

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



TESIS

**EFFECTO DE LA SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE (rBST)
SOBRE PRODUCCIÓN, CALIDAD Y CONGELABILIDAD DEL SEMEN
DE TOROS PRODUCTORES DE CARNE**

PRESENTA

MVZ. RENÉ ANTONIO RAMÍREZ SOSA

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

FEBRERO, 2019

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**EFEECTO DE LA SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE (rBST)
SOBRE PRODUCCIÓN, CALIDAD Y CONGELABILIDAD DEL SEMEN
DE TOROS PRODUCTORES DE CARNE**

PRESENTA

MVZ. RENÉ ANTONIO RAMÍREZ SOSA

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIA ANIMAL**

FEBRERO, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



EFECTO DE LA SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE (rBST)
SOBRE PRODUCCIÓN, CALIDAD Y CONGELABILIDAD DE SEMEN DE
TOROS PRODUCTORES DE CARNE

Aprobación de Tesis de Maestría en Ciencia Animal por el Comité Particular del
MVZ. René Antonio Ramírez Sosa



Dr. Rubén Cervantes Vega

Director de Tesis



MC. David Domínguez Díaz

Co-Director



Dr. Hugo Bernal Barragán

Co-Director



Dr. Mayela P. Gallegos de la Hoya

Co-Director



MC. Aimé Jazmin Garza Arredondo

Co-Director

GRAL. ESCOBEDO, N.L.

FEBRERO, 2019

AGRADECIMIENTO

Agradezco en primer lugar al Gran Espíritu, la energía creadora que me ilumina siempre para seguir aprendiendo, que me escucha y guía para caminar por la mejor vía. Gracias por permitirme llegar hasta este momento.

Al Dr. Rubén Cervantes Vega por permitirme ser parte de este proyecto, por su entrega y disposición, por ayudarme en esta experiencia profesional y compartir sus conocimientos, enseñanzas, experiencias y aprendizaje, así como su amistad. Gracias.

Al Dr. Juan Francisco Villareal Arredondo, por permitirme realizar el trabajo experimental dentro de las instalaciones del laboratorio, por todo su apoyo brindado para que esta tesis pudiera ser realizada.

Al M.C. David Domínguez Díaz por su invaluable apoyo durante el proceso de esta tesis, por ser una excelente persona que sin dudar lo acepto ayudar a realizar el trabajo, por su tiempo y entrega, por su amistad, por compartir sus amplios conocimientos, por enseñarme y hacerme ver que el conocimiento, si no se transmite a aquellos que desean aprender, es como si no existiera. Por estar siempre motivándome día con día a ser una mejor persona. Estaré siempre agradecido con usted.

Al M.V.Z. Yajasiel Picasso quien desde un inicio del proyecto estuvo colaborando con la realización de este trabajo. Por todo su apoyo, gracias.

Al M.V.Z. Nicolás de Tellitu por el apoyo brindado durante este proceso.

A Dr. Carlos Gutiérrez por aceptar ser parte de este proyecto y su apoyo en el laboratorio de Endocrinología, así como en los análisis estadísticos de esta investigación.

A mis compañeros de generación, Lili, Jesús, Omar y Ramón, quienes vivimos, disfrutamos y compartimos buenas e inolvidables experiencias durante nuestra formación.

A cada uno de los Co-directores de tesis, al Dr. Hugo Bernal Barragán, la M.C. Aimé J. Garza Arredondo, a la Dra. Mayela P. Gallegos de la Hoya, por su apoyo durante este proceso, sus atenciones y el tiempo invertido en sus revisiones.

Al Dr. Luis Fernando Carrasco Castro, por la motivación y el gran apoyo que me brindó para realizar un sueño más dentro de mi formación académica. Muchísimas gracias.

A todas las personas que estuvieron involucradas física, mental y espiritualmente durante este proyecto, que no pude plasmar en una lista por temor a olvidar alguna de ellas, pero que me siento bendecido por tenerlos en mi vida y estoy completamente agradecido por todo su apoyo.

DEDICATORIA

A mi familia, la más hermosa y de la cual me siento completamente orgulloso, por brindarnos siempre el apoyo, motivación y enseñarnos que la vida a veces es complicada, pero es bonito vivirla de la mejor manera y que si te esfuerzas siempre habrá recompensas. El resultado del esfuerzo de cada uno de nosotros se ve coronado en esta tesis, gracias por todo su amor, por sus palabras de aliento en los momentos más difíciles durante el proceso. La mejor herencia que puedo recibir de ustedes, Padre y Madre, es que me hayan enseñado a estudiar, estudiar una carrera, una maestría, pero lo más importante estudiar la mejor manera de vivir, en paz, en armonía con el universo y con dignidad. Y aunque no es nada fácil le agradezco al Gran Espíritu y a la vida por haberme puesto en el camino una familia tan hermosa y llena de virtudes como lo son ustedes.

A mis hermanos Lino Enrique y Edgar Joaquín Ramírez Sosa. Estoy agradecido con la vida y con Dios, el TODO, por permitirme crecer y disfrutar de la vida bajo el mismo techo con ustedes. A ustedes les dedico esta tesis por estar siempre y caminar en el sendero del aprendizaje junto conmigo. Gracias por su apoyo demostrado en miles de formas. Me llena de gozo compartir con ustedes un logro más. Los quiero mucho.

A mis familiares y amigos que formaron parte de este proyecto y que de alguna manera contribuyeron e hicieron que todo esto fuera posible.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICES DE FIGURAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivo general	3
1.1.2 Objetivos específicos	3
1.2 Hipótesis	3
1.3 Justificación	3
2. LITERATURA REVISADA	5
2.1. Desarrollo sexual del toro	5
2.1.1. Control hormonal del desarrollo en el toro europeo	5
2.1.2. Desarrollo testicular postnatal y establecimiento de la espermatogénesis	9
2.1.3. Andrología aplicada al ganado <i>Bos indicus</i>	14
2.1.3.1. Características fisiológicas de los toros <i>Bos indicus</i>	15
2.1.3.2. Pubertad y madurez sexual	16
2.1.3.3. Fertilidad en toros <i>Bos indicus</i>	18

2.2. Efecto a nivel molecular de rBST sobre la producción de semen	
en toros	20
2.2.1. Mecanismo de acción de rBST	23
2.2.1.1. Secreción y modos de acción de la somatotropina	23
2.2.1.2. Gametogénesis	26
2.2.1.3. Esteroidogénesis	27
2.2.2. Receptores testiculares de la somatotropina	27
2.2.3. Papel de la somatotropina en la función testicular	28
2.2.4. Acciones extra testiculares	29
2.2.5. Transducción de señal mediada por ST	30
3. MATERIAL Y MÉTODOS	34
3.1. Lugar de estudio	34
3.2. Unidades experimentales, mantenimiento y alimentación	34
3.3. Diseño experimental	35
3.4. Muestras de semen	36
3.5. Muestras de sangre	39
3.6. Concentración de testosterona en suero sanguíneo	40
3.7. Concentración de IGF-1 en suero sanguíneo	41
3.8. Análisis estadístico	43
4. RESULTADOS	45
4.1. Características seminales	45
4.2. Niveles de testosterona e IGF-1	48

5. DISCUSIÓN	51
6. CONCLUSIONES	57
7. LITERATURA CITADA	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Roles supuestos y establecidos para GH en el sistema reproductivo de machos y hembras	17
2. Efecto de rBST sobre las características seminales en toros europeos y sintéticos	44
3. Características físicas del semen afectadas por el tratamiento de rBST . . .	44
4. Efecto de rBST sobre las características seminales Post-Descongelación en toros europeos y sintéticos	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Desarrollo testicular e inicio de la espermatogénesis en toros	10
2. Representación esquemática de la molécula de la hormona del crecimiento bovino con el N-terminal detallado	14
3. Secreción y modos de acción de GH	16
4. Papel de la hormona del crecimiento (GH) en la función testicular . . .	22
5. Modelo de mecanismo de activación del RGH	24
6. Representación esquemática de las vías de transducción de señales activadas por GH	25
7. Fotografía representativa de los toros europeos (A) y sintéticos (B) utilizados en el estudio	33
8. Fotografía que muestra el momento de la aplicación de la rBST vía subcutánea	34
9. Fotografía que muestra el electroeyaculador utilizado durante el estudio	35
10. Baño húmedo (A) a 37 °C para mantenimiento del semen y sistema CASA (B)	36
11. Lectura de la prueba HOST en cámara de Neubauer con microscopio de contraste de fases	37
12. Fotografía que muestra el momento en que fue tomada una muestra de sangre (A) y centrífuga (B)	38

13. Respuesta de la testosterona en suero a la aplicación de rBST	46
14. Respuesta de IGF-I en suero a la aplicación de rBST	47

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABP	Proteína de unión a andrógenos
CBR	Centro de biotecnología reproductiva
CE	Circunferencia escrotal
FSH	Hormona folículo estimulante
GH	Hormona del crecimiento
GHR	Receptor de la hormona del crecimiento
GHRH	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HOST	Prueba de resistencia hipoosmótica
IA	Inseminación artificial
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
JAK	Proteína Janus Kinasa
LH	Hormona luteinizante
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
mg	Miligramos
ml	Mililitros
rBST	Somatotropina bovina recombinante
REML	Estimación de máxima verosimilitud restringida
rhFSH	Hormona foliculoestimulante humana recombinante
SC	Subcutáneo
SOCS	Supresores de la señalización de citoquinas
ST	Somatotropina
StAR	Proteína reguladora aguda esteroideogénica
STAT	Transductores de señales y activadores de la transcripción

TGF	Factor de crecimiento transformante
UGRNL	Unión ganadera regional de nuevo león
VA	Vagina artificial
μl	Microlitros
®	Marca registrada

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la somatotropina bovina recombinante (rBST) sobre la producción, calidad y congelabilidad del semen en toros productores de carne. Se utilizaron 19 toros divididos por genotipo en *Bos taurus* (europeo, n = 6) y cruzados de *Bos taurus* con *Bos indicus* (sintéticos, n = 13), con una edad y peso promedio de 36 ± 13 meses y 800 ± 170 kg respectivamente. Durante todo el experimento fueron alimentados con un alimento balanceado con 16% de PC, formulado para toros en producción de semen y pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*) y Johnson (*Sorgum halepense*) picado, de igual manera tuvieron acceso libre a agua en bebederos individuales. Los animales se dividieron en dos grupos, estratificados por genotipo, asignándose alternativamente, como fueron llegando al CBR, al grupo tratado con rBST o al grupo control. La rBST fue inyectada vía subcutánea, cada 15 días, durante 6 semanas. Muestras de sangre fueron obtenidas por punción de la vena coccígea, cada 15 días, durante 60 días, antes de la evaluación del semen, misma que fue realizada antes de aplicar la hormona. La concentración de testosterona e IGF-I fue determinada por medio de ELISA utilizando kits comerciales. Los datos fueron analizados mediante un arreglo factorial con el modelo lineal general usando el método de estimación de máxima verosimilitud restringida (REML). Dosis de semen descongeladas se evaluaron y los resultados de las variables se calcularon como porcentaje. Los resultados obtenidos indican que la rBST en toros sintéticos mejoró la motilidad progresiva (61.60 ± 6.59 % vs 32.76 ± 6.59 %), el porcentaje de células muertas (23.86 ± 4.10 % vs 37.22 ± 4.10 %) y el porcentaje de integridad de la membrana (HOST) (42.72 ± 5.16 % vs 29.08 ± 5.16 %). Las variables concentración espermática, motilidad progresiva y células muertas fueron diferentes ($P < 0.05$) al comparar toros tratados con rBST y los controles. En cuanto al efecto del tratamiento sobre las características seminales post-descongelación en los distintos genotipos, el porcentaje de HOST fue diferente (60.36 ± 7.56 vs 68.11 ± 7.56 % en toros sintéticos y 67.20 ± 7.56 vs 52.98 ± 7.56 % en los europeos). Las concentraciones de testosterona fueron similares en el día 0 ($P > 0.05$) para los toros tratados y controles, 2.75 ± 1.84 y 3.85 ± 1.96 ng/ml respectivamente, mientras que en los días 14 y 28 la concentración de testosterona en los toros con rBST fue más alta ($P < 0.05$). Las concentraciones de IGF-I en el día 0 no presentaron diferencia ($P > 0.05$) y en el día 14 la

concentración de IGF-I fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en los toros tratados con rBST (338.54 ± 93.80 ng/ml) en comparación con los controles (130.67 ± 6.50 ng/ml). El uso de rBST en los centros de procesamiento de semen podría ser una alternativa para mejorar los parámetros productivos del semen fresco. Sin embargo, no fue posible obtener evidencia que soporte el efecto mostrado en el semen fresco, en los parámetros del semen descongelado a excepción de la prueba HOST. La aplicación de la rBST, tiene mayor efecto cuando se aplica a sementales con parámetros reproductivos aceptables.

ABSTRAC

The objective of this research was to evaluate the effect of recombinant bovine somatotropin (rBST) on the production, quality and freezability of semen in meat producing bulls. Nineteen bulls were divided by phenotype in *Bos taurus* (European, n = 6) and crossed of *Bos taurus* with *Bos indicus* (Synthetic, n = 13), with an age and average weight of 36 ± 13 months and 800 ± 170 kg respectively. During the whole experiment, they were fed on the basis of a balanced feed with 16% PC formulated for bulls in production of semen and grass Bermuda (*Cynodon dactylon*) and Johnson (*Sorghum halepense*), similarly they had free access to water in individual drinking troughs. The animals were divided into two groups, stratified by phenotype, assigned alternately, as they were arriving at the CBR, to the group treated with rBST or the control group. The rBST was injected subcutaneously, every 15 days, for 6 weeks. Blood samples were obtained every 15 days, for 60 days, by puncturing the coccygeal vein, before semen evaluation, which was performed before applying the hormone. The concentration of testosterone and IGF-1 was determined with commercial ELISA kits. The data were analyzed by a factorial arrangement with the general linear model using the restricted maximum likelihood estimation (REML) method. For the analysis of data of thawed semen doses, the variables were recalculated and the percentage was obtained. The results indicate that the rBST in synthetic bulls improved the progressive motility (61.60 ± 6.59 % vs 32.76 ± 6.59 %), the percentage of dead cells (23.86 ± 4.10 % vs 37.22 ± 4.10 %) and the percentage of integrity of the membrane (HOST) (42.72 ± 5.16 % vs 29.08 ± 5.16 %). Sperm concentration, progressive motility and dead cells were different ($P < 0.05$) when comparing rBST treated bulls with controls. Regarding the effect of the treatment on the post-thawing seminal characteristics in the different genotypes, the percentage of HOST was different (60.36 ± 7.56 vs 68.11 ± 7.56 % in synthetic bulls and 67.20 ± 7.56 vs 52.98 ± 7.56 % in Europeans). The testosterone concentrations were similar at day 0 ($P > 0.05$) for the treated and control bulls, 2.75 ± 1.84 and 3.85 ± 1.96 ng/ml respectively, however on days 14 and 28 the testosterone concentration in the bulls with rBST was higher ($P < 0.05$). IGF-I concentrations on day 0 showed no difference ($P > 0.05$) however on day 14 the concentration of IGF-I was significantly higher ($P < 0.05$) in the bulls treated with rBST (338.54 ± 93.80 ng/ml) compared to the controls (130.67 ± 6.50 ng/ml). The

use of rBST in semen processing centers could be an alternative to improve the productive parameters of fresh semen. However, it was not possible to obtain evidence to support the effect shown in fresh semen on the parameters of the thawed semen except for the HOST test. The application of rBST, has greater positive effects when applied to bulls with acceptable reproductive parameters.

