 NS
	Cov	0.0001	Cov	0.0001

NS, no significativo, ALMAX, Altura máxima de la secreción de LH después de la administración de GnRH; ABC, Área bajo la curva de respuesta de LH después de la administración de GnRH; Delta, Magnitud de la respuesta (Δ LH) a la administración de GnRH.

Cuadro 4. Efecto Edad x Genotipo para la variable altura máxima de LH, promedio y EE sin transformar ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Edad (semanas)	n	Blackbelly	Cruzados	Pelibuey
0	15	$^y3.59 \pm 0.46^a$	$^y3.07 \pm 0.63^a$	$^y4.56 \pm 0.81^a$
4	15	$^y5.86 \pm 1.25^{ab}$	$^y4.70 \pm 1.02^{ab}$	$^y5.35 \pm 1.19^a$
8	9	$^y6.34 \pm 1.61^{ab}$	$^z12.80 \pm 3.33^d$	$^z16.86 \pm 3.69^c$
12	15	$^y6.71 \pm 1.18^b$	$^y8.42 \pm 1.53^c$	$^z14.15 \pm 2.15^c$
16	15	$^y10.97 \pm 2.06^c$	$^y12.68 \pm 1.92^d$	$^y15.64 \pm 2.82^c$
20	15	$^y7.40 \pm 1.04^{bc}$	$^y6.94 \pm 1.24^c$	$^y10.16 \pm 1.80^b$
24	15	$^{yz}7.10 \pm 0.97^{bc}$	$^y6.45 \pm 1.03^{bc}$	$^z11.63 \pm 2.29^{bc}$

^{a, b, c, d} Valores dentro de una columna sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

^{y, z} Valores dentro de una fila sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

Cuadro 5. Efecto Dosis x Edad para la variable altura máxima de LH, promedio y EE sin transformar ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Edad (semanas)	n	3 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$	9 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$	27 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$
2	14	$^{wx}2.36 \pm 0.60^a$	$^w3.33 \pm 0.34^b$	$^w5.68 \pm 0.67^c$
4	14	$^w2.08 \pm 0.70^a$	$^w4.64 \pm 0.84^b$	$^x9.33 \pm 0.98^c$
8	10	$^{wx}2.33 \pm 0.37^a$	$^x11.81 \pm 1.73^b$	$^z23.31 \pm 3.10^c$
12	14	$^y4.59 \pm 0.75^a$	$^x10.58 \pm 1.31^b$	$^y14.40 \pm 2.25^c$
16	14	$^y3.95 \pm 0.53^a$	$^y14.43 \pm 1.34^b$	$^z21.00 \pm 2.06^c$
20	14	$^x2.61 \pm 0.32^a$	$^x8.73 \pm 0.71^b$	$^y13.42 \pm 1.21^c$
24	14	$^x2.68 \pm 0.38^a$	$^x8.73 \pm 0.76^b$	$^y14.18 \pm 1.83^c$

^{a, b, c} Valores dentro de una fila sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

^{w, x, y, z} Valores dentro de una columna sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

Cuadro 6. Efecto Dosis x Edad para la variable área bajo la curva de LH, promedio y EE sin transformar ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot 3\text{h}^{-1}$).

Edad (semanas)	n	3 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$	9 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$	27 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$
2	14	^w 252.20 ± 46.57 ^a	^w 219.62 ± 22.06 ^a	^w 344.03 ± 35.82 ^b
4	14	^w 237.08 ± 37.97 ^a	^w 297.95 ± 36.45 ^b	^x 501.27 ± 48.24 ^c
8	10	^{wx} 289.50 ± 34.13 ^a	^{xy} 722.42 ± 115.69 ^b	^z 1184.48 ± 131.21 ^c
12	14	^y 527.03 ± 77.45 ^a	^{xy} 720.34 ± 103.77 ^b	^y 867.80 ± 116.47 ^b
16	14	^{xy} 390.58 ± 45.51 ^a	^y 814.65 ± 64.67 ^b	^z 1152.91 ± 92.34 ^c
20	14	^w 242.63 ± 48.97 ^a	^x 594.57 ± 51.33 ^b	^{yz} 893.07 ± 89.72 ^c
24	14	^w 255.96 ± 41.56 ^a	^x 562.37 ± 53.66 ^b	^{yz} 939.54 ± 128.60 ^c

^{a, b, c} Valores dentro de una fila sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

^{w, x, y, z} Valores dentro de una columna sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

Cuadro 7. Efecto Edad x Genotipo para la variable ΔLH , promedio y EE sin transformar ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Edad (semanas)	n	Blackbelly	Cruza	Pelibuey
2	15	^y 2.86±0.48 ^a	^y 2.39±0.63 ^a	^y 3.77±0.77 ^a
4	15	^y 4.29±1.27 ^{ab}	^y 4.11±0.98 ^{ab}	^y 4.4±1.24 ^a
8	9	^y 4.99±1.6 ^{ab}	^z 11.23±3.25 ^d	^z 14.9±3.78 ^c
12	15	^y 4.59±1.06 ^{ab}	^y 5.82±1.68 ^c	^z 11.12±2.38 ^c
16	15	^y 8.53±2.06 ^c	^y 10.25±1.83 ^d	^y 12.95±2.83 ^c
20	15	^y 5.45±1.05 ^{bc}	^y 5.76±1.26 ^{bc}	^y 8.87±1.8 ^b
24	15	^y 5.04±1.05 ^b	^y 5.71±1.08 ^{bc}	^z 10.59±2.14 ^{bc}

^{a, b, c, d} Valores dentro de una columna sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

^{y, z} Valores dentro de una fila sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

Cuadro 8. Efecto Dosis x Edad para la variable Δ LH, promedio y EE sin transformar ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Edad (semanas)	n	3 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$	9 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$	27 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$
2	14	^{wx} 1.54 ± 0.57 ^a	^w 2.67 ± 0.30 ^b	^w 4.95 ± 0.64 ^c
4	14	^w 0.67 ± 0.18 ^a	^w 3.67 ± 0.93 ^b	^x 8.50 ± 1.02 ^c
8	10	^w 0.90 ± 0.21 ^a	^x 9.72 ± 1.59 ^b	^z 21.85 ± 3.15 ^c
12	14	^y 2.52 ± 0.79 ^a	^x 7.92 ± 1.40 ^b	^{xy} 11.37 ± 2.48 ^b
16	14	^{xy} 1.72 ± 0.48 ^a	^y 11.64 ± 1.38 ^b	^z 18.43 ± 2.09 ^c
20	14	^{wx} 1.21 ± 0.22 ^a	^x 7.11 ± 0.78 ^b	^y 11.96 ± 1.26 ^c
24	14	^{wx} 1.55 ± 0.37 ^a	^x 7.34 ± 0.90 ^b	^y 12.76 ± 1.77 ^c

^{a, b, c} Valores dentro de una fila sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

^{w, x, y, z} Valores dentro de una columna sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

Cuadro 9. Efecto Dosis x Edad para la variable altura máxima de testosterona, promedio y EE sin transformar ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Edad (semanas)	n	3 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$	9 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$	27 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$
2	12	^v 0.46 ± 0.21 ^a	^v 0.43 ± 0.10 ^a	^v 0.55 ± 0.15 ^a
4	12	^v 0.43 ± 0.19 ^a	^v 0.59 ± 0.17 ^a	^v 0.95 ± 0.14 ^a
8	9	^v 0.75 ± 0.24 ^a	^w 1.33 ± 0.13 ^b	^w 1.80 ± 0.19 ^b
12	12	^v 1.00 ± 0.17 ^a	^w 2.08 ± 0.40 ^b	^w 2.11 ± 0.28 ^b
16	12	^w 1.92 ± 0.45 ^a	^x 4.44 ± 0.42 ^b	^x 4.45 ± 0.35 ^b
20	12	^x 2.73 ± 0.51 ^a	^y 6.19 ± 0.37 ^b	^y 6.76 ± 0.37 ^b
24	12	^y 5.72 ± 0.86 ^a	^z 8.64 ± 0.50 ^b	^z 9.19 ± 0.40 ^b

^{a, b} Valores dentro de una fila sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

^{v, w, x, y, z} Valores dentro de una columna sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

Cuadro 10. Efecto Dosis x Edad para la variable área bajo la curva de testosterona, promedio y EE sin transformar ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{3h}^{-1}$).