1. INTRODUCCIÓN

En un mundo cada vez más demandante y con recursos cada vez más escasos, los problemas de fertilidad en los machos se vuelven un reto en donde la aplicación de los conocimientos sobre la andrología bovina coadyuva considerablemente aumentando la eficiencia reproductiva, que se traduce en la sostenibilidad del sector ganadero (Chenoweth & Lorton, 2014).

Se han empleado una gran variedad de sustancias, tanto exógenas y endógenas para estimular la motilidad de los espermatozoides *in vitro*. Barkay *et al.*, (1997) demostraron que la cafeína aumenta 40 a 80 % el porcentaje de espermatozoides móviles *in vitro*. De igual manera la relaxina y las prostaglandinas se han estudiado para ver los efectos que éstas tienen sobre los espermatozoides (Colon *et al.*, 1986). Se ha sugerido que la hormona foliculoestimulante humana recombinante (rhFSH) en combinación con la gonadotropina coriónica humana (hCG) es efectiva para inducir la espermatogénesis en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico masculino congénito (Matsumoto *et al.*, 2009). La hormona somatotropina (ST), fue usada con éxito para el incremento y mejoramiento de las características seminales en hombres con un historial de infertilidad, ocasionando un aumento de la motilidad espermática en individuos astenozoospermicos. Este efecto positivo con el uso de esta hormona también ha sido observado en bovinos (García, 2004). La acción de la ST está mediada en parte por la producción del Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) y se ha demostrado que ambas hormonas desempeñan un papel importante en el sistema reproductor masculino (Breier *et al.*, 1996). Se han identificado receptores de ST e IGF-I en células gonadotrópicas de la hipófisis y en células germinales de Leydig y de Sertoli, lo que indica la posibilidad de que la acción de la ST regula el eje hipofisario-gonadal y participa en la esteroidogénesis gonadal y la espermatogénesis (Chandrashekar *et al.*, 2004). Se han realizado estudios *in vitro* que sugieren que la acción del IGF-I puede aumentar la conversión de testosterona a estradiol mediante la inducción de la actividad de la aromatasa (Zhang *et al.*, 2010). El estradiol circulante en machos adultos se origina a partir de la conversión de testosterona por aromatasa en tejidos periféricos, principalmente tejido adiposo, y directamente de los

testículos donde la aromatasa está altamente expresada en células de Leydig (Haverfield *et al.*, 2011).

Factores como genotipo, fotoperiodo, temperatura, humedad, nutrición y el balance energético, así como las enfermedades, están intrínsecamente relacionados y también controlan la reproducción y han evolucionado para conferir ventajas reproductivas y garantizar la supervivencia de las especies, aunado a las diferencias, que son un factor importante, entre los genotipos *B. taurus* y *B. indicus* en donde en la mayoría de los toros *B. indicus* se seleccionan como toros reproductores basándose únicamente en características fenotípicas y que no están necesariamente relacionadas con su rendimiento reproductivo en condiciones naturales de apareamiento (Chacón *et al.*, 2000). Aunque, estos animales presentan una mejor adaptación en condiciones de clima extremo. Mientras que los machos del genotipo *B. taurus* frecuentemente entran en estrés térmico afectando el comportamiento reproductivo, disminuyendo así la eficiencia reproductiva (Brito *et al.*, 2002).

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo General

Evaluar, en el Centro de Biotecnología Reproductiva de la Unión Ganadera Regional de Nuevo León, General Bravo, NL., el efecto de la aplicación de somatotropina bovina recombinante (rBST) a toros, sobre los parámetros seminales, evaluados con ayuda de un sistema de análisis de semen asistido por computadora (CASA), en bovinos productores de carne de diferentes genotipos.

1.1.2. Objetivos Específicos:

- 1) Determinar el efecto de la rBST en el volumen y concentración espermática como variables que impactan la producción de semen.
- 2) Evaluar el efecto de la rBST en las células viables, las características del movimiento, el vigor e integridad de la membrana para determinar la calidad del semen.
- 3) Analizar el efecto de la rBST sobre la motilidad progresiva y las células muertas como variables que son determinantes en la congelabilidad del semen.
- 4) Cuantificar el efecto de la rBST sobre la concentración sérica de testosterona e IGF-1.

1.2. HIPÓTESIS

La administración de rBST incrementa la calidad seminal al estimular IGF-I y testosterona resultando en un mayor número de dosis y mayor porcentaje de espermatozoides viables post-descongelación.

1.3. JUSTIFICACIÓN

Ante la situación real del CBR-UGRNL en donde al menos el 50 % de los toros que ingresan son considerados como toros problemas, es decir, tanto por sus bajos parámetros

seminales, debido a diversos factores que afectan directa o indirectamente la calidad seminal, el semen no es apto para continuar y ser procesado, ni es posible congelar esos eyaculados. Es por ello que constantemente, con la ayuda de distintos recursos, se pretende mejorar las características seminales y con ello incrementar el número de toros que puedan congelar, lo que resulta en un incremento del número de dosis congeladas por toro. Del mismo modo, como resultado del mejoramiento de las características del semen fresco, se puede lograr un incremento en los parámetros de calidad de las pajillas congeladas. En el proceso de incrementar y mejorar los parámetros productivos dentro del CBR, se han empleado ya algunas sustancias tanto endógenas como exógenas, por mencionar algunas, las hormonas de carácter gonadotrópico como la gonadotropina coriónica equina (eCG), la gonadotropina coriónica humana, hCG, el factor liberador de gonadotropinas (GnRH), sin embargo, aún se mantienen los porcentajes de toros sin la capacidad de congelar que anteriormente se mencionaron. Por otra parte, se tienen registros del uso de la rBST para mejorar las características seminales, ya que se ha demostrado que, además de sus efectos somatotrópicos, esta hormona está involucrada en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, así como en algunas glándulas accesorias, atribuyéndole así un efecto gonadotrópico. La rBST administrada vía SC en dosis de 500 mg, además de tener efecto somatotrópico ha sido utilizada por sus efectos gonadotrópicos, por lo que puede mejorar las características del semen lo que se traduce en un mayor número de dosis de semen congeladas, aumentando la producción de dosis inseminantes en el CBR.

2. LITERATURA REVISADA

2.1. Desarrollo sexual del toro

2.1.1. Control hormonal del desarrollo sexual en el toro europeo

El desarrollo sexual en los toros es un proceso que involucra mecanismos complejos de maduración del eje hipotalámico-pituitario-testicular. Se puede dividir en tres periodos; el periodo infantil, prepuberal y puberal, y estos periodos dependen de los cambios en las concentraciones de gonadotropinas. El periodo infantil tiene la característica de que existe una baja secreción de gonadotropina y testosterona y se extiende desde el nacimiento hasta aproximadamente los 2 meses de edad. Hay un aumento transitorio en la secreción de gonadotropinas desde los 2 a 6 meses de edad, aproximadamente. A este aumento se le conoce como “aumento temprano de la gonadotropina” y caracteriza el periodo prepuberal, periodo durante el cual las concentraciones de testosterona comienzan a aumentar. El periodo de desarrollo reproductivo acelerado es el puberal, ocurre después de los 6 meses de edad hasta la pubertad. Aquí, disminuye la secreción de gonadotropinas, mientras que la secreción de testosterona continúa aumentando (Amann *et al.*, 1986).

Los mecanismos que regulan la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) durante el desarrollo sexual en los toros son poco conocidos, en cambio se sabe que el momento del desarrollo sexual está determinado principalmente por el hipotálamo y la secreción de GnRH. Los cambios de maduración dentro del hipotálamo aumentan la secreción del pulso de GnRH, lo que impulsa la transición del período de desarrollo infantil al prepuberal a través del aumento de la secreción de gonadotropinas (Amann *et al.*, 1986).

Al realizar una evaluación directa de muestras de sangre del sistema portal-hipofisario, se demostró que la secreción pulsátil de GnRH aumentó linealmente desde las 2 semanas de 3.5 pulsos/10 horas, hasta las 12 semanas de edad con 8.9 pulsos/10 horas, en terneros. Aunque la secreción de GnRH en la sangre del sistema portal-hipofisario se detectó a las 2 semanas, la secreción pulsátil de la hormona luteinizante (LH) no fue detectada en las

muestras de sangre yugular antes de las 8 semanas de edad. Por otra parte, los pulsos de GnRH no estuvieron necesariamente acompañados de secreción de LH hasta las 8-12 semanas de edad, cuando todos los pulsos de GnRH dieron como resultado pulsos de LH. El aumento de la liberación de GnRH pulsátil de 2 a 8 semanas de edad sin un aumento concomitante en la secreción de LH puede representar una capacidad reducida de la glándula pituitaria para responder al estímulo por GnRH (Rodríguez & Wise, 1989). El período en el que los pulsos de GnRH no estimularon la secreción de LH correspondió al período durante el cual hubo un aumento en el peso de la hipófisis, la concentración del receptor de GnRH y el contenido de LH (Amann *et al.*, 1986).

En el periodo prepuberal, durante el aumento temprano de las gonadotropinas, hay un aumento transitorio en las concentraciones de LH y la hormona foliculoestimulante (FSH) de aproximadamente 2 a 6 meses de edad. Las concentraciones disminuyen a partir de entonces y se mantienen niveles solo ligeramente mayores que los observados durante el periodo infantil. El aumento de la secreción de pulsos de GnRH es el principal factor responsable del aumento de las concentraciones de gonadotropinas. Esto se demostró con el aumento de la frecuencia del pulso de LH (Aravindakshan *et al.*, 2000).

El inicio de la esteroidogénesis en las células de Leydig está caracterizado por una mayor secreción de androstenediona, dicha secreción disminuye a medida que las células completan su maduración y comienzan a secretar testosterona. Dentro de los primeros 3 a 4 meses de edad, las concentraciones de testosterona son bajas y la secreción no acompaña necesariamente a los pulsos de LH. Después de esta edad, los pulsos de LH son seguidos por pulsos de testosterona y las concentraciones medias de testosterona comienzan a aumentar. Diversos estudios han demostrado que el número de pulsos de testosterona aumentó de 0.3 – 2.3 pulsos/24 horas entre 1 – 4 meses de edad a 9 – 7.5 pulsos/24 horas a los 5 meses de edad (McCarthy *et al.*, 1979b).

El patrón de secreción de LH durante el periodo prepuberal se asocia con la edad en la pubertad en toros que fueron criados en grupos contemporáneos, lo que sugiere que este es un mecanismo fisiológico por el cual la genética afecta el desarrollo sexual

(Aravindakshan *et al.*, 2000). Otros estudios demuestran que los efectos de la nutrición en el desarrollo sexual están mediados por los efectos sobre los patrones de secreción de LH (Brito *et al.*, 2007b, c, d).

La secreción reducida de gonadotropinas marca el final del periodo prepuberal y el inicio del puberal. Un aumento rápido de la secreción de testosterona y una mayor sensibilidad del hipotálamo a la retroalimentación negativa de los andrógenos, probablemente causa la disminución de la secreción de LH, mientras que la inhibina producida por las células de Sertoli puede actuar sobre las células gonadotropas limitando la secreción de FSH (Rawlings & Evans, 1995).

La secreción elevada de testosterona es esencial para aumentar la eficacia de la espermatogénesis que finalmente conduce a la aparición de espermatozoides en la eyaculación (Rodríguez & Wise, 1991).

Los mecanismos que controlan la reproducción y el balance energético están intrínsecamente relacionados y han evolucionado para conferir ventajas reproductivas y garantizar la supervivencia de las especies. El aparato neuronal, diseñado para medir la tasa metabólica y el balance energético, se denominó Sensor Metabólico del cuerpo. Éste traduce señales proporcionadas por concentraciones circulantes periféricas de hormonas específicas en señales neuronales que sirven como signos para el eje hipotalámico-pituitario-gonadal y finalmente regulan el generador de pulsos de GnRH y controlan el proceso reproductivo.

A diferencia de aquellas especies en las que las concentraciones circulantes de la hormona del crecimiento (GH) continúan aumentando hasta después de la pubertad, las concentraciones de GH disminuyeron durante el período puberal en los toros (Brito *et al.*, 2007a, d). Las diferencias en la etapa de desarrollo del cuerpo en el que cada especie alcanza la pubertad es probable que sean responsables de los diferentes perfiles de GH entre las especies. En consecuencia, el perfil de GH en los toros parece indicar que se debe alcanzar una etapa relativamente avanzada de desarrollo corporal antes de que las gónadas

produzcan espermatozoides de manera eficiente. Las diferencias en la secreción de GH entre las especies pueden deberse a la función reguladora de los esteroides en la secreción de GH. En algunas otras especies, los esteroides estimulan la secreción de GH, pero las concentraciones de GH no difieren entre los toros intactos y los novillos castrados (Lee *et al.*, 1991). La disminución de las concentraciones de GH durante el desarrollo sexual de los toros se observa junto con concentraciones crecientes de testosterona, lo que indica que los esteroides no tienen una retroalimentación positiva sobre la secreción de GH en los toros, como lo hacen otras especies (Brito *et al.*, 2007a, d).

Las concentraciones circulantes de factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) en terneros aumentaron continuamente y solo alcanzaron una meseta (o disminuyeron ligeramente) después de que el desarrollo sexual se completó en su mayoría después de 12-14 meses de edad. La disminución concomitante de las concentraciones circulantes de GH y el aumento de las concentraciones de IGF-I durante el desarrollo sexual en toros indica que hay cambios drásticos en la sensibilidad hepática a la GH o que otras fuentes son responsables de la producción de IGF-I. Una posible fuente de IGF-I podría ser los testículos, ya que las células de Leydig son capaces de secretar esta hormona en otras especies (Brito *et al.*, 2007a, b, c, d).

Estrechas asociaciones temporales observadas en una serie de estudios de nutrición sugieren fuertemente que el IGF-I circulante podría estar involucrado en la regulación del generador de pulsos de GnRH y la magnitud y duración del aumento temprano de gonadotropinas en toros de carne (Brito *et al.*, 2007b, c, d).