Edad (semanas)	n	3 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$	9 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$	27 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$
2	12	^v 18.95 ± 6.35 ^a	^v 23.98 ± 5.02 ^{ab}	^v 36.02 ± 12.07 ^b
4	12	^v 19.79 ± 4.69 ^a	^v 29.54 ± 8.87 ^a	^w 76.75 ± 11.72 ^b
8	9	^w 52.75 ± 11.11 ^a	^w 113.58 ± 14.83 ^b	^x 149.02 ± 22.11 ^b
12	12	^x 104.68 ± 19.33 ^a	^w 194.00 ± 36.04 ^b	^x 214.78 ± 36.30 ^b
16	12	^y 198.78 ± 35.71 ^a	^x 438.77 ± 45.27 ^b	^y 497.78 ± 47.24 ^b
20	12	^y 276.21 ± 47.43 ^a	^x 619.36 ± 28.61 ^b	^z 729.30 ± 39.46 ^b
24	12	^y 260.09 ± 48.68 ^a	^x 555.88 ± 59.78 ^b	^z 845.11 ± 103.74 ^c

^{a, b, c} Valores dentro de una fila sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

^{v, w, x, y, z} Valores dentro de una columna sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

Cuadro 11. Efecto Dosis x Edad para la variable Δ Testosterona, promedio y EE sin transformar ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Edad (semanas)	n	3 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$	9 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$	27 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$
2	12	^v 0.07 ± 0.06 ^a	^v 0.26 ± 0.08 ^a	^v 0.43 ± 0.14 ^a
4	12	^v 0.02 ± 0.02 ^a	^v 0.28 ± 0.13 ^a	^v 0.78 ± 0.11 ^b
8	9	^w 0.30 ± 0.14 ^a	^w 1.25 ± 0.13 ^b	^w 1.57 ± 0.19 ^b
12	12	^w 0.33 ± 0.09 ^a	^w 1.04 ± 0.30 ^b	^w 1.21 ± 0.31 ^b
16	12	^x 0.63 ± 0.24 ^a	^x 2.38 ± 0.44 ^b	^x 2.07 ± 0.30 ^b
20	12	^y 1.11 ± 0.55 ^a	^y 3.82 ± 0.56 ^b	^y 4.12 ± 0.70 ^b
24	12	^z 3.72 ± 1.02 ^a	^z 5.55 ± 0.78 ^b	^z 6.16 ± 0.82 ^b

^{a, b, c} Valores dentro de una fila sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

^{v, w, x, y, z} Valores dentro de una columna sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

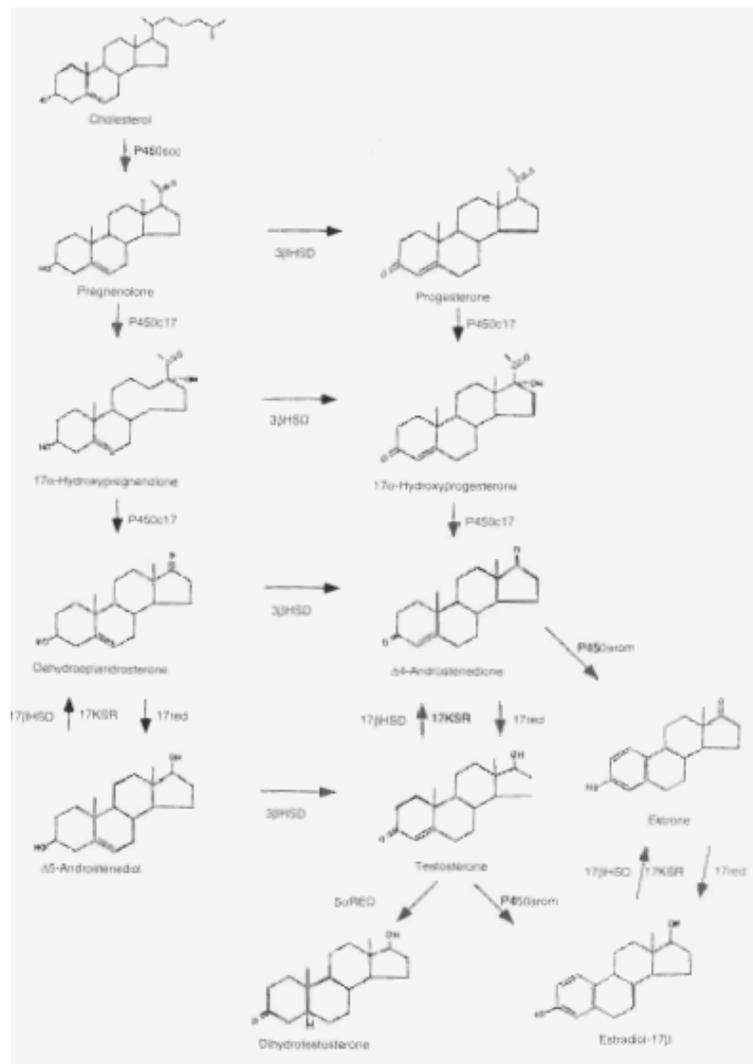


Figura 1. Biosíntesis de esteroides en las células de Leydig. La vía biosintética de testosterona. Esta figura ilustra los pasos presentes en la conversión enzimática de colesterol a testosterona. Una vez que actúa la enzima P450scc el colesterol es rápidamente convertido a pregnenolona. La pregnenolona es convertida a 17 α -hidroxipregnenolona por la enzima citocromo p450 17 α -hidroxilasa/17,20 liasa y eventualmente a dehidroepiandrosterona por la misma enzima. Si es usada una vía alterna, la pregnenolona es convertida a progesterona por la acción de la 3- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y entonces a 17 α -hidroxiprogesterona y androstenediona por el citocromo P450 17 α -hidroxilasa/17,20 liasa. La androstenediona es entonces convertida a testosterona por la acción de la 17-cetoesteroide reductasa. La testosterona puede ser también convertida a dihidrotestosterona en tejidos blanco por la enzima 5 α -reductasa. Las enzimas mostradas son: P450scc: citocromo P450 corte de cadena lateral de colesterol. 3 β HSD, 3- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ 5- Δ 4 Δ isomerasa; P450c17, citocromo P450 17 α -hidroxilasa/17,20 liasa; 17KSR, 17-cetoesteroide reductasa/17 β hidroxiesteroide deshidrogenasa; P450arom, citocromo P450 aromatasa; 5 α RED, 5 α reductasa. Fuente: Stocco y McPhaul, 1994.

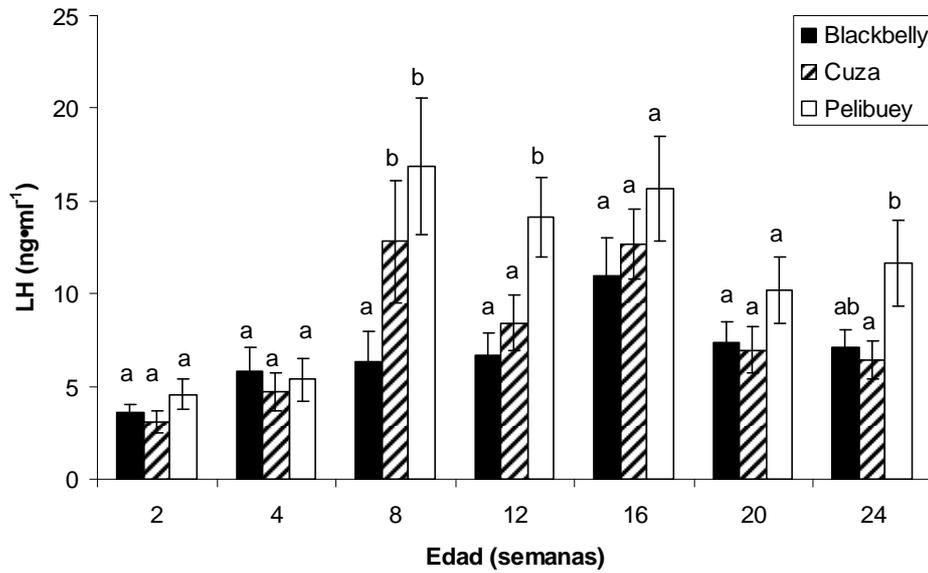


Figura 2. Efecto de Edad x Genotipo para la variable altura máxima de LH en respuesta a la administración de GnRH.

^{a,b} Promedios sin una literal común dentro de cada edad, indica diferencias ($P < 0.05$) entre genotipos.

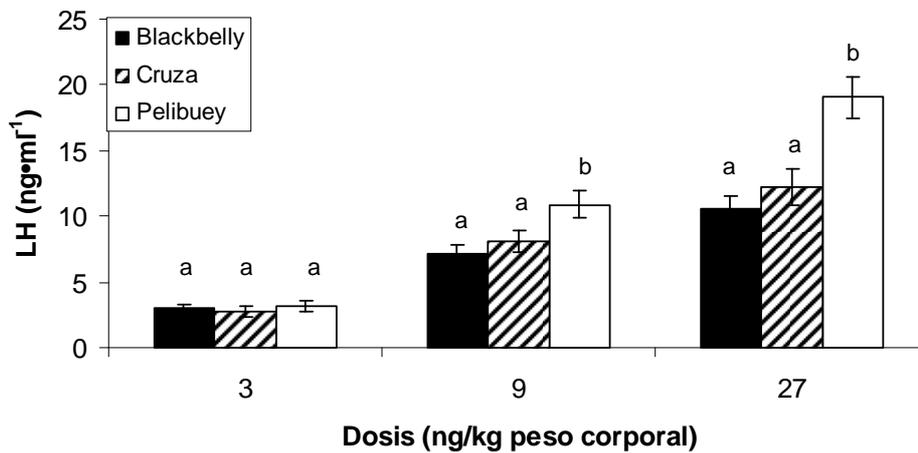


Figura 3. Efecto de Genotipo x Dosis para la variable altura máxima de LH en respuesta a la administración de GnRH.

^{a,b} Promedios sin una literal común dentro de cada dosis, indica diferencias ($P < 0.05$) entre genotipos.

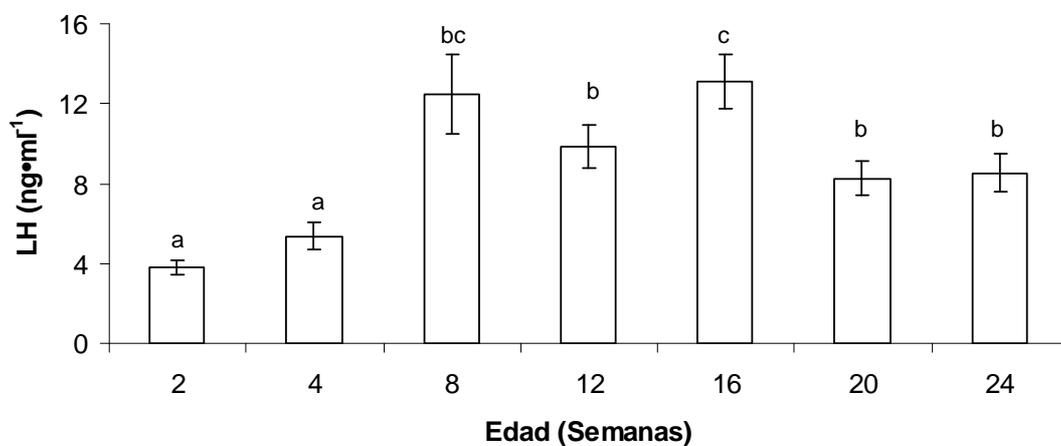


Figura 4. Efecto de Edad para la variable altura máxima de LH en respuesta a la administración de GnRH.

^{a,b,c} Promedios sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

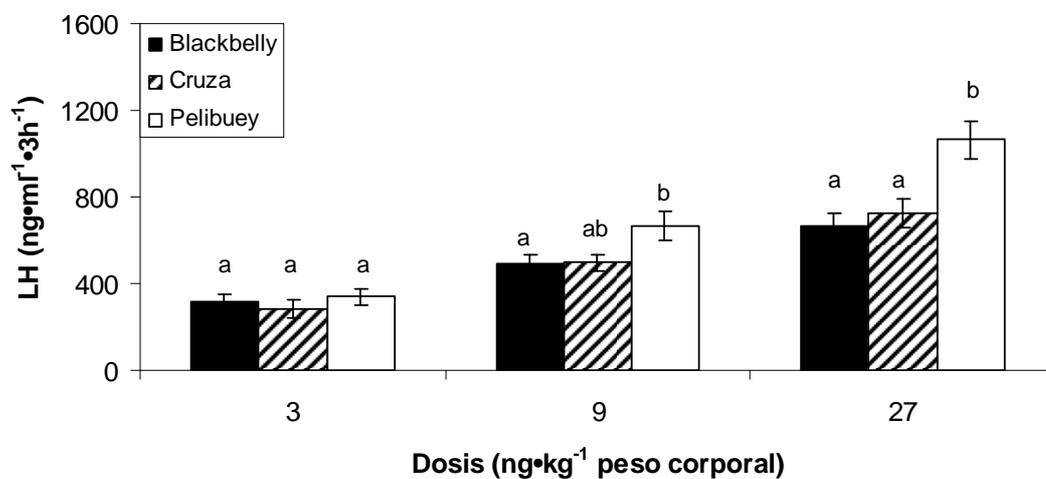


Figura 5. Efecto de Genotipo x Dosis para la variable área bajo la curva de LH en respuesta a la administración de GnRH.

^{a,b} Promedios sin una literal común dentro de cada dosis, indica diferencias ($P < 0.05$) entre genotipos.

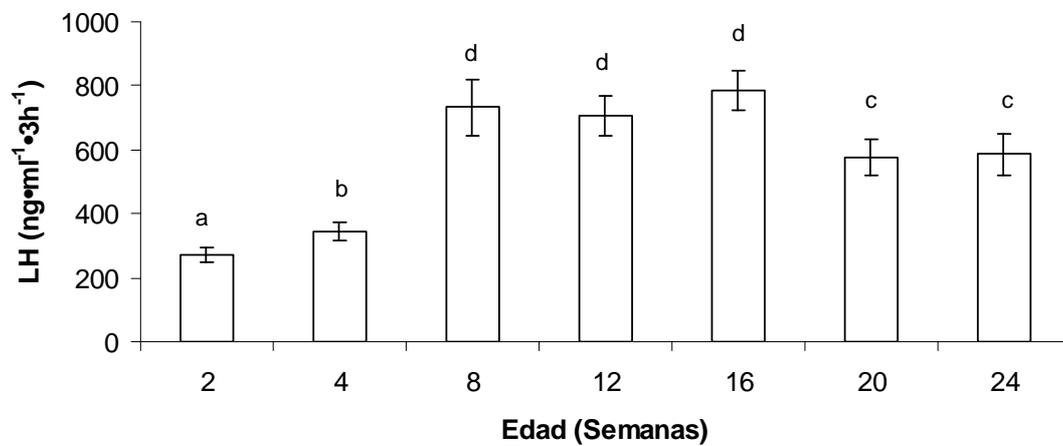


Figura 6. Efecto de Edad para la variable área bajo la curva de LH en respuesta a la administración de GnRH.