Se ha sugerido un posible efecto de IGF-I sobre la esteroidogénesis testicular en toros. Las células de Leydig y Sertoli producen IGF-I, lo que indica la existencia de mecanismos parácrinos/autócrinos de regulación testicular que involucran IGF-I (Spiteri-Grech & Nieschlag, 1992). La mayor parte del IGF-I en los testículos se produce localmente, y el IGF-I circulante puede desempeñar un papel secundario en la regulación del desarrollo y la función testicular. Sin embargo, los patrones temporales y las fuertes asociaciones entre las concentraciones circulantes de IGF-I, el tamaño testicular y la secreción de

testosterona observada en toros que reciben nutrición diferente argumentan un papel principal de esta hormona (Brito *et al.*, 2007b, c, d). Esta función principal del aumento de IGF-I circulante durante el período puberal puede promover el aumento de las concentraciones de testosterona mediante la regulación de la multiplicación, diferenciación y maduración de las células de Leydig. Debido a que se ha demostrado que la testosterona regula positivamente la producción de IGF-I y la expresión del receptor IGF-I por las células de Leydig y Sertoli (Cailleau *et al.*, 1990), el establecimiento de un ciclo de retroalimentación positivo entre la secreción de IGF-I y la producción de testosterona es importante para el desarrollo sexual.

2.1.2. Desarrollo testicular postnatal y establecimiento de la espermatogénesis

La curva de crecimiento testicular tiene un patrón sigmoideo en donde se observa un periodo inicial de poco crecimiento seguido por una fase de crecimiento rápido y luego por una meseta. Si bien el patrón de crecimiento testicular es similar en todas las razas, las características de la curva de crecimiento se ven muy afectadas por la genética. El tamaño testicular adulto también difiere de manera considerable entre razas (Lunstra & Cundiff, 2003).

El crecimiento testicular experimenta una serie de cambios histológicos bien marcados. La población de células intertubulares testiculares está compuesta de células mesenquimales, fibroblastos, células de Leydig, células peritubulares y células mononucleares. Alrededor del primer y segundo mes de edad, las células mesenquimatosas constituyen la mayoría de las células del tejido intersticial testicular. Estas células de carácter pluripotente, proliferan por mitosis frecuentes y son precursoras de células de Leydig, células peritubulares contráctiles y fibroblastos. El grosor de la lámina basal tubular es de aproximadamente 3 μm a los 4 meses de edad, pero disminuye de forma continua a 1.2 μm a los 5 meses de edad. Las células de tipo mesenquimales se transforman en células peritubulares con núcleos alargados a los 4 meses de edad, mientras que, a su vez, se transforman en miofibroblastos contráctiles a los 6 meses de edad (Wrobel *et al.*, 1988).

Aproximadamente en el primer mes de edad, la mayoría de las células intertubulares, un 70 %, son células mesenquimatosas con una tasa mitótica alta. Las células típicas de Leydig constituyen en este momento un 6 %, aproximadamente, de todas las células intertubulares y varias de estas células se encuentran en un estado degenerativo avanzado que probablemente como restos de la población de células de Leydig en el feto, mismas que coexisten hasta los 2 meses de edad, pero después se observan solamente células de Leydig formadas después del nacimiento. A los 2 meses de edad, las células de Leydig representan cerca del 20 % de las células intertubulares y comprenden el 10 % del volumen testicular total. A los 4 meses de edad, las células similares a las mesenquimales cesan la proliferación y se transforman en células peritubulares contráctiles o células de Leydig, así pues, las células de tipo mesenquimal corresponden a aproximadamente 20 %. A los 5 meses de edad, las células mesenquimales indiferenciadas son raras y la población de células de Leydig aumenta por la proliferación mitótica. Células de Leydig recientemente diferenciadas, intactas y degenerativas se observan entre los 4 y 7 meses de edad. La población de células de Leydig encontrada en el toro adulto está presente a los 7 meses de edad, ya que la mitosis después de esta edad es rara (Wrobel, 1990).

Las células de Sertoli indiferenciadas, también llamadas de soporte, están presentes en los túbulos seminíferos al nacer y son células intratubulares predominantes desde el nacimiento hasta los 4 meses de edad. Las células de Sertoli indiferenciadas tienen poca actividad mitótica hasta el primer mes de vida, pero la multiplicación celular máxima se da entre el primer y segundo mes de edad, posteriormente disminuye hasta los 4 meses. A esta edad, las células indiferenciadas de Sertoli ingresan a la fase G0 del ciclo celular por el resto de vida del toro. Con el final de la fase proliferativa, las células de Sertoli comienzan a transformarse en células adultas. El proceso de diferenciación incluye cambios morfológicos, especialización superficial y existe una posterior interacción con otras células de Sertoli y células germinales (Sinowatz & Amselgruber, 1986).

La mayoría de las células de Sertoli completan su diferenciación morfológica y logran la estructura adulta a los 6 o 7 meses de edad. En este momento se pueden observar

complejos de unión que consisten en muchos puntos o líneas de fusión en serie que implican membranas celulares de Sertoli vecinas. Estas uniones forman una barrera funcional hemato-testicular y dividen el epitelio tubular en un compartimento basal que contiene espermatogonias y un compartimento adluminal (conectado al lumen) que contiene células germinales en etapas posteriores de la espermatogénesis (Wrobel, 2000).

La proliferación intensa de células germinales ocurre de 50 a 80 días después de la concepción, pero las células germinales entran en una fase G1 o G0 prolongada y no se observa actividad mitótica hasta después del nacimiento en los toros. Al nacer, la población de células germinales está compuesta únicamente de gonocitos, también conocidos como prespermatogonia o espermatogonias prepúberes. Los gonocitos generalmente se ubican centralmente y tienen un núcleo grande (~ 12 μm de diámetro) con un nucléolo bien desarrollado (Figura 1).

La proliferación de células germinales se reanuda lentamente entre 1 y 2 meses de edad, cuando el diámetro del túbulo seminífero es de aproximadamente 50 – 80 μm . Los gonocitos se desplazan gradualmente a una posición próxima a la lámina basal y se dividen por mitosis, originando espermatogonias-A. La diferenciación y la degeneración dan como resultado la desaparición completa de los gonocitos de los túbulos seminíferos a los 5 meses de edad (Chenoweth & Lorton, 2014).

La proliferación de células germinales alcanza un máximo entre los 4 y 8 meses de edad (diámetro del túbulo 80 – 120 μm), lo que representa la expansión de la célula madre espermatogónica. El número de espermatogonias continúa aumentando hasta aproximadamente los 12 meses de edad (Curtis & Amann, 1981).

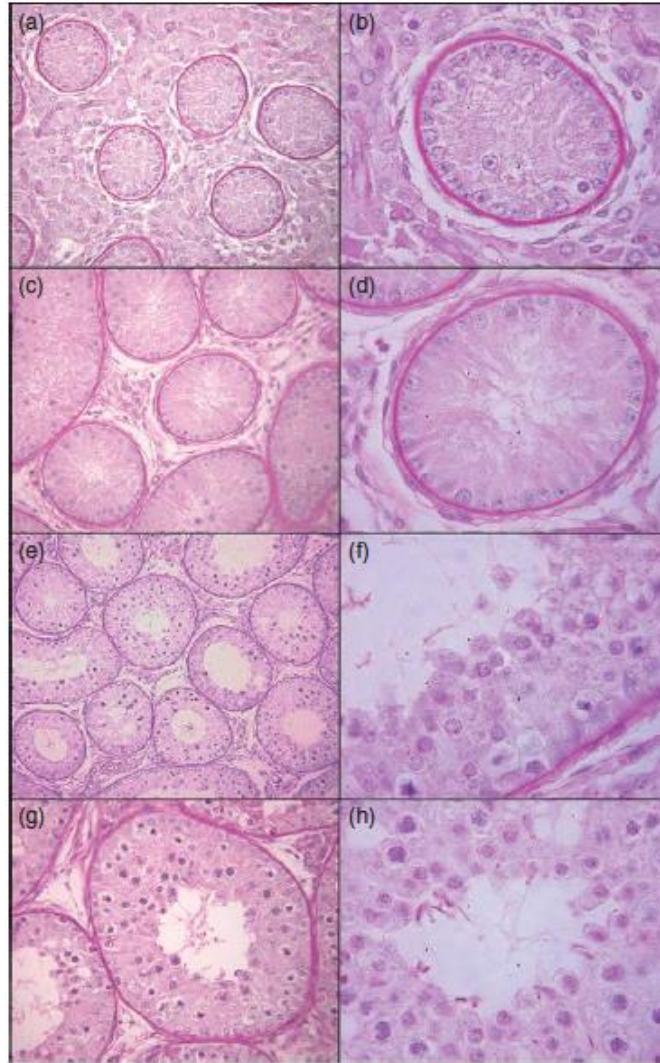


Figura 1. Desarrollo testicular e inicio de la espermatogénesis en toros. (Chenoweth & Lorton, 2014).

Las espermatogonias-A se dividen mitóticamente para formar espermatogonias In y B, que, a su vez, entran en la meiosis entre los 4 – 5 meses de edad, cuando se observan por primera vez los espermatocitos primarios. El número de espermatocitos primarios aumenta lentamente hasta los 8 meses de edad, y exceden el número de espermatogonias. Los espermatocitos secundarios y las espermatídas redondas aparecen por primera vez a los 6 – 7 meses de edad, mientras que las espermatídas alargadas aparecen alrededor de los 8 meses. El número de espermatídas aumenta rápidamente y, después de los 10 meses de edad, el número de espermatídas excede el número de cualquier otra célula germinal.

Los espermatozoides maduros aparecen en los túbulos seminíferos aproximadamente a los 8 – 10 meses de edad (Figura 1).

El desarrollo celular testicular está acompañado por un aumento progresivo en la proporción del parénquima testicular ocupado por los túbulos seminíferos hasta aproximadamente los 8 meses de edad. El diámetro del túbulo seminífero aumenta gradualmente de 2 a 5 meses de edad, y más rápidamente de 6 a 10 meses de edad, y se quintuplicó desde el nacimiento hasta la edad adulta. Los aumentos en la proporción de parénquima que está ocupada por los túbulos seminíferos, así como los aumentos en el diámetro tubular y la longitud total de los túbulos seminíferos por testículo, explican el crecimiento testicular inicial hasta los 8 meses de edad; a partir de entonces, el crecimiento testicular es principalmente el resultado del aumento de la longitud total del túbulo seminífero (Curtis & Amann, 1981).

El crecimiento testicular acelerado observado después de los 6 meses de vida en toros ocurre cuando las concentraciones circulantes de gonadotropinas están disminuyendo, lo que indica la existencia de mecanismos independientes de GnRH importantes que regulan el desarrollo testicular. El período de crecimiento testicular acelerado coincide con concentraciones circulantes de IGF-I y leptina, y se han observado fuertes asociaciones entre estas hormonas y el tamaño testicular en toros en crecimiento (Brito *et al.*, 2007a, d), lo que indica que las hormonas metabólicas pueden estar involucradas en la regulación del desarrollo testicular independiente de GnRH.

Se supone que los efectos de las hormonas metabólicas sobre el crecimiento testicular son directos e independientes del hipotálamo y la hipófisis, debido a que no se encontraron asociaciones entre las hormonas metabólicas circulantes y las concentraciones de gonadotropinas. El aumento de las concentraciones circulantes de IGF-I y leptina se asoció con una mayor longitud de los túbulos seminíferos y, probablemente, con un aumento general en el número total de células testiculares. Por lo tanto, se presume que IGF-I y leptina circulantes participan en la regulación de la multiplicación y maduración de células de Leydig, la maduración de células de Sertoli y la multiplicación de células

germinales durante el período de crecimiento testicular acelerado independiente de GnRH (Chenoweth & Lorton, 2014).

Las concentraciones testiculares de receptores de LH y FSH en toros de carne disminuyen alrededor de 5 a 6 meses de edad, pero luego aumentan hasta por lo menos 13 meses de edad, esto podría actuar para aumentar la sensibilidad de las células de Leydig y Sertoli a las bajas concentraciones de gonadotropinas que ocurren durante la fase de crecimiento testicular rápido (Bagu *et al.*, 2006).

Otros mecanismos que pueden estar asociados con el crecimiento testicular independiente de GnRH incluyen cambios en las concentraciones testiculares y la biodisponibilidad de factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante (TGF- α y TGF- β 1, 2 y 3) e interleucinas (IL-1 α , IL -1 β e IL-6) (Bagu *et al.*, 2010a, b). Además, el efecto de la nutrición en el desarrollo sexual ha demostrado que el impacto de las gonadotropinas en los tejidos diana durante el período prepuberal tiene efectos a largo plazo sobre el desarrollo testicular en los toros (Brito *et al.*, 2007b, c, d).

2.1.3. Andrología aplicada al ganado *Bos indicus*

Algunas características que han sido asociadas con los genotipos *B. indicus* son la tolerancia al calor, a los ectoparásitos y la capacidad de adaptarse con éxito a condiciones nutricionales difíciles, características de las áreas tropicales. Sin embargo, se incluyen también algunas características menos favorables como, retraso en la pubertad y madurez sexual, supervivencia deficiente del ternero, intervalos prolongados de concepción del parto y, en general, una fertilidad reducida en comparación con los genotipos *B. taurus*. Por otra parte, los toros *B. indicus* se han ganado una reputación en algunos sectores por tener testículos más pequeños, menor líbido y una peor calidad de semen que los *B. taurus*. En consecuencia, el bajo rendimiento productivo se ha asociado históricamente con el ganado *B. indicus* (Chenoweth & Lorton, 2014).

2.1.3.1. Características fisiológicas de los toros *Bos indicus*

La capacidad de los toros *B. indicus* para resistir las condiciones ambientales que prevalecen en los trópicos ha sido ampliamente reconocida, aunque gran parte del punto importante de estudio original estaba en su capacidad para resistir los efectos del clima. Actualmente se reconoce que el ganado *B. indicus* posee capacidades superiores para resistir otros efectos adversos en la producción de ganado en áreas tropicales, como forraje de baja calidad y enfermedades causadas por hemoprotozoos y otros parásitos (Cartwright, 1980).

Los toros *B. indicus* tienen una mayor capacidad que los toros *B. taurus* para regular la temperatura de su cuerpo en un ambiente tropical. Se realizaron algunos estudios en donde se demostró que los toros *B. indicus* tienen más glándulas sudoríparas por unidad de área de la piel y mayor producción de sudor que los toros *B. taurus*. Además, se demostró que el número de capas de la epidermis es mayor en *B. indicus* que en toros Simmental, y esto se correlaciona negativamente con la temperatura corporal durante el reposo o el esfuerzo (Carvalho *et al.*, 1995).