^{a,b,c,d} Promedios sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

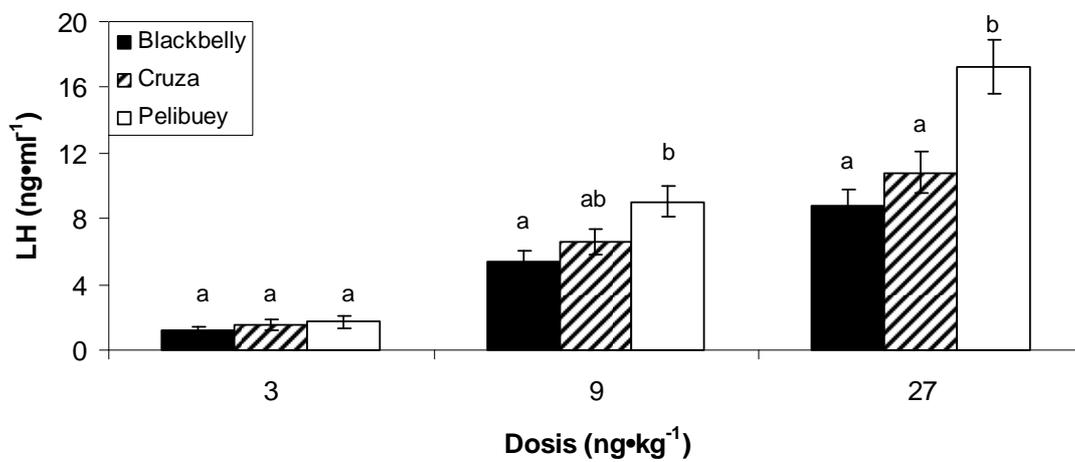


Figura 7. Efecto de Genotipo x Dosis para la variable Δ LH en respuesta a la administración de GnRH.

^{a,b} Promedios sin una literal común dentro de cada dosis, indica diferencias ($P < 0.05$) entre genotipos.

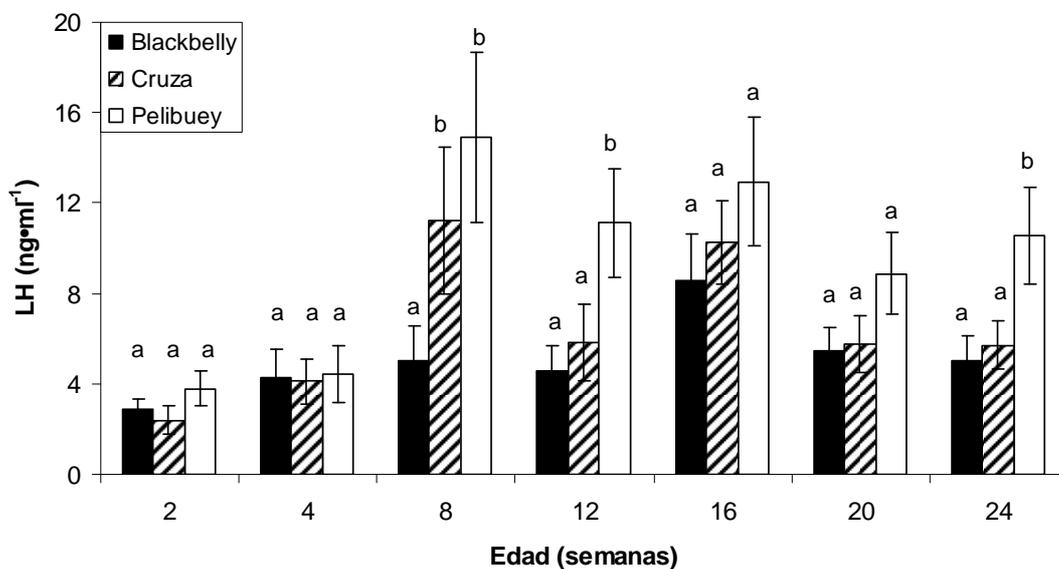


Figura 8. Efecto de Genotipo x Edad para la variable Δ LH en respuesta a la administración de GnRH.

^{a,b} Promedios sin una literal común dentro de cada edad, indica diferencias ($P < 0.05$) entre genotipos.

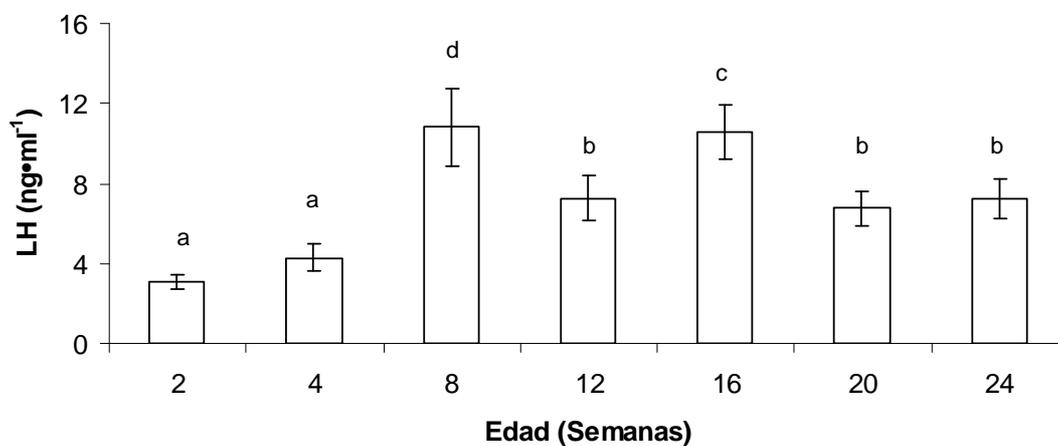


Figura 9. Efecto de Edad para la variable Δ LH en respuesta a la administración de GnRH.

^{a,b,c} Promedios sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

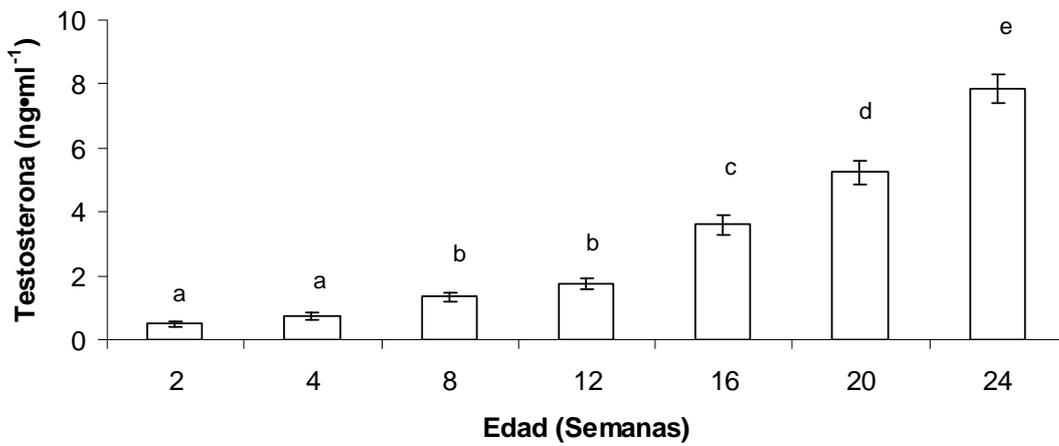


Figura 10. Efecto de Edad para la variable altura máxima de T en respuesta a la administración de GnRH.