El mayor número de estratos epiteliales puede estar involucrado en el mantenimiento de la temperatura corporal. En consecuencia, la capacidad de sudoración es mayor y aumenta más rápidamente en un entorno caluroso, lo que permite que los toros *B. indicus* pierdan más calor por la evaporación de la piel que las razas europeas. Esto da como resultado que difícilmente se observen signos de estrés por calor en toros expuestos a temperaturas de hasta 37° C y alta humedad. También se ha encontrado que la capa lisa de pelo de los toros *B. indicus* proporciona una buena resistencia a la radiación solar (Finch, 1986; Carvalho *et al.*, 1995).

El ganado *B. indicus* se reconoce también por su capacidad para utilizar mejor los forrajes de mala calidad y sus menores requerimientos nutricionales para el mantenimiento que los toros *B. taurus* ya que los toros *B. indicus* pueden reducir su tasa metabólica durante la estación seca cuando los pastos de buena calidad son escasos (Rekwot *et al.*, 1994).

Existen también diferencias hematológicas entre el ganado *B. indicus* y *B. taurus*, el recuento y los niveles de hemoglobina en glóbulos rojos es más alto en toros Brahman (*B. indicus*) que en toros Hereford (*B. taurus*) (Turner, 1980). Esta condición junto con sus mecanismos como pérdida de calor, puede explicar las bajas temperaturas corporales y las tasas de respiración observadas en *B. indicus* durante el descanso o después de caminar en climas tropicales (Carvalho *et al.*, 1995).

En cuanto a la termorregulación testicular y escrotal, Turner (1980) informó que la piel del escroto en toros *B. indicus* es lampiña y menos gruesa que la de los toros *B. taurus*. Estas características facilitan la pérdida de calor de los vasos testiculares superficiales, por lo que actúan a favor de la termorregulación testicular. Por otro lado, la relación entre la longitud y el volumen de la arteria testicular y las relaciones de volumen testicular fue significativamente mayor en *B. indicus* y cruces relacionados que en los toros de *B. taurus*. Los toros *B. indicus* también mostraron menor grosor de la pared de la arteria testicular que toros mestizos y *B. taurus* y menor distancias entre arterias y venas (Brito *et al.*, 2004). Como consecuencia, la distancia tan próxima entre los vasos sanguíneos arteriales y venosos en los machos *B. indicus* es más eficiente para reducir la temperatura de la sangre arterial que llega a los testículos. Así pues, podría explicarse la menor prevalencia de degeneración testicular, probablemente como resultado del estrés por calor ambiental en los trópicos en *B. indicus* que en toros *B. taurus*.

2.1.3.2. Pubertad y madurez sexual

Se ha dado escasa atención a los factores implicados en la regulación de la pubertad y la madurez sexual en toros *B. indicus* en comparación con los toros *B. taurus*. Aunque la secuencia de eventos endocrinos y otros asociados con el logro de la pubertad son similares en las dos especies, existe un acuerdo general de que los toros *B. indicus* alcanzan la pubertad y la madurez sexual más tarde que los *B. taurus*, incluso cuando se crían bajo condiciones similares (Silva-Mena, 1997).

La información sobre la edad de la pubertad y la madurez sexual en toros *B. indicus* difiere según la raza involucrada, las condiciones de estudio, principalmente el manejo nutricional de los animales de experimentación, y cómo se definieron la pubertad y el logro de la madurez sexual. Generalmente se emplea la definición de pubertad de Wolf *et al.*, (1965) como la edad a la que el toro es capaz por primera vez de producir un eyaculado que contiene al menos 50×10^6 espermatozoides con un mínimo de 10 % de motilidad progresiva. Otros han definido la pubertad mediante el reconocimiento de indicadores histológicos del inicio de la espermatogénesis en preparaciones de tejido testicular. Si bien es cierto que este último método tiene el potencial de lograr una mayor precisión que el anterior, presenta una desventaja de no poder repetirse en el mismo animal.

La circunferencia escrotal (CE) es el mejor predictor e indicador de la edad de la pubertad y la madurez sexual en los toros *B. indicus*, independientemente de la raza, e incluso más que el peso corporal o la edad cronológica (Chenoweth & Lorton, 2014).

Dado que existen diversos resultados de investigaciones de diferentes regiones del mundo, es evidente que las influencias tanto genéticas como ambientales pueden afectar fuertemente la edad en la pubertad en los toros *B. indicus*. La pubertad, sin embargo, no es sinónimo de madurez sexual o incluso de fertilidad aceptable. Correa *et al.*, (2006) obtuvieron valores de la motilidad espermática y los espermatozoides totales por eyaculado que van del 14 al 42 % y de 91 a 315.8 ($\times 10^6$), respectivamente. A pesar de que tales valores son consistentes con la evidencia del logro de la pubertad, no permitiría a estos toros alcanzar niveles satisfactorios de fertilidad reproductiva, sino hasta que lograron una CE media y un peso corporal de 33.5 cm y 490 kg, respectivamente, lo que en algunos toros no fue hasta los 2 años.

Un evento que ocurre durante la pubertad en los toros *B. indicus* es el desprendimiento de la mucosa prepucial del glande del pene. Fenómeno gradual que comienza alrededor de los 7 meses de edad en la mayoría de las razas cebú (Trocóniz *et al.*, 1991).

La nutrición desempeña un papel importante en el inicio de la pubertad y el logro de la madurez sexual en los toros *B. indicus* (Vale Filho *et al.*, 1996). Los toros desnutridos muestran un deterioro en el crecimiento corporal, retraso en la pubertad y retraso en el desarrollo del sistema endocrino y del aparato reproductor (Rekwot *et al.*, 1994). Las deficiencias de micronutrientes esenciales, como zinc, selenio y vitaminas A y E pueden afectar negativamente la liberación de gonadotropina por la glándula hipófisis, lo que perjudica la replicación y funcionalidad de las células de Sertoli, así como también la síntesis de esteroides hormonales por las células de Leydig (Dunn & Moss, 1992). Dado que el proceso crítico de la multiplicación de las células de Sertoli se produce solo durante el período peri-puberal, la privación nutricional en este periodo puede afectar grave e irreversiblemente el rendimiento reproductivo potencial de los toros jóvenes *B. indicus*.

2.1.3.3. Fertilidad en toros *Bos indicus*

La eficiencia reproductiva de los hatos en regiones tropicales, donde la producción de ganado de carne se basa en razas de *B. indicus* manejadas extensivamente en pasturas naturales, a menudo ha sido reportada como baja en comparación con las áreas más templadas, donde predomina el ganado de *B. taurus*. En América Central, la tasa anual de parto en el ganado de carne no llega al 50% y se destaca que la pobre eficiencia reproductiva de los machos reproductores contribuye en gran medida a este escenario, una situación que aún es evidente (Chacón, 2009).

La cantidad del problema atribuible al papel del padre es, hasta ahora, indeterminado. Sin embargo, la falta de control andrológico periódico para determinar la idoneidad de los toros para la reproducción natural ciertamente contribuye al bajo rendimiento reproductivo que se encuentra a menudo. Esta observación se ve reforzada por el hecho de que, cuando se aplica el monitoreo andrológico, generalmente resulta en la identificación de toros con capacidades reproductivas pobres. Se considera que la identificación rutinaria y la eliminación de los machos problemáticos de los grupos de reproductores ayudaría a contrarrestar la opinión probablemente errónea sostenida por algunos autores de que los toros *B. indicus* tienen una fertilidad inherentemente baja.

La fertilidad es un estado multifactorial al que contribuyen tanto los machos como las hembras. Los machos deben producir una eyaculación fértil y ser competentes para entregarlo a la hembra. Las hembras deben ser capaces de producir ovocitos fértiles y proporcionar un sistema reproductivo compatible con el transporte de esperma, la capacitación, fertilización de óvulos y el desarrollo embrionario y fetal (Chenoweth & Loton, 2014).

La fertilidad de los toros *B. indicus* en monta natural, cuando se mide por medio de gestaciones o tasa de partos, debe abarcar una amplia gama de factores decisivos, que pueden incluir factores climáticos estresantes, ciclicidad y fertilidad de las hembras, restricciones nutricionales y comportamiento sexual. Silva-Mena *et al.*, (2000) estudiaron el comportamiento sexual y las tasas de gestación de los toros Brahman y Nellore (n=15), que fueron criados individualmente con grupos de 16 vaquillas no sincronizadas en México. La tasa media de gestación en estas condiciones fue de $59.2 \pm 5.8\%$.

La tasa de concepción en 38 toros adultos *B. indicus* emparejados individualmente con grupos de 24.0 ± 13 vacas en la zona sur de Costa Rica tropical mostraron diferencias significativas según el estado andrológico de los toros probados (Navarro *et al.*, 2008).

Los toros clasificados como sanos para la reproducción lograron una tasa de gestación más alta en comparación con los toros no sanos (82.5 ± 12.1 vs $28.4 \pm 30.5 \%$, respectivamente, $P < 0.05$). Aunque no se encontraron diferencias estadísticas para la tasa de concepción entre los grupos de padres sanos y diferidos (o cuestionables), la última categoría tendía a mostrar una tasa de gestación más baja ($77.4 \pm 27.2\%$).

Estos datos respaldan la afirmación de que, si los toros *B. indicus* se seleccionan en función de los atributos relacionados con la fertilidad, pueden funcionar tan eficientemente como cualquier otro grupo de toros, independientemente del genotipo en condiciones de apareamiento natural.

2.2. Efecto a nivel molecular de rBST sobre la producción de semen en toros

Con el avance de la biotecnología y el conocimiento más detallado de la fisiología de la reproducción, se han podido evaluar diferentes protocolos que ayuden a mejorar las características seminales de los toros reproductores, no solo por medio de las hormonas de la reproducción, naturales y sintéticas, sino que también se ha tenido la posibilidad de utilizar otros compuestos, como es el caso de la Somatotropina Recombinante Bovina (rBST), hormona de origen peptídico de citoquinas, que en forma natural es producida por la hipófisis anterior.

Esta hormona es una molécula proteica que está compuesta por 190 o 191 aminoácidos en una sola cadena, su administración provoca una reducción en la asimilación de la glucosa en los tejidos periféricos e incrementa la producción hepática de glucosa, de tal manera que existe más glucosa disponible (Capuco *et al.*, 1989). También esta hormona está asociada más a menudo al crecimiento longitudinal postnatal en los tejidos diana, incluyendo el metabolismo hepático, muscular, adiposo, celular y óseo (Kopchick & Andry, 2000).

Se ha demostrado que la GH se produce de manera endógena dentro de la formación del hipocampo, ésta es una estructura cerebral que está asociada con el aprendizaje y aspectos de la experiencia emocional. Se pudo demostrar que la producción de GH endógena se modula por la edad y sexo, así como por la presencia de estrógenos. Los niveles de mRNA de la GH fueron mayores en las hembras que en los machos, especialmente durante el proestro, una etapa de estro cuando los niveles de estrógeno están elevados. Además, la expresión de GH se incrementó en hembras ovariectomizadas que fueron tratadas con estradiol (Donahue *et al.*, 2006).

La hormona del crecimiento exógena fue utilizada en vacas lecheras hace más de 50 años, por científicos rusos, que demostraron que el extracto crudo de glándula hipófisis inyectado, incrementó la producción de leche (Tabares *et al.*, 2014).

A partir de entonces se han realizado numerosas investigaciones, utilizando la hormona del crecimiento para aumentar la producción de leche, con resultados muy variables. Existen reportes de algunos estudios en donde la aplicación de rBST aumentó la producción de leche de aproximadamente 2.25 a 6.6 litros/vaca/día e incrementó el periodo de lactancia de 30 a 100 días (Tabares *et al.*, 2014).

La GH no es una gonadotropina, sin embargo, ha estado implicada directamente en el control de la función gonadal en diversas especies. Existen diversos estudios que básicamente se han enfocado a la función ovárica, estos estudios también son importantes debido a que existen toros dedicados a la reproducción que son tratados con esta hormona en diferentes partes del mundo (Deaver & Bryan, 1999).

En la Figura 2 se puede observar la forma recombinante de la GH, la somatotropina recombinante bovina (rBST), la cual se ha utilizado en el ganado lechero para mejorar la producción de leche, así como en el ganado productor de carne, específicamente en aquellos sementales en los que se quieren mejorar las características seminales. Los efectos del tratamiento con rBST han sido ampliamente estudiados, sin embargo hasta el año 2009 los métodos analíticos capaces de detectar rBST estaban limitados a inmunoensayos, que sufren la imposibilidad de distinguir entre la forma endógena y la recombinante (Le Breton *et al.*, 2009).

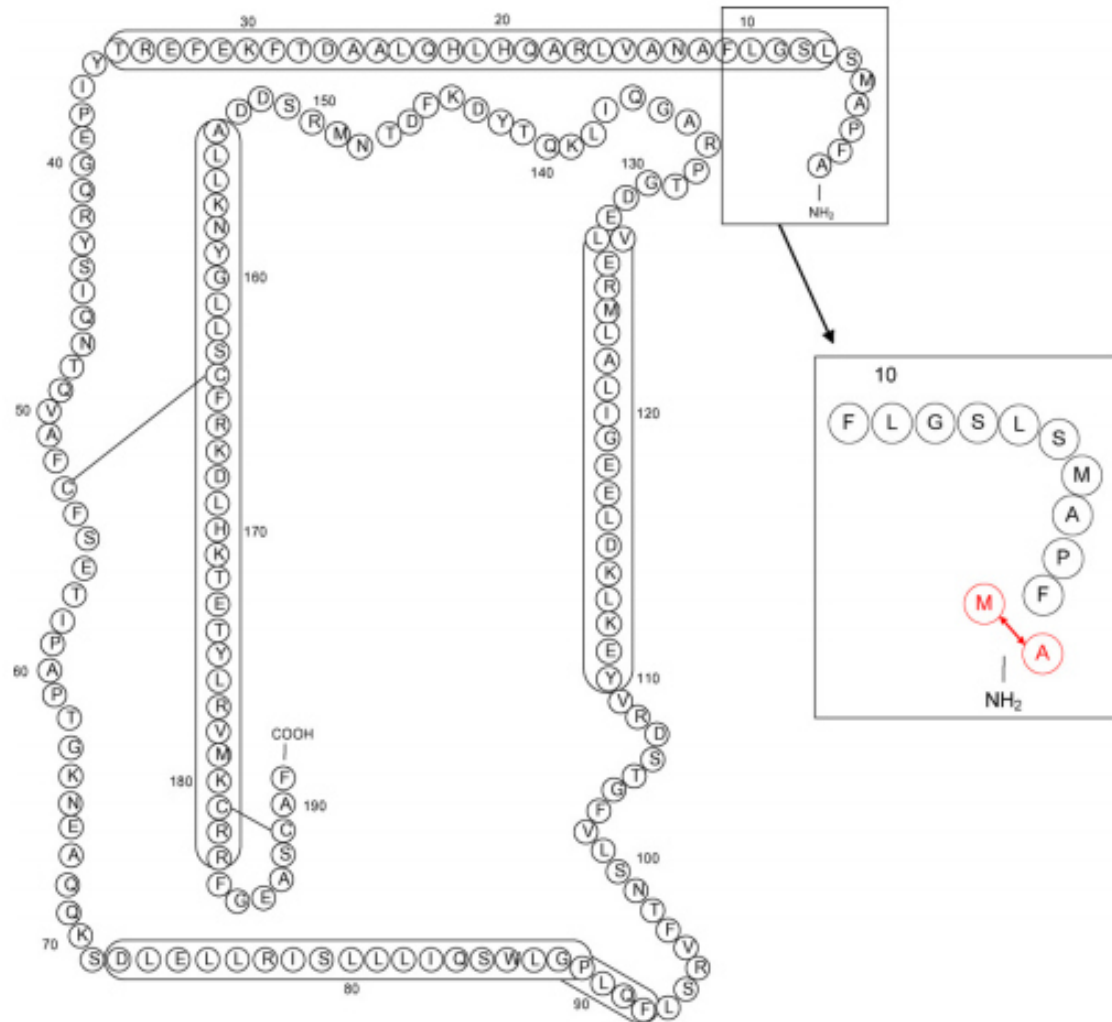


Figura 2. Representación esquemática de la molécula de la hormona del crecimiento bovino con el N-terminal detallado. La alanina (A) se presenta en la forma endógena se sustituye por una metionina (M) en la recombinante. Tomada de (Le Breton *et al.*, 2009).