^{a,b,c,d,e} Promedios sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

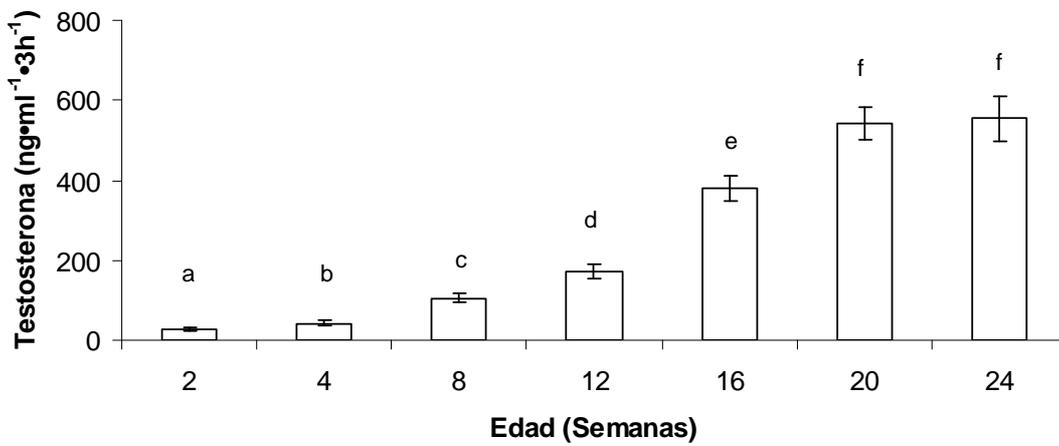


Figura 11. Efecto de la Edad para la variable área bajo la curva de T en respuesta a la administración de GnRH.

^{a,b,c,d,e,f} Promedios sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

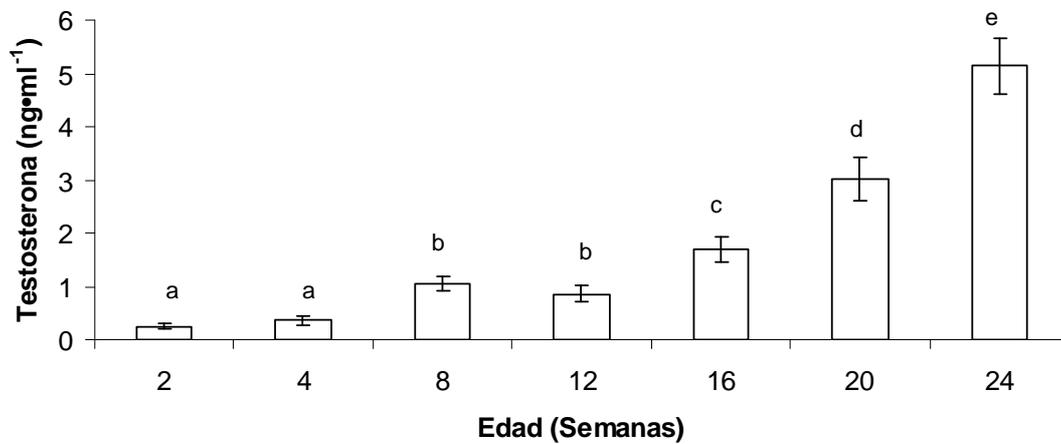


Figura 12. Efecto de Edad para la variable ΔT en respuesta a la administración de GnRH.

a,b,c,d,e Promedios sin una literal común indica diferencias ($P < 0.05$).

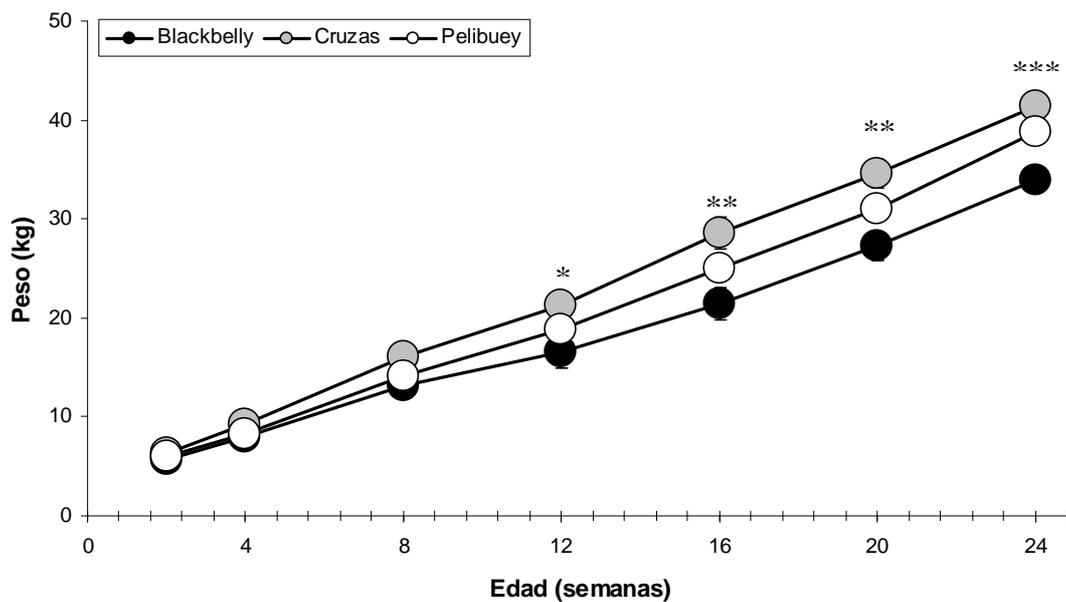


Figura 13. Peso corporal de corderos Blackbelly, Pelibuey y sus cruza desde las 2 hasta las 24 semanas de edad. *Indica diferencia ($P < 0.05$) entre razas Blackbelly^a, Pelibuey^{ab} y Cruza^b. **Indica diferencia ($P < 0.05$) entre razas Blackbelly^a, Pelibuey^b y Cruza^c. ***Indica diferencia ($P < 0.05$) entre razas Blackbelly^a, Pelibuey^b y Cruza^b.

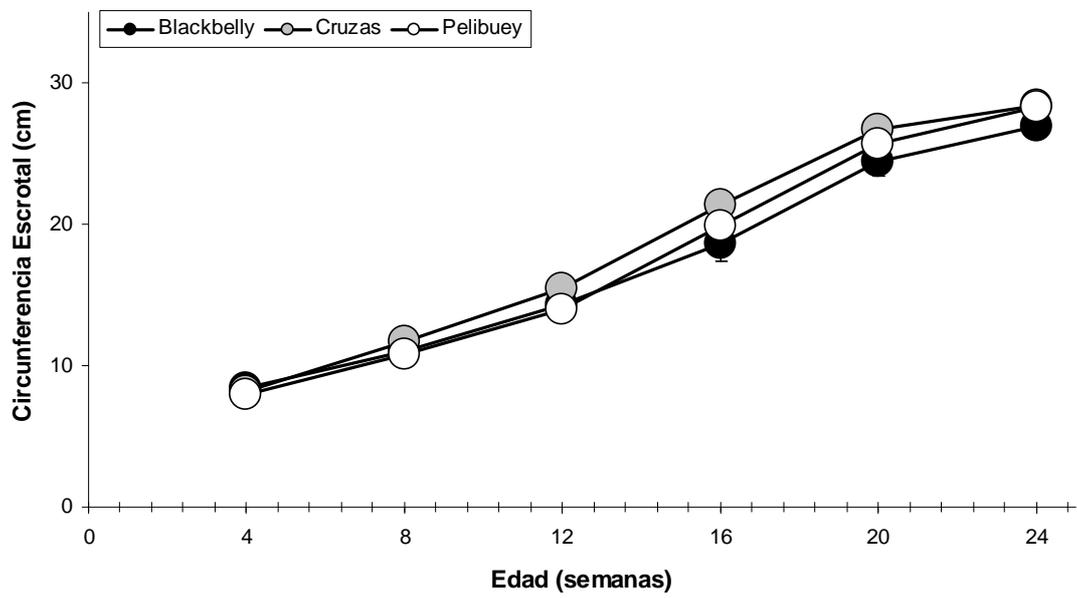


Figura 14. Circunferencia escrotal de corderos Blackbelly, Pelibuey y sus cruzas desde las 4 hasta las 24 semanas de vida.