Se han realizado investigaciones para ayudar a entender los mecanismos de regulación tanto en los ovarios de las hembras como en los testículos de los machos. La hormona luteinizante (LH) y la foliculo estimulante (FSH) claramente juegan un papel importante en el control de la función gonadal. Otros factores que están involucrados en la regulación de la reproducción son las Somatomedinas C, un grupo de compuestos de la familia de los factores de crecimiento similar a la insulina (IGF's) así como sus proteínas de unión (Deaver & Bryan, 1999).

2.2.1. Mecanismo de Acción de la rBST

2.2.1.1. Secreción y modos de acción de la somatotropina:

La somatostatina y la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) se producen en el hipotálamo y controlan la secreción de ST. Como se observa en la Figura 3, la somatostatina inhibe la liberación de GH de la pituitaria anterior, mientras que la GHRH estimula la liberación. El estrés, el sueño y el ejercicio pueden mejorar la producción de GHRH, aumentando los niveles séricos de GH. La GH se libera en la circulación en picos secretorios que son más pronunciados en los machos que en las hembras. La GH sérica puede unirse a receptores de superficie celular (GHR) sobre los tejidos diana tales como hígado, músculo, tejido adiposo y hueso. Esto provoca un aumento en la concentración sérica del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I). El IGF-I tiene efectos promotores del crecimiento y puede tener un efecto de retroalimentación a los tejidos para activar las respuestas. Además, niveles altos de IGF-I en suero inhiben la liberación de GHRH y GH (Kopchick & Andry, 2000).

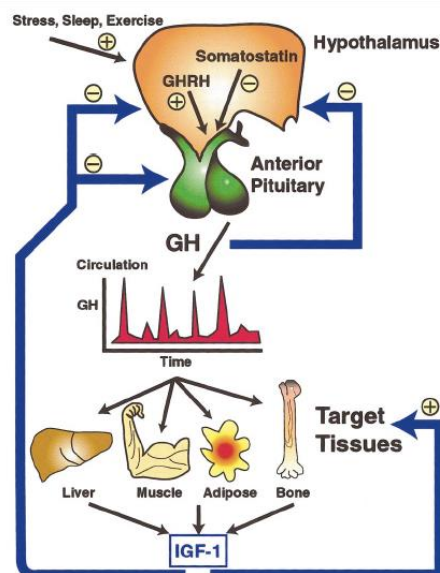


Figura 3. Secreción y modos de acción de GH. Tomado de (Kopchick & Andry, 2000).

Se ha demostrado que existe una amplia distribución del receptor de GH en los sistemas reproductores masculino y femenino de la rata. En trabajos en donde se utilizó la técnica de inmunoreactividad, la más prominente se asoció con tipos de células epiteliales y/o endoteliales, lo que sugiere que los efectos de la GH sobre la función reproductora están mediados, al menos parcialmente, en este nivel (Lobie *et al.*, 1990).

La GH ejerce sus efectos en los tejidos diana de manera directa o indirecta a través de su efector secundario, el factor de crecimiento similar a la insulina- tipo 1 (IGF-I). Estudios recientes sugieren que el eje GH – IGF-I también desempeña un papel importante en las funciones del sistema nervioso central, incluyendo aquellas asociadas con el crecimiento, desarrollo y protección neuronal (Nyberg, 2000).

Aunque se considera que GH no es una hormona reproductiva, es necesaria para la diferenciación sexual y la maduración puberal y participa en la esteroidogénesis gonadal, la gametogénesis y la ovulación (Kopchick & Andry, 2000). La GH también es necesaria para la nutrición fetal y el crecimiento durante el embarazo y para el desarrollo mamario y la lactancia. Aunque algunos de estos roles reflejan la acción de la GH sobre la secreción y la acción de LH y FSH (Chandrashekar & Bartke, 1998), también reflejan acciones directas de GH y acciones indirectas mediadas a través de la producción local del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I.

A medida que la GH se produce en los tejidos gonadal y mamario, estas acciones pueden reflejar acciones autócrinas locales o parácrinas, así como las acciones endocrinas de la GH producida por la hipófisis. Se sabe que los ejes somatogénicos y gonadotróficos están estrechamente relacionados durante el crecimiento y la maduración sexual (Hull & Harvey, 2000). Sin embargo, en estudios experimentales (Cuadro 1), se revela que la GH afecta directamente la esteroidogénesis, gametogénesis y la diferenciación gonadal así como la secreción de gonadotropinas.

Además, mientras que estas acciones pueden reflejar las funciones endócrinas de la hipófisis, también reflejan acciones autócrinas o parácrinas, desde que la GH es producida

en los tejidos reproductivos. Dentro del sistema reproductivo del macho, a nivel testicular la GH juega un papel importante en el crecimiento y desarrollo, está demostrado en humanos que una deficiencia de GH está asociada con la presencia de testículos anormalmente pequeños (Hull & Harvey, 2000).

Cuadro 1. Roles supuestos y establecidos para GH en el sistema reproductivo de machos y hembras. Tomado de (Hull & Harvey, 2000).

Roles establecidos	Roles supuestos
Acción en ovarios	
Esteroidogénesis Inducción de la ovulación Crecimiento folicular Reclutamiento folicular Maduración del ovocito	
Acción extra-gonadal en hembras	
Actividad secretora de las células epiteliales del oviducto. Crecimiento de la placenta. Hiperplasia de la glándula mamaria. Incremento de la síntesis de leche.	Esteroidogénesis placentaria. Síntesis de lactógeno placentario.
Acción en testículos	
Espermiogénesis. Esteroidogénesis. Motilidad espermática.	Espermatogénesis.
Acción extra-gonadal en machos	
Diferenciación de los ductos reproductivos. Desarrollo del pene. Síntesis de enzimas en glándula vesicular y próstata.	

2.2.1.2. Gametogénesis

En algunos casos se llega a presentar una resistencia a la GH que puede estar asociada con la disminución de la fertilidad en los hombres, lo que muestra que la GH tiene un papel importante dentro de la gametogénesis testicular (Laron & Klinger, 1998).

En algunas ocasiones, la GH se ha utilizado como un complemento con la FSH para el tratamiento clínico de la infertilidad en machos y algunas formas de infertilidad resultan, de cierto modo, de una deficiencia de GH (Carani *et al.*, 1999).

La motilidad de los espermatozoides en machos se ve afectada generalmente por una deficiencia de GH y se mejora mediante una administración de GH exógena. Se ha informado que el 91 % de los hombres azoospermicos eran deficientes en GH, mientras que sólo el 18 % de los hombres oligozoospermicos tenían deficiencia de GH (Hull & Harvey, 2000).

Otros estudios clínicos también han llegado a la conclusión de que la GH es necesaria para la morfología normal de los espermatozoides así como para mejorar la concentración (Gravance *et al.*, 1997).

La administración de GH aumenta la motilidad de los espermatozoides y las concentraciones seminales del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-I) en hombres, lo que puede indicar que la producción local de IGF-I media las acciones gametogénicas de GH (Gomez *et al.*, 1999).

Un descubrimiento importante es que a medida que la motilidad de los espermatozoides se desarrolla en el epidídimo, en lugar de que se lleve a cabo en las vesículas seminales, y como el IGF-I epididimal no se incrementa al administrar GH, la acción gametogénica de esta hormona probablemente es que sea de manera directa (Gravance *et al.*, 1997). Esta posibilidad está respaldada por la demostración de que el IGF-I realmente afecta la motilidad del esperma humano (Miao *et al.*, 1998).

2.2.1.3. Esteroidogénesis

La GH puede alterar la gametogénesis al afectar la síntesis de testosterona necesaria para la producción de espermatozoides ya que el ARNm que codifica para el receptor de la hormona del crecimiento (GHR) está presente en las células de Leydig de rata. Se ha observado que la GH aumenta la producción de testosterona en hombres deficientes de GH en las células de Leydig del progenitor (PLC) de ratas aisladas. Sin embargo, como la síntesis de enzimas esteroidogénicas se asocia con la diferenciación de PLCs en células Leydig maduras, la esteroidogénesis inducida por GH puede reflejar su inducción de diferenciación celular. La GH también es capaz de inducir directamente la expresión de varios genes que codifican enzimas esteroidogénicas en células de Leydig diferenciadas, así como inmaduras. La GH estimula la conversión de pregnenolona en progesterona aumentando la actividad de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. La síntesis inducida por GH de esta enzima depende de la síntesis de proteínas *de novo* (quizás de IGF-I) y de quinasas de tirosina (Cells *et al.*, 1998).

Otra enzima, la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR), regula la translocación del colesterol a las mitocondrias, donde se convierte en pregnenolona. Por el contrario, la GH estimula la producción de StAR independientemente de la síntesis de proteínas *de novo* y, por lo tanto, de la síntesis de IGF-I, y tirosina quinasas. Por lo tanto, es probable que la GH module la esteroidogénesis testicular por mecanismos independientes de IGF-I y posiblemente por IGF-I dependientes, al menos en ratas (Kanzaki & Morris, 1999).

2.2.2. Receptores Testiculares de la somatotropina

La posibilidad de que la GH actúe localmente para afectar directa o indirectamente la función reproductiva se apoya en la distribución de los receptores de GH (GHRs) en el tracto reproductivo masculino. La inmunorreactividad de GHR o el ARNm que codifica GHR están abundantemente presentes en el conducto de Wolff-Müller, en el uréter, el epidídimo, el conducto deferente, las vesículas seminales, la próstata y los testículos,

células de Leydig, células de Sertoli, espermatogonias, espermatocitos, de ratas fetales y adultas (Gravance *et al.*, 1997).

Esta inmunorreactividad probablemente corresponde a receptores bioactivos, ya que los GHR somatogénicos de alta afinidad están presentes en el testículo de trucha, particularmente en células de Sertoli (Gomez, 1998) y la GH activa a STAT5b, que es una molécula de señalización, en las células de Leydig de rata (Cells *et al.*, 1998).

Estos receptores pueden afectar la función reproductiva a través de la producción local de IGF-I, ya que la inmunoreactividad de IGF-I, el ARNm que codifica IGF-I y los receptores IGF-I, también se encuentran en células testiculares de rata. El tratamiento con GH en ratas dw/dw aumenta las concentraciones de IGF-I en plasma, células de Sertoli, fluido vesicular seminal y fluido epididimal (Gravance *et al.*, 1997).

Sin embargo, el IGF-I testicular en las ratas también está regulado por las gonadotropinas del hipotálamo y, por lo tanto, está más ligeramente ligado a la GH que el IGF-I hepático (Closset *et al.*, 1989).

2.2.3. Papel de la somatotropina en la función testicular

En la Figura 4 se esquematiza la relación de la esteroidogénesis en las células de Leydig y la gametogénesis en los túbulos seminíferos, reguladas principalmente por LH y FSH, respectivamente. La GH producida en la hipófisis (círculos negros) y la GH que se produce en los testículos (círculos rojos) se unen a los receptores GH de células de Leydig (GHR), activa sistemas de segundo mensajero y estimula la actividad de varias enzimas esteroidogénicas directamente y aumentando la abundancia del receptor de LH.

La GH hipofisaria o gonadal (círculos rojos) altera la gametogénesis en los túbulos seminíferos uniéndose a GHRs en células de Sertoli, para estimular la conversión de espermatogonias en espermatocitos (1), espermatocitos en espermatidas (2) y las espermatidas en espermatozoides móviles (3).

La GH endocrina de la hipófisis puede estar implicada en el mantenimiento estratégico de la reproducción masculina, mientras que la GH testicular puede estar implicada en la modulación de emergencia de la función testicular. Algunas de las acciones testiculares de GH son moduladas por IGF-I testicular (Hull & Harvey, 2000).

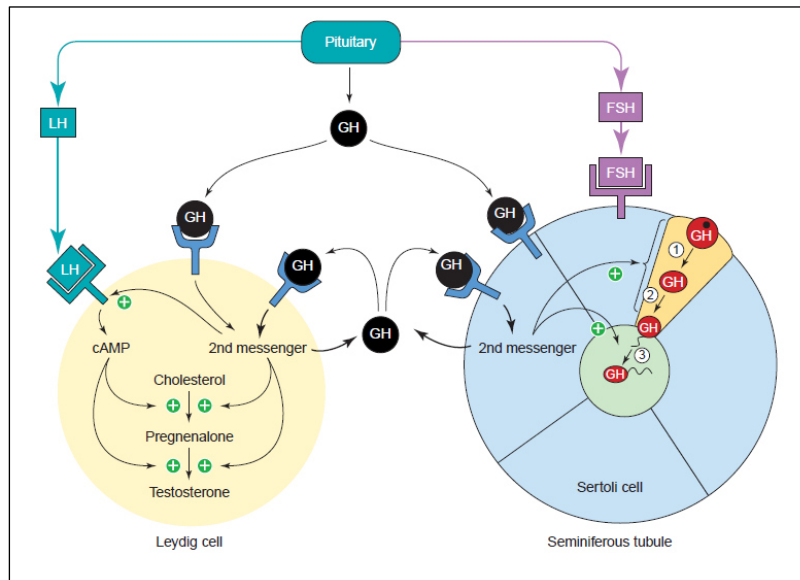


Figura 4. Papel de la hormona del crecimiento (GH) en la función testicular. Tomada de (Hull & Harvey, 2000).

2.2.4. Acciones extra testiculares

Las acciones autócrinas, parácrinas y, posiblemente, endocrinas de GH también han sido implicadas en el desarrollo y posterior función de las estructuras derivadas del conducto de Wolff, tales como la próstata y las vesículas seminales. Se ha demostrado ya que el antisuero de GH bloquea la diferenciación del conducto de Wolff en fetos de ratón macho, mientras que la administración de GH restaura la diferenciación normal. La escasez de la producción de GH en la hipófisis prenatal y la detección de inmunoreactividad de GH y GHR en el tracto reproductivo del feto de ratón indica que es GH local, y no hipofisaria, lo que induce este efecto. La diferenciación inducida por GH del tracto reproductivo de ratón también se asocia con concentraciones aumentadas de proteína de unión a

andrógenos (ABP) y se puede imitar por IGF-I. De este modo, la GH producida localmente puede estimular IGF-I local, e IGF-I puede permitir concentraciones adecuadas de ABP's para permitir la diferenciación inducida por testosterona del conducto de Wolff (Hull & Harvey, 2000).

La función posnatal de las estructuras derivadas de los conductos de Wolff puede controlarse de manera similar por la GH local o sistémica. Por ejemplo, la administración de GH estimula la actividad enzimática hidrolítica y las concentraciones de proteína de unión a andrógenos en la próstata de rata y la vesícula seminal (Reiter *et al.*, 1999) y la expresión de un transgén de GH bovino que aumenta la masa prostática en ratones (Bartke *et al.*, 1992).

La GH puede afectar la función de la próstata a través del IGF-I local, ya que la GH estimula el receptor de andrógenos, las concentraciones de los receptores de IGF-I e IGF-I en la próstata de rata están presentes en abundancia. Sin embargo, el IGF-I puede imitar el efecto de la GH en algunas, pero no en todas, las enzimas prostáticas y, por tanto, puede haber tanto una acción dependiente de IGF-I como una acción independiente de GH (Reiter *et al.*, 1999).

La GH también puede ser necesaria para el desarrollo normal del pene, ya que la deficiencia congénita de GH o resistencia está clínicamente asociada con micro penes. El IGF-I local o hepático probablemente regula el efecto de la GH en el crecimiento del pene, ya que el tratamiento con IGF-I de varones y hombres resistentes a GH da como resultado un aumento en el tamaño del pene que se revierte después del cese del tratamiento (Laron & Klinger, 1998).

2.2.5. Transducción de Señal Mediada por STH

La capacidad de la ST o GH para promover sus diversos efectos depende de la interacción de esta hormona con proteínas de unión específicas. Dentro de estas proteínas, aparentemente la más importante parece ser el receptor de GH (GHR). GH se une a GHRs

en los tejidos diana para iniciar las primeras respuestas y acciones. El estudio de los mecanismos de unión GH-GHR, así como de la estructura de GHR y cascadas de señalización impuestas por esta interacción, es importante para una mejor comprensión de las acciones de GH. Una forma soluble del dominio extracelular de GHR que se encuentra en el suero es la proteína de unión a la hormona del crecimiento (GHBP) (Kopchick & Andry, 2000).

La GH actúa uniéndose los receptores que se encuentran bajo la forma de homodímeros en la membrana de las células (Figura 5) y desafía el modelo históricamente conocido de la formación de dímeros de activación del RGH inducido por la unión de la GH (Ballerini & Ropelato, 2008).

Se ha propuesto un nuevo mecanismo mediante el cual una única molécula GH generaría los dímeros de activación (2RGH:1GH). El dominio extracelular del RGH está compuesto por un subdominio 1 N-terminal de unión a la GH y un subdominio 2 próximo a la membrana celular. Entre ambos subdominios existe una región denominada bisagra. Inicialmente, el dímero del RGH se formaría por la interacción de los subdominios 2 del DEC, proceso facilitado por proteínas chaperonas del retículo endoplásmico. Paso seguido los DTM interactuarían y sellarían ambos receptores bajo una estructura dimérica para finalmente ser transportados hacia la membrana como homodímeros (Kopchick & Andry, 2000).

En respuesta a GH, la tirosina quinasa (Janus Kinasa) JAK2 de 121 kDa es rápidamente fosforilada y activada mientras está asociada con el GHR. JAK2 es un miembro de la familia de las tirosin-quinasas citoplasmáticas que actualmente se incluyen JAK1, JAK2, JAK3 y tyk2.

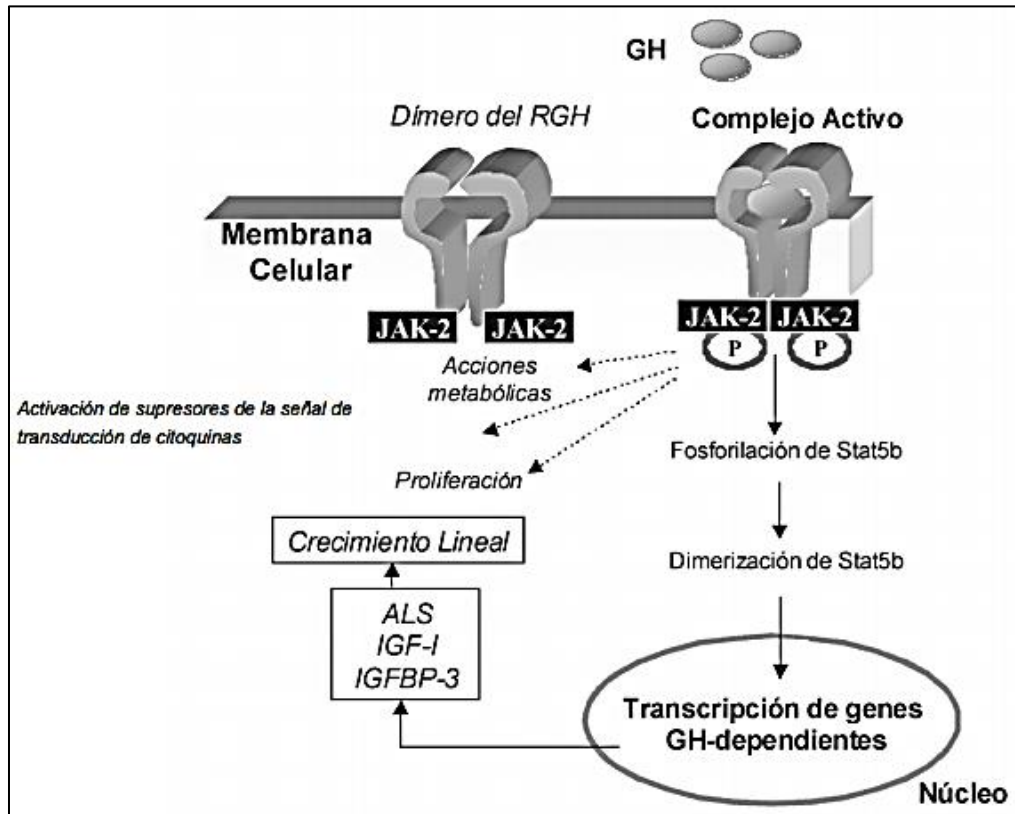


Figura 5. Modelo de mecanismo de activación del RGH. Tomado de (Ballerini & Ropelato, 2008).

A manera de resumen, la GH se une al GHR mediante un mecanismo de dos etapas. Primero se une a un sitio de alta afinidad 1 en el primer GHR, luego se une a un sitio de afinidad inferior 2 en un segundo GHR. Este evento causa la dimerización del receptor, un complejo que consiste en dos GHRs y una molécula de GH. El GHR carece de actividad intrínseca de tirosina quinasa, pero se asocia con la tirosina quinasa JAK2. El evento de dimerización permite que dos moléculas JAK2 se aproximen una a la otra, activando así la otra a través de la fosforilación de la tirosina. La principal vía de señalización de GH es a través de los transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT), en particular STAT5. Además, la vía de Proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) es activada por GH. Otras moléculas de señalización reguladas positivamente en respuesta a GH incluyen las proteínas SOCS (Supresores de la señalización de citoquinas) que pueden inhibir la señalización de GH, PLC, PKC, FAK, SH2-Bbeta y otras (Figura 6) (Kopchick & Andry, 2000).

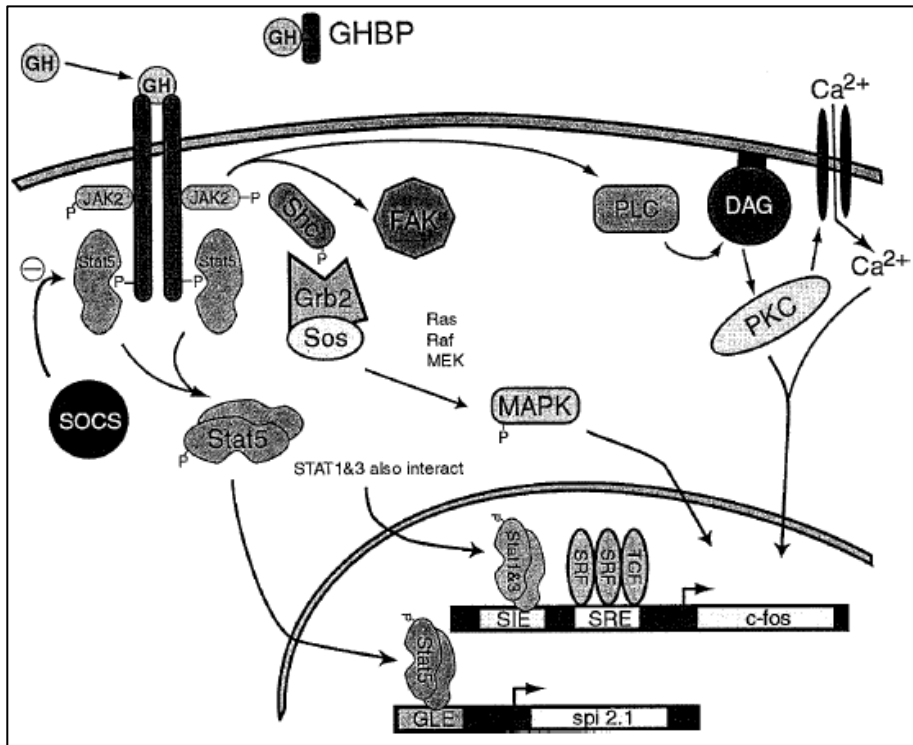


Figura 6. Representación esquemática de las vías de transducción de señales activadas por GH. Tomada de (Kopchick & Andry, 2000).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar del estudio

El trabajo fue realizado en el Centro de Biotecnología Reproductiva (CBR) de la Unión Ganadera Regional de Nuevo León (UGRNL), ubicado en General Bravo, Nuevo León, México. La presencia de lluvias con mayor intensidad es en los meses de agosto y septiembre. La temperatura máxima fue de 36°C y mínima de 5°C, durante el estudio, así como un índice de temperatura – humedad (ITH) promedio de 68.

3.2. Unidades experimentales, mantenimiento y alimentación

Se evaluaron 19 toros divididos por genotipo en *Bos taurus* o europeos (n = 6) y cruzados de *Bos taurus* con *Bos indicus* conocidos como sintéticos (n= 13), con una edad y peso promedio de 36 ± 13 meses y 800 ± 170 kg respectivamente (Figura 7).



Figura 7. Fotografía representativa de los toros europeos (A) y sintéticos (B) utilizados en el estudio.

Los animales experimentales en su entrada fueron alojados individualmente en un área aislada de 36 m², en donde les fueron tomadas muestras de sangre, suero, raspados prepucciales y heces.

Estos especímenes fueron sometidos a diversas pruebas efectuadas por el Médico Veterinario Responsable Autorizado del Centro de Procesamiento, mediante las cuales, se

llegó a un diagnóstico de toros negativos para las siguientes enfermedades: tuberculosis, brucelosis, tricomonas, campilobacter, leucosis, leptospira, paratuberculosis, diarrea viral bovina, rinotraqueitis infecciosa bovina, lengua azul, tras lo cual fueron declarados aptos para el procesamiento del semen.

Posteriormente, concluyendo el periodo de cuarentena, los animales fueron alojados en corrales de 400 m². Durante todo el experimento fueron alimentados con pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*) y Johnson (*Sorghum halepense*) a libre acceso, alimento concentrado y agua a libre acceso.

Es importante mencionar la situación que se vive en el CBR, pues un porcentaje alto, 50 a 60 %, de los toros que ingresan a las instalaciones se encuentran en un estatus de toros problema, es decir, son toros a los cuales se les intentó colectar semen en campo, teniendo resultados negativos. También se tienen animales con problemas en las extremidades, toros que están bajo una dieta alta en energía, y al momento de realizar las primeras evaluaciones del semen con el sistema CASA, se detectaron parámetros bajos en cuanto a calidad seminal, por lo que se dificulta de manera significativa el congelamiento de semen estos ejemplares.

3.3. Diseño experimental

Los animales se dividieron en dos grupos, estratificados por genotipo, asignándose alternativamente, como fueron llegando al CBR, al grupo tratado con rBST o al grupo control. El tratamiento consistió en la aplicación de 500 mg de rBST adicionada con 1.8 g de acetato de tocoferol (Boostin-S®) vía subcutánea (Figura 8), cada 14 días, durante 60 días. Los animales control recibieron 5 ml de solución estéril de cloruro de sodio al 0.9 % por vía subcutánea.



Figura 8. Fotografía que muestra el momento de la aplicación de la rBST vía subcutánea.

3.4. Muestras de semen

La primera evaluación de semen de cada toro fue realizada tres días posteriores al momento de ingresar al CBR, en el área de cuarentena, como periodo de adaptación. Dicha evaluación se realizó con la ayuda de un electroeyaculador automático (ElectroJac5®, Neogen, Lexington, Kentucky) (Figura 9) que funciona a través de 40 ciclos, cada ciclo con 2 segundos encendido y 2 segundos apagado, aumentando la intensidad (voltaje) conforme aumentan los ciclos, hasta la eyacuación. La frecuencia de colección en este periodo fue cada 15 días. Posteriormente, cuando los toros dejaron el área de cuarentena y pasaron al área de producción, el semen fue obtenido con la ayuda de una vagina artificial (VA). La temperatura interior de la VA fue de 42 °C. Una VA diferente fue utilizada para cada toro durante el estudio. La frecuencia de colección de semen en este periodo fue de dos veces por semana durante 20 días.



Figura 9. Fotografía que muestra el electroeyaculador utilizado durante el estudio.