ANEXO A

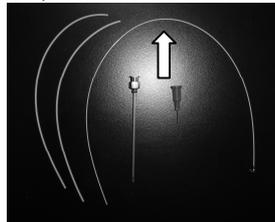
Técnica para colocar catéter

Material

- * Subclavicat-Viuret. Catéter 18G X 30.5cm, aguja de punción 16G X 65 mm
- * Sonda de plástico transparente para alimentación pediátrica prematuro 90cm. Laboratorios Visa- Diámetro externo 1.66mm
- * Cinta Transpore de 1pulgada de grosor
- * Cinta Gris TUK
- * Inhepar de farmacéutica PISA. 5000 UI/ml c/10ml
- * Solución salina con heparina a una concentración de 50UI/ml
- * Dermo clean, desinfectante de material quirurgico. DEGASA, SA de CV
- * Pegamento líquido UHU
- * Papel absorbente
- * Jeringa de 10cc
- * Tijeras

Técnica

1. El catéter se corta por mitad y el mandril se corta a partir del extremo que no tiene la punta metálica a un tamaño ligeramente mayor al del catéter (a nivel de flecha blanca).



2. La sonda de alimentación pediátrica también se recorta a un tamaño que varía dependiendo del tamaño del animal a cateterizar.
3. El catéter cuenta con un tapón verde, el cual tiene un tubo metálico, se procede a separar la parte metálica de la parte plástica ya sea fundiendo el plástico o ejerciendo fuerza extrayendo el tubo que es el que nos interesa.



4. Una vez separado el tubo metálico se le inserta al extremo de la sonda de alimentación pediátrica el cual va a servir como una unión entre la sonda y el catéter.
5. Se rellena la sonda con solución salina y heparina
6. Se procede a rasurar la región de la canaladura de la yugular de ambos lados en un rectángulo de aproximadamente 7cm por 15cm para permitir la identificación de la vena yugular.
7. Se procede a desinfectar el área rasurada con torundas empapadas de la solución desinfectante.
8. Una vez desinfectada el área se punciona con la aguja hasta estar dentro de la vena yugular, inmediatamente se introduce el catéter que deberá tener en su interior el mandril, ejerciendo presión gentil se debe ir introduciendo el catéter-mandril por la luz de la aguja hasta que esté dentro de la vena.



9. Se ejerce una leve presión con los dedos en la base de donde se realizó la punción para evitar que salga el catéter, se procede a extraer la aguja quedando en posición el catéter con el mandril.



10. A continuación se extrae el mandril e inmediatamente se conecta la punta de la sonda (tubo metálico) con el extremo visible del catéter, introduciendo un poco de solución salina con heparina para limpiar el catéter de sangre y evitar que se forme un coagulo.



11. En este momento hay que cerciorarse de que el catéter quedó en buena posición extrayendo un poco de sangre y una vez revisado se vuelve a rellenar la sonda con solución salina y heparina.



12. A continuación se le pone un poco de pegamento UHU sobre la piel alrededor de donde está colocado el catéter.



13. Con un poco de cinta Transpore (3cm) se corta por la mitad a lo largo hasta 1.5 cm, y se coloca como corbata sobre el pegamento, protegiendo el catéter. Por encima de la cinta y el catéter se ponen dos trozos de cinta transpore en X.



14. Con un segmento de cinta gris TUK de aproximadamente 40cm se protege el sitio donde se colocó el catéter y se rodea el cuello del animal dejando una parte de la sonda por fuera. En este punto nuevamente se revisa la colocación del catéter

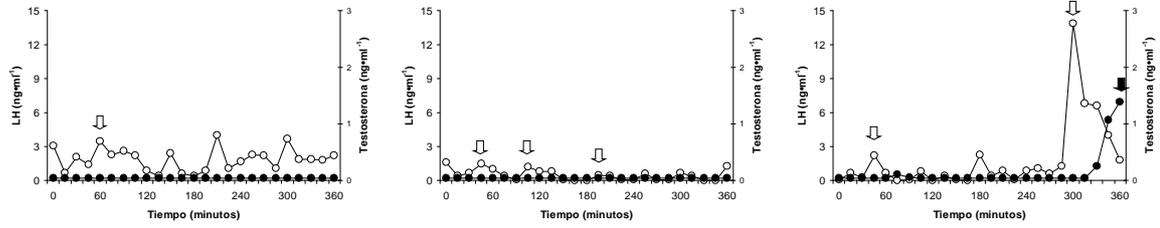


15. Por último se pone otro fragmento de cinta gris sobre la que está ya como collar para proteger la sonda.

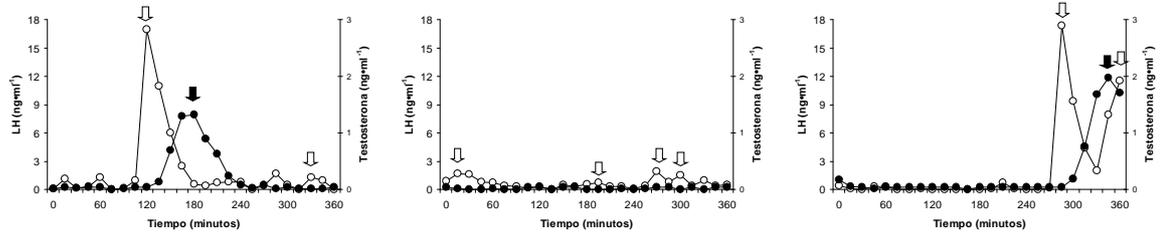


ANEXO B

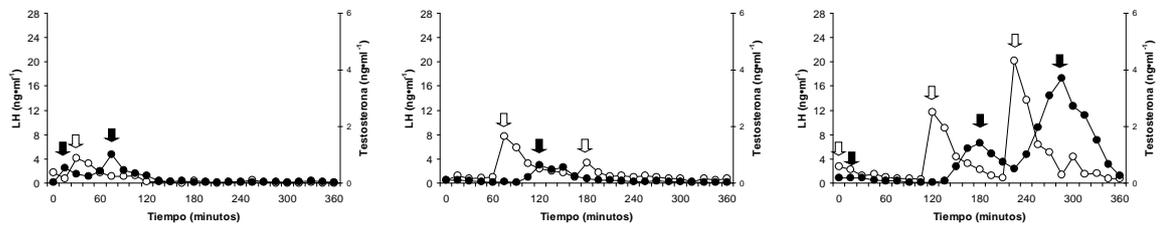
a)



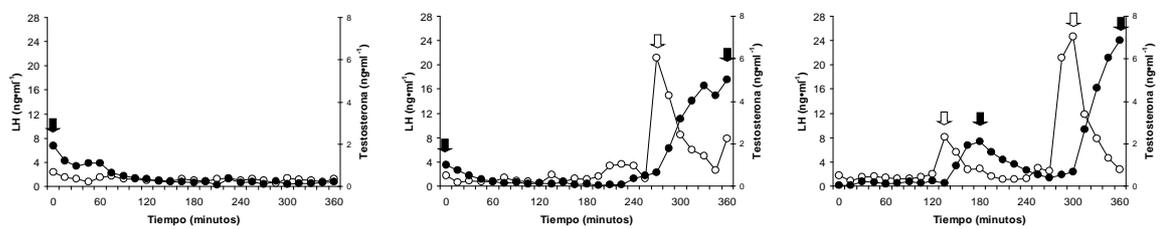
b)



c)

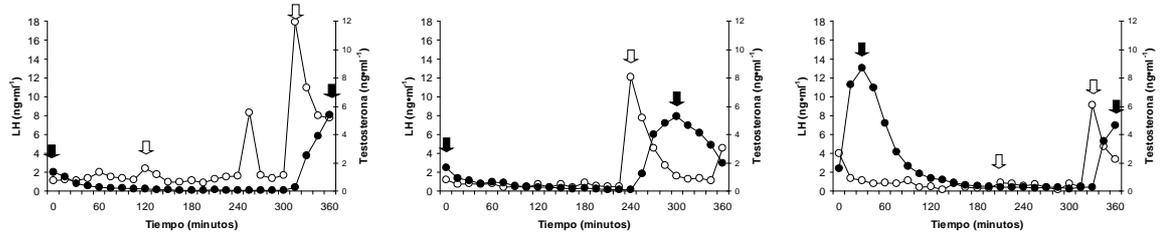


d)