Después de la colecta, el eyaculado fue mantenido en todo momento a 37 °C por medio de un baño húmedo y la platina temperada del microscopio. Una muestra del eyaculado fue diluida 1:10 con Optidyl (Cryo Vet S.A.S., Francia). De la muestra seminal se determinó: volumen, motilidad progresiva, concentración espermática, células muertas y anormalidades.

Las características del movimiento de los espermatozoides como: velocidad curvilínea, velocidad de la línea recta, linealidad, fueron evaluados con el software (CASA) especializado SpermVision (Minitube®, Tiefenbach, Baviera, Alemania) (Figura 10).

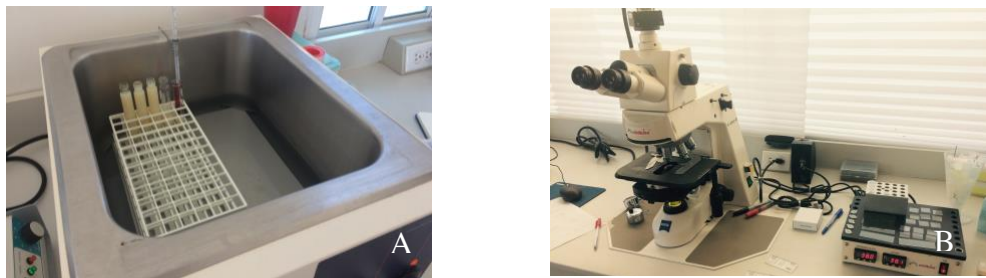


Figura 10. Baño húmedo (A) a 37 °C para mantenimiento del semen y sistema CASA (B).

La determinación de la integridad de la membrana plasmática de las células espermáticas fue realizada mediante la prueba HOST (Hypoosmotic Swelling Test) modificada de la técnica descrita por Tartaglione & Ritta (2004), llamada también test de endósmosis, mediante una solución hipoosmótica (100 mOsm/L) compuesta por citrato de sodio (490 mg) y fructosa (900mg) diluidos en 100 ml de agua destilada. Se mezclaron 10 μ l de semen en 500 μ l de la solución hipoosmótica en tubos Eppendorf de 1.5 ml temperados a 37 °C y se mantuvo en incubación a esta temperatura durante 40 minutos.

Al momento de situar los espermatozoides en presencia de un medio con una presión osmótica más baja que la fisiológica, se produce la entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo. Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. La entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Las células

con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentan cambios en la forma del flagelo.

La lectura se realizó con la ayuda de una cámara de Neubauer en un microscopio de contraste de fase con objetivo de 40X (Figura 11). Se observaron 200 espermatozoides en un mínimo de 10 campos microscópicos, donde aquellas células con la membrana citoplasmática intacta mostrarán una deformación de la cola por efecto de la hinchazón.



Figura 11. Lectura de la prueba HOST en cámara de Neubauer con microscopio de contraste de fases.

Se tomaron ciertos criterios de calidad establecidos por el CBR-UGRNL para tomar la decisión de continuar con el procesamiento de las muestras de semen y congelarlas o desecharlas. Estos criterios son; la muestra de semen, en su evaluación microscópica, debía de tener una concentración mayor a 300 millones de espermatozoides/ml, un mínimo de 50 % de motilidad progresiva, 20 % o menos de anomalías y menos del 30 % de células muertas.

Una vez que la muestra aprobó los criterios, se realizó una primera dilución 1:1 con Optidyl (Cryo Vet S.A.S., Francia), y se metió a refrigeración en un gabinete frío durante 2 horas hasta que la muestra bajara a 4 – 5 °C. Posteriormente, se realizaron los cálculos para hacer las diluciones correspondientes, para obtener dosis inseminantes con una concentración final de 30 millones de espermatozoides. Una vez transcurridas las dos

primeras horas, se agregó la cantidad total de la segunda dilución, misma que fue dividida en 4 partes iguales, agregando una parte cada 10 minutos. Se esperó un periodo de equilibrio de mínimo 4 horas. En seguida se realizó el llenado de las pajillas con ayuda de una llenadora y selladora semiautomática (SFS 133, Minitube®, Tiefenbach, Baviera, Alemania). Las pajillas se colocaron en racks horizontales y se pasaron a reposar en vapores de nitrógeno, a 10 cm del nivel del nitrógeno, durante 10 horas. Una vez finalizado este paso, se tomó una dosis y fue sumergida en nitrógeno líquido durante 15 minutos. Después de que transcurrió ese tiempo, la dosis fue descongelada y se evaluaron todos los parámetros anteriormente mencionados con ayuda de un software para el análisis del semen asistido por computadora (CASA), Sperm visión (Minitube®, Tiefenbach, Baviera, Alemania).

3.5. Muestras de Sangre

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción de la vena coccígea, cada 15 días, durante 60 días, antes de la evaluación del semen y de la aplicación de la inyección de rBST o solución fisiológica según el caso. Éstas fueron colectadas en tubos BD vacutainer® (Cuautitlán Izcalli, México) con anticoagulante EDTA para obtener plasma y sin anticoagulante para suero, utilizando agujas BD Vacutainer (Precision Glide TM), 21G x 1.5'', y posteriormente hacer la determinación de testosterona e IGF-1. Las muestras de sangre obtenidas fueron centrifugadas a 700g durante 5 minutos (Figura 12). Dichas muestras fueron congeladas a -80 °C hasta su posterior evaluación.



Figura 12. Fotografía que muestra el momento en que fue tomada una muestra de sangre (A) y centrifuga (B).

3.6. Concentración de testosterona en suero sanguíneo

La evaluación de la concentración de testosterona en suero sanguíneo se realizó en el laboratorio de endocrinología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México, utilizando el estuche comercial Serum Testosterone ELISA, Alpcó®, (ALPCO Diagnostics, Salem, NH, USA), que es un inmunoensayo enzimático de unión competitiva para la medición diagnóstica cuantitativa *in vitro* de testosterona en suero sanguíneo. La competencia se produjo entre un antígeno no marcado presente en los estándares, controles y muestras de los toros, y un antígeno marcado con enzima, conjugado, para un número limitado de sitios de unión de anticuerpos en la microplaca.

Todos los reactivos estuvieron a temperatura ambiente de 21 °C antes de su uso. Los calibradores, controles y muestras fueron analizados por duplicado.

El procedimiento de la prueba fue el siguiente:

Cada ejecución incluyó una curva estándar.

Una vez asegurado el número deseado de pocillos de microtitulación en el soporte se realizó lo siguiente:

1. Se prepararon las soluciones de trabajo del conjugado de testosterona-HRP y el tampón de lavado.
2. Posteriormente fueron pipeteados 50 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos debidamente etiquetados en duplicado.
3. Enseguida se pipetearon 100 µl de la solución de trabajo conjugada en cada pocillo con ayuda de una pipeta multicanal.
4. Luego procedimos a la incubación en un agitador de placas, aproximadamente a 200 rpm, durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Los pocillos fueron lavados 3 veces en una lavadora de bandas de microplacas automatizada ELx50, Bio-Tek®, (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA), con 300 µl de tampón de lavado diluido por pocillo en cada ocasión, y

posteriormente la placa fue golpeada firmemente contra papel absorbente para asegurarnos de que estuviera seco.

6. Luego del lavado, fueron pipeteados 150 μ l de sustrato TMB en cada pocillo a intervalos de tiempo.
7. Se incubaron en un agitador de placas durante 15 minutos a temperatura ambiente, hasta que el calibrador A alcanzó un color azul oscuro para obtener la densidad óptica deseada.
8. Posteriormente 50 μ l de solución “Stop” fueron pipeteados en cada pocillo a los mismos intervalos de tiempo que en el paso 6.
9. Dentro de los 20 minutos posteriores a la adición de la solución de parada se leyó la placa en un lector de microplacas a 450 ± 10 nm.

3.7. Concentración de IGF-I en suero sanguíneo

La evaluación de la concentración de IGF-I en suero sanguíneo se realizó en el laboratorio de endocrinología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México, utilizando el estuche comercial DRG® IGF-I 600 ELISA, (DRG International, Inc., USA), un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas en fase sólida (ELISA), basado en el principio de unión competitiva.

Para realizar la cuantificación de IGF-I mediante este procedimiento, todos los reactivos y muestras fueron almacenados a temperatura de 4 °C antes de su uso. Se usaron puntas de pipetas de plástico desechables nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar la contaminación cruzada.

Para la acidificación y neutralización de muestras y estándares se realizó lo siguiente:

1. Fueron pipeteados 50 μ l de muestra, estándar y control, en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml.
2. Posteriormente se agregaron 50 μ l de ácido clorhídrico (HCl) 0.2 N.
3. Luego de mezclarse, la incubación fue durante 30 minutos.

4. Para la neutralización, 10 µl de solución Buffer de neutralización fueron agregados a todos los tubos y se mezcló la solución. La revisión y corrección del pH no fue necesario.
5. Luego de 10 minutos de realizar el paso 4 se realizó el procedimiento del ensayo.

Procedimiento de ensayo

Cada ejecución incluyó una curva estándar.

Una vez asegurados de la cantidad deseada de pocillos de microtitulación en el soporte:

1. Fueron dispensados 20 µl de cada estándar, control y muestras, acidificadas y neutralizadas, con puntas desechables nuevas en los pocillos apropiados.
2. Posteriormente se agregaron 100 µl de conjugado enzimático en cada pocillo. Se mezclaron bien por 10 segundos.
3. La mezcla fue incubada durante 120 minutos a temperatura ambiente.
4. Transcurrido el tiempo, el contenido de los pozos se sacudió rápidamente.

Se enjuagaron los pocillos 3 veces con solución de lavado diluida con 400 µl por pocillo.

Los pozos fueron golpeados con fuerza sobre papel absorbente para eliminar las gotas residuales.

5. Posteriormente se dispensaron 150 µl de complejo enzimático, Estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano, en cada pocillo.
6. Inmediatamente después fueron incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Transcurrido el tiempo, se sacudió rápidamente el contenido de los pozos. Se enjuagaron los pocillos 3 veces con solución de lavado diluida con 400 µl por pocillo.
8. Posteriormente fueron agregados 100 µl de solución de sustrato, tetrametilbencidina (TMB), a cada pocillo.
9. Luego se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente.
10. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 100 µl de solución de “Stop”, que contiene H₂SO₄ 0.5 M, a cada pocillo.

11. Finalmente, la densidad óptica fue leída a 450 ± 10 nm con un lector de placa de microtitulación dentro de los 10 minutos posteriores a la adición de la solución “Stop”.

3.8. Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados mediante el modelo lineal general usando el método de estimación de máxima verosimilitud restringida (REML).

Para el análisis de los datos del semen fresco en los distintos genotipos se utilizó el modelo siguiente:

$$Y = \mu + T_i + G_j + E$$

donde:

Y = La observación

μ = media general

T = Efecto del i-ésimo tratamiento (tratamiento y control)

G = Efecto del j-ésimo genotipo

E = Efecto del error experimental

Para ver el efecto de rBST en el semen fresco se utilizó el modelo siguiente:

$$Y = \mu + T_i + E$$

donde:

Y = La observación

μ = media general

T = Efecto del i-ésimo tratamiento (tratamiento y control)

E = Efecto del error experimental

Para el análisis de datos de las dosis de semen descongeladas se recalcularon las variables y se obtuvo el porcentaje, posteriormente se utilizó el modelo siguiente:

$$Y = \mu + T_i + G_j + E$$

donde:

Y = La observación

μ = media general

T = Efecto del i-ésimo tratamiento (tratamiento y control)

G = Efecto del j-ésimo genotipo

E = Efecto del error experimental

Para ver el efecto de rBST en las concentraciones de testosterona e IGF-I se utilizó el modelo siguiente:

$$Y = \mu + T_i + E$$

donde:

Y = La observación

μ = media general

T = Efecto del i-ésimo tratamiento (tratamiento y control)

E = Efecto del error experimental

4. RESULTADOS

4.1. Características seminales

Se valoraron 19 toros divididos por genotipo en *Bos taurus* o europeos (n = 6) y cruzados de *Bos taurus* con *Bos indicus* conocidos como sintéticos (n= 13).

Los efectos de la rBST sobre las características seminales en los toros europeos y sintéticos son presentados en el Cuadro 2. El valor de la media para la concentración espermática fue similar (P = 0.710) al comparar los animales tratados contra los controles, en toros europeos y sintéticos. La aplicación de rBST produjo un incremento del 46.81 % (de 32.76 ± 6.59 a 61.60 ± 6.59 %) en la motilidad progresiva en los toros sintéticos en comparación con los animales control (P = 0.001).

Para el porcentaje de células muertas, el valor de la media fue diferente (P = 0.006) entre animales con rBST y controles del genotipo sintético, en donde se muestra una disminución del 35.9 % de células muertas (de 37.22 ± 4.10 a 23.86 ± 4.10 %) para los toros tratados. En contraste, en los toros europeos hay un incremento del 30.92 % de células muertas (de 17.70 ± 4.10 a 25.62 ± 4.10) en los animales tratados con rBST en comparación con los controles.

El porcentaje de anomalías fue similar (P = 0.297) al comparar los toros tratados contra los controles en ambos genotipos.

La aplicación de rBST tuvo un efecto sobre el índice de integridad de la membrana plasmática en la prueba HOST indicado por un aumento del 32 % (de 29.08 ± 5.16 a 42.72 ± 5.16 %) para los animales tratados, en toros sintéticos, en comparación con los controles (P < 0.001). Dentro de los toros europeos se observó una disminución del 23 % en la prueba HOST en los animales tratados con rBST.

Cuadro 2. Efecto de rBST sobre las características seminales en toros europeos y sintéticos

Parámetro	Genotipo				Valor-P
	Europeo		Sintético		
	Control	rBST	Control	rBST	
Concentración ($\times 10^6$)	1136 \pm 249.7	1418 \pm 249.7	902 \pm 249.7	1174 \pm 249.7	0.710
Motilidad Progresiva (%)	69.75 \pm 6.59	62.17 \pm 6.59	32.76 ^b \pm 6.59	61.60 ^a \pm 6.59	0.001
Células Muertas (%)	17.70 ^b \pm 4.10	25.62 ^a \pm 4.10	37.22 ^a \pm 4.10	23.86 ^b \pm 4.10	0.006
Anormalidades (%)	19.15 \pm 6.63	22.49 \pm 6.63	33.48 \pm 6.63	27.66 \pm 6.63	0.297
HOST (%)	59.40 ^a \pm 5.16	45.73 ^b \pm 5.16	29.08 ^b \pm 5.16	42.72 ^a \pm 5.16	<0.001

Las medias dentro de la misma fila con diferentes superíndices difieren significativamente. Valores de la media \pm Error estándar de la diferencia, HOST: Prueba de hinchazón hipoosmótica.