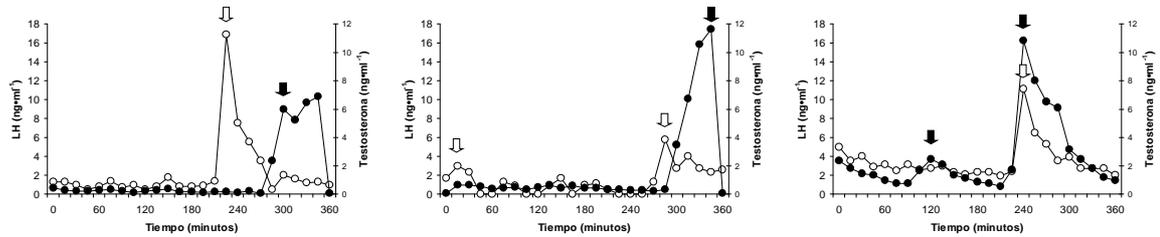


ANEXO B (continuación)

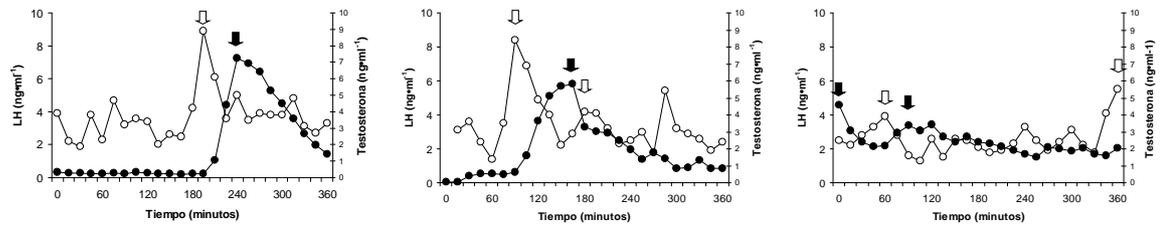
e)



f)



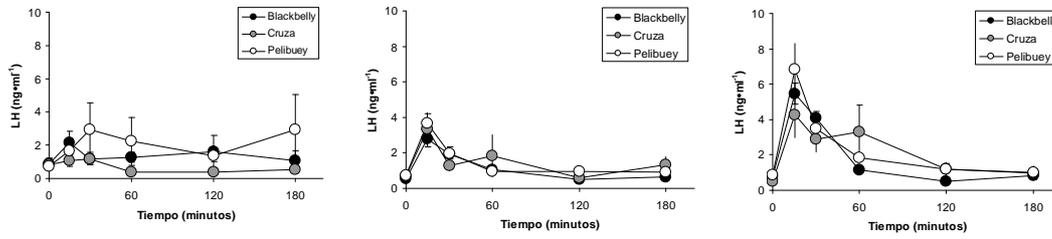
g)



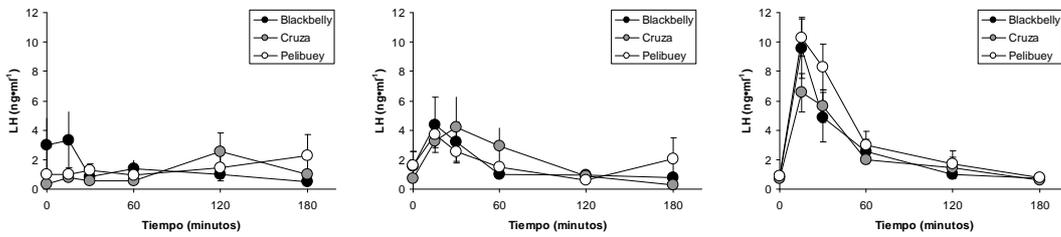
Anexo B. Perfiles representativos de LH (○) y testosterona (●) en plasma de corderos Blackbelly (columna izquierda), Cruzado (columna central) y Pelibuey (columna derecha), durante las semanas de vida: 2 (fila a), 4 (fila b), 8 (fila c), 12 (fila d), 16 (fila e), 20 (fila f) y 24 (fila g). Flecha blanca indica pulso detectado de LH y flecha negra indica pulso detectado de testosterona. Notar que la escala para ambas hormonas es diferente en cada edad.

ANEXO C

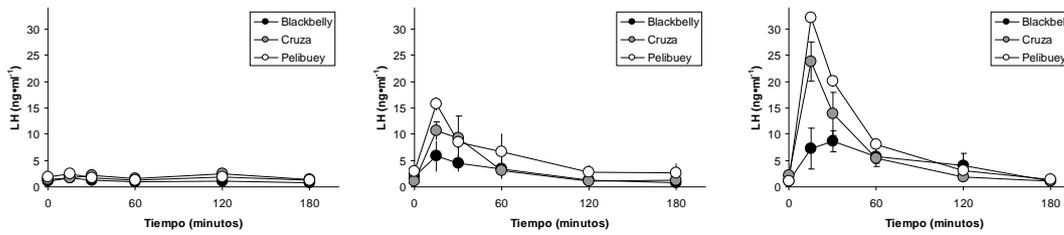
a)



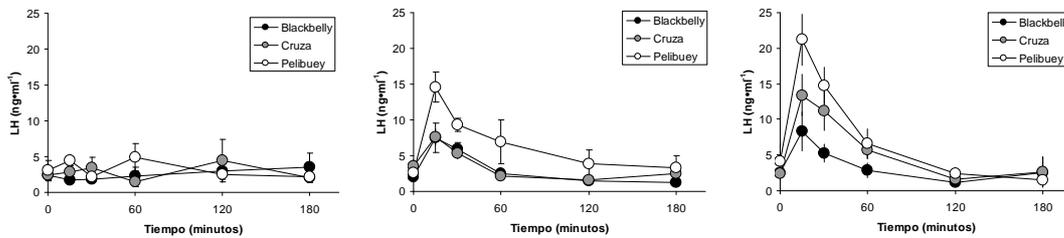
b)



c)

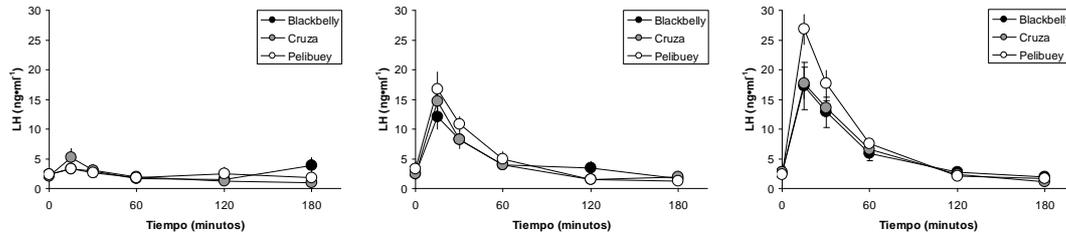


d)

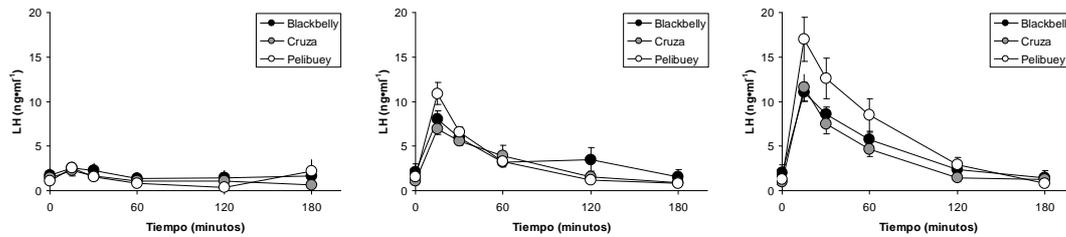


ANEXO C (continuación)

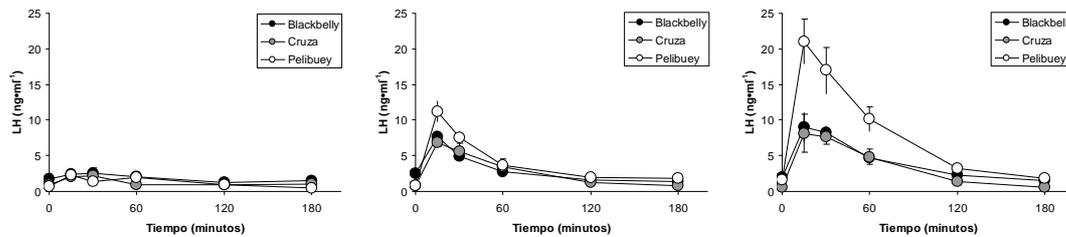
e)



f)



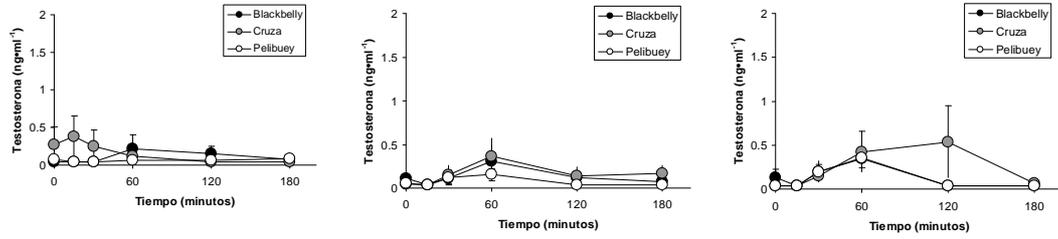
g)



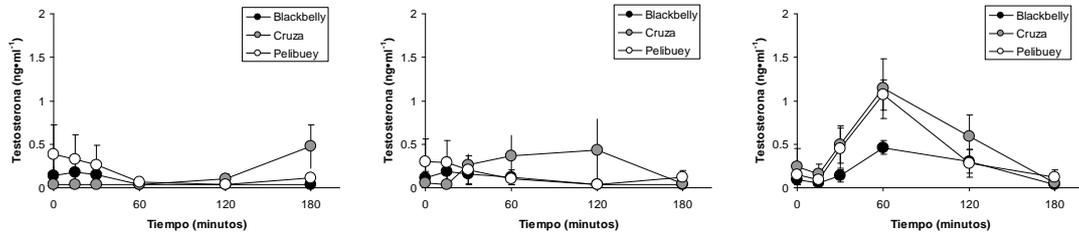
Anexo C. Concentración plasmática de LH (promedio \pm error estándar) en respuesta a la administración de GnRH ($3 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$, columna izquierda; $9 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$, columna central y $27 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$, columna derecha), durante las semanas de vida: 2 (fila a), 4 (fila b), 8 (fila c), 12 (fila d), 16 (fila e), 20 (fila f) y 24 (fila g). Notar que la escala es diferente para cada edad. Al tiempo 0 se administró GnRH.

ANEXO D

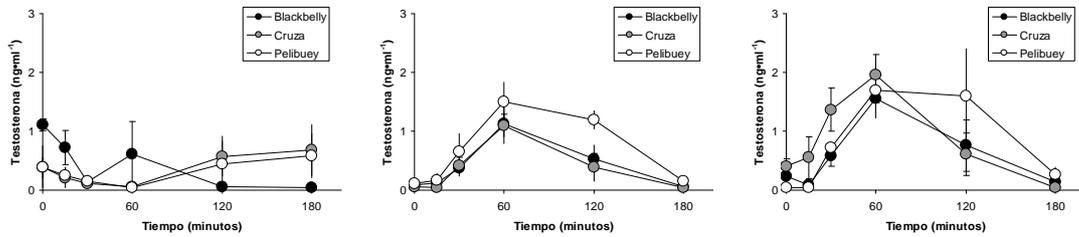
a)



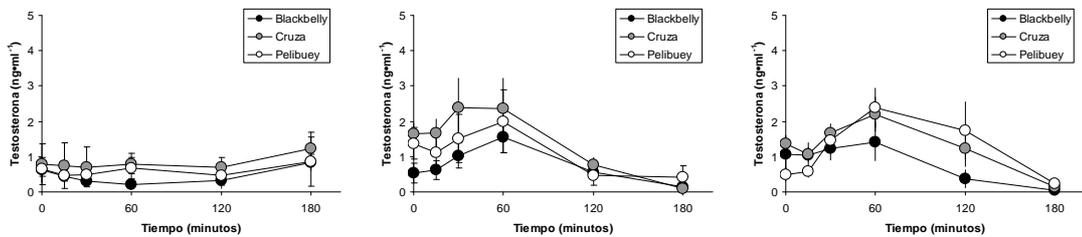
b)



c)

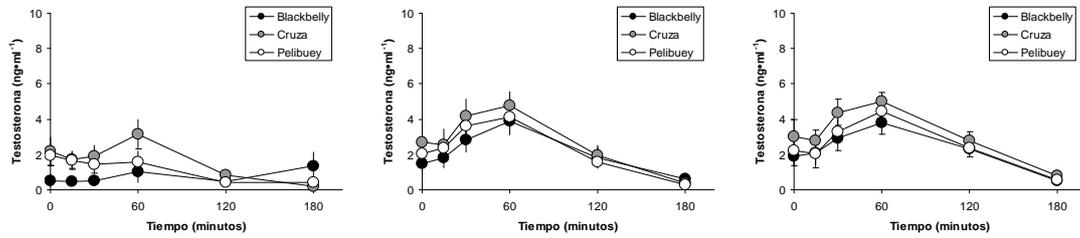


d)

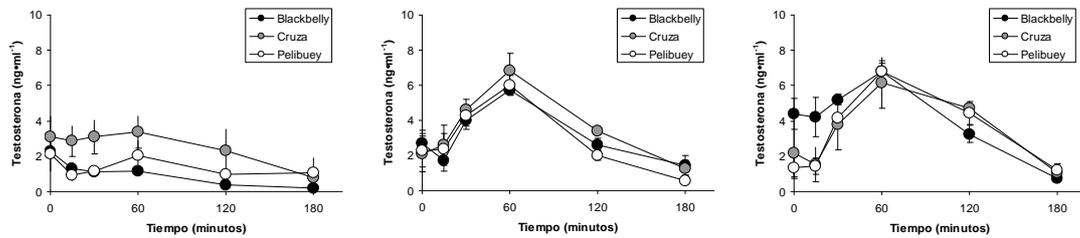


ANEXO D (continuación)

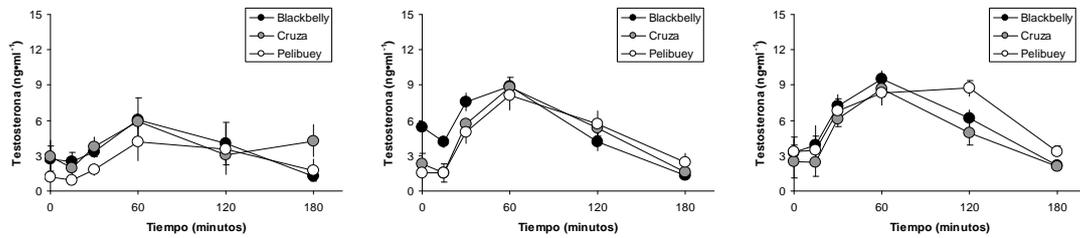
e)



f)



g)



Anexo D. Concentración plasmática de testosterona (promedio \pm error estándar) en respuesta a la administración de GnRH ($3 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$, columna izquierda; $9 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$, columna central y $27 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$, columna derecha), durante las semanas de vida: 2 (fila a), 4 (fila b), 8 (fila c), 12 (fila d), 16 (fila e), 20 (fila f) y 24 (fila g). Notar que la escala es diferente para cada edad. Al tiempo 0 se administró GnRH.