Los datos también fueron analizados para ver el efecto de rBST entre los animales tratados contra los animales control, independientemente del genotipo. Los resultados del efecto de rBST sobre las características del semen se presentan en el Cuadro 3.

La concentración espermática en los toros tratados con la hormona se incrementó en 21.37 % (de 1019 \pm 178.70 a 1296 \pm 178.70; P = 0.029), la concentración con respecto a los toros control.

En cuanto a la motilidad progresiva existe diferencia estadística, hubo un incremento del 17.19 % (P < 0.001) en los toros tratados al compararlos con los toros control.

Las células muertas en los eyaculados de los toros tratados con rBST disminuyeron un 9.91 % en comparación con los controles (de 27.46 \pm 2.93 a 24.74 \pm 2.93 %; P = 0.032). En cuanto al porcentaje de anomalías no se encontraron diferencias significativas (P = 0.394).

Cuadro 3. Características físicas del semen afectadas por el tratamiento de rBST

Parámetro	Control	rBST	Valor-P
Concentración (10 ⁶ /ml)	1019 ^b ± 178.70	1296 ^a ± 178.70	0.029
Motilidad Progresiva (%)	51.25 ^b ± 4.71	61.89 ^a ± 4.71	<0.001
Células Muertas (%)	27.46 ^a ± 2.93	24.74 ^b ± 2.93	0.032
Anormalidades (%)	26.31 ± 4.74	25.08 ± 4.74	0.394

Las medias dentro de la misma fila con diferentes superíndices difieren significativamente.

Valores de la media ± Error estándar de la diferencia

Las dosis del semen que cumplieron con los parámetros de calidad establecidos por el CBR fueron congeladas y posteriormente descongeladas para su evaluación y análisis. Los resultados obtenidos de motilidad progresiva en las dosis de semen descongelado, entre tratamientos y en los distintos genotipos no presentan diferencias estadísticas (P = 0.198).

Para la prueba HOST se encontró una diferencia (P < 0.05) entre los toros tratados con rBST al compararlos con los toros control, en ambos genotipos. En los toros sintéticos, a los que se les aplicó rBST obtuvieron un incremento del 11.37 % en dicha prueba con respecto a los controles. Por el contrario, en los toros europeos, los animales tratados con rBST tuvieron reducción en un 21.16 % del valor HOST respecto a los toros control.

El número de dosis congeladas no fue diferente entre los tratamientos en los dos distintos genotipos (P = 0.330), sin embargo, existe diferencia por genotipo (P = 0.012), ya que los toros europeos obtuvieron un mayor número de dosis congeladas que los sintéticos (121.4 vs 101.3). El efecto de rBST sobre las características seminales después de la descongelación de las dosis de semen en los toros europeos y sintéticos se presentan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Efecto de rBST sobre las características seminales Post-Descongelación en toros europeos y sintéticos

Parámetro	Genotipo				Valor-P
	Europeo		Sintético		
	Control	rBST	Control	rBST	
Motilidad Progresiva (%)	69.58 ± 5.64	73.28 ± 5.64	64.30 ± 5.64	57.67 ± 5.64	0.198
HOST (%)	67.20 ^a ± 7.56	52.98 ^b ± 7.56	60.36 ^a ± 7.56	68.11 ^b ± 7.56	0.047
Nº de Dosis Congeladas	121.8 ± 11.24	121.0 ± 11.24	93.9 ± 11.24	108.7 ± 11.24	0.330

Las medias dentro de la misma fila con diferentes superíndices difieren significativamente al 5%. Valores de la media ± Error estándar de la diferencia. HOST: Prueba de hinchazón hiposmótica.

4.2. Niveles de testosterona e IGF-I

Las concentraciones promedio de testosterona en suero (ng/ml) en los toros tratados con rBST para el día 0, día 14 y día 28 fueron de 2.75 ± 1.84 , 8.98 ± 4.52 y 8.57 ± 2.94 respectivamente, mientras que para los toros control fueron 3.85 ± 1.96 , 3.89 ± 2.23 y 4.53 ± 0.80 respectivamente.

En el día cero ambos grupos, toros tratados con rBST y controles, tuvieron una concentración de testosterona en suero similar ($P > 0.05$) de 2.75 ± 1.84 y 3.85 ± 1.96 ng/ml respectivamente. Para los días 14 y 28 la concentración de testosterona en los toros con rBST fue más alta ($P < 0.05$).

La concentración de testosterona en el día 14 fue de 8.98 ± 4.52 ng/ml para los toros tratados con rBST y de 3.89 ± 2.23 ng/ml para los controles. En el día 28 la concentración de testosterona fue de 8.57 ± 2.94 en los toros tratados y 4.53 ± 0.80 ng/ml en los toros control (Figura 13).

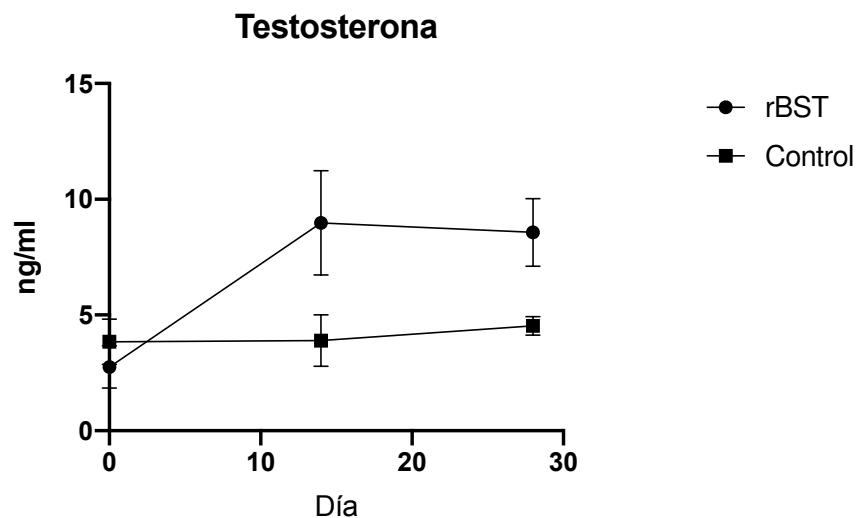


Figura 13. Respuesta de la testosterona en suero a la aplicación de rBST. Se muestran las concentraciones de testosterona en suero para los animales tratados con rBST (círculos) y controles (cuadrados) al día 0 (inicio del tratamiento), 14 y 28. Los toros tratados con rBST obtuvieron concentraciones aumentadas (rBST x Tiempo $P < 0.05$) de testosterona en los días 14 y 28 en comparación con los toros control.

Las concentraciones promedio de IGF-I en suero (ng/ml) en los toros tratados con rBST en el día 0 y 14 fueron de 136.63 ± 20.10 y 338.54 ± 93.80 ng/ml respectivamente. En los toros control fue de 128.29 ± 5.02 y 130.67 ± 6.50 ng/ml para los días 0 y 14 respectivamente.

En el día 0 ambos grupos, tratados y controles, obtuvieron concentraciones de IGF-I similares ($P > 0.05$), 136.63 ± 20.10 y 128.29 ± 5.02 ng/ml respectivamente. En el día 14 la concentración de IGF-I fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en los toros tratados con rBST (338.54 ± 93.80 ng/ml) en comparación con los controles (130.67 ± 6.50 ng/ml) (Figura 14).

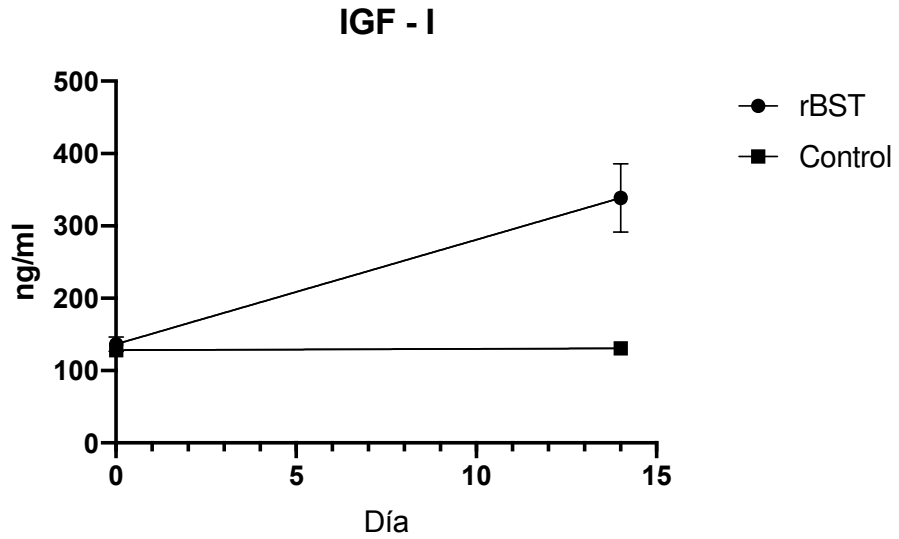


Figura 14. Respuesta de IGF-I en suero a la aplicación de rBST. Se muestran las concentraciones de IGF-I en plasma para los animales tratados con rBST (círculos) y controles (cuadrados) al día 0 (inicio del tratamiento) y 14. Los toros tratados con rBST obtuvieron concentraciones aumentadas (rBST x Tiempo $P < 0.05$) de IGF-I en el día 14 en comparación con los toros control.

5. DISCUSIÓN

Existen diversos estudios en donde se ha utilizado la rBST y se ha demostrado el efecto que tiene sobre el comportamiento sexual, función ovárica en hembras, parámetros del semen, las concentraciones de IGF-1 y testosterona, aplicada en distintos periodos de tiempo (Andrade *et al.*, 1996; Brozos *et al.*, 1999; El-Harairy, 2000; Hafez *et al.*, 2005; Masood *et al.*, 2016). Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones no han sido realizadas comparando distintos genotipos, así como la evaluación del efecto sobre la congelabilidad del semen.

Considerando los resultados publicados sobre el uso de rBST en machos (Sauerwein *et al.*, 2000; El-Harairy, 2000; Hafez *et al.*, 2005; Hernández & Gutiérrez, 2012; Masood *et al.*, 2016) se optó por administrar la somatotropina en los toros que ingresaron al CBR-UGRNL puesto que el mecanismo por el cual la rBST mejora los parámetros de calidad seminal, está relacionado con los efectos directos e indirectos de la somatotropina en los procesos reproductivos y, se vio que la administración sería cada 14 días, por vía subcutánea, durante 60 días. Después de la inyección subcutánea de 500 mg de rBST, los niveles de IGF-I aumentan y se mantienen elevados durante 14 días, de esta manera la repetición de la inyección cada 14 días mantiene los niveles de IGF-I altos y constantes (Jousan *et al.*, 2007).

Se ha registrado que la administración de rBST en toros y búfalos aumenta significativamente el volumen del eyaculado en comparación con los controles, Masood *et al.*, (2016), observaron que el tratamiento con somatotropina aumentó significativamente ($P < 0.05$) el volumen eyaculado (8.8 ± 0.2 vs 7.7 ± 0.2 ml). Hafez *et al.*, (2005) obtuvieron un incremento del 22.5 % (4.0 ± 1.19 vs 3.1 ± 0.77 ml) y Sauerwein *et al.*, (2000) registraron diferencia significativa entre los toros con rBST al compararlos con los controles (6.5 ± 0.3 vs 4.60 ± 0.1 ml). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio fueron inconsistentes, lo cual puede ser atribuible a que se emplearon dos métodos distintos para realizar la colecta de los eyaculados, siendo el método de electroeyaculación en el periodo en el que los animales se encontraban en cuarentena y

posteriormente se utilizó la VA. El método de la electroeyaculación tiende a proporcionar volúmenes de eyaculación más altos que el uso de la VA, debido a la estimulación directa de los órganos genitales accesorios que producen las fracciones no espermáticas de la eyaculación (Chenoweth & Lorton, 2014). Esto contribuye a una concentración de espermatozoides más baja al evaluar una muestra, aunque de acuerdo con Ball *et al.*, (1983) y León *et al.*, (1991 la concentración de espermatozoides totales por eyaculado, la motilidad de los espermatozoides y en general la fertilidad no se ven afectados.

Masood *et al.*, (2016) trabajaron con búfalos de agua Nili Ravi, y reportaron un incremento del 7.13 % de la motilidad progresiva en los animales tratados con rBST con respecto a los controles. Ellos atribuyen dicho efecto al hecho de que, de manera indirecta, la aplicación de la hormona aumenta la producción de IGF-I y a su vez, actúa en las células de Leydig estimulando la producción de testosterona. Los resultados del presente estudio coinciden con lo mencionado por Masood *et al.*, (2016), en cuanto que la aplicación de rBST tuvo efecto positivo al incrementar en 46.81 % la motilidad progresiva en los animales tratados del genotipo sintético, así como el aumento de las concentraciones séricas de testosterona e IGF-I.

Con respecto al porcentaje de células muertas, Masood *et al.*, (2016) indican que el tratamiento con rBST disminuye en 18 % el número de células muertas (19.86 ± 0.35 vs 24.22 ± 0.51 %, tratados y controles respectivamente). Por otro lado, Hafez *et al.*, (2005) reportaron una disminución del 26.21 % de células muertas en los toros tratados con somatotropina (22.8 ± 8.62 con rBST vs 30.9 ± 10.68 % de los toros control). Los resultados obtenidos en este estudio en los toros de genotipo sintético coinciden con lo mencionado por Hafez *et al.*, (2005) y Masood *et al.*, (2016) puesto que se registró una reducción del 35.9 % de células muertas por efecto del tratamiento con la hormona al compararlo con los toros control ($P = 0.006$). En contraste, en los toros europeos se observó un incremento del 30.92 % de células muertas en los animales tratados con rBST.

Los resultados de la prueba de integridad de la membrana plasmática mediante la técnica HOST presentan diferencia estadística ($P < 0.001$) entre los animales tratados con rBST,

dentro de los toros sintéticos, al compararlos con los animales control, al incrementarse un 32 % el número de células con la membrana plasmática íntegra. El efecto encontrado tanto para el porcentaje de células muertas como para la integridad de la membrana en respuesta a la aplicación de rBST se atribuye muy probablemente al efecto de dicha hormona en la función de las células de Leydig (Carani *et al.*, 1999) a través del aumento de la secreción de LH (Chandrashekar & Bartke, 1998 y Sauerwein *et al.*, 2000). El aumento de LH podría causar el incremento observado de la concentración de testosterona en los toros tratados, lo que concuerda con los hallazgos de Sauerwein *et al.*, (2000).

Además de la alteración de la testosterona, la rBST actúa directamente sobre la superficie espermatogénica de los túbulos testiculares o indirectamente elevando la concentración plasmática de IGF-1 (Sauerwein *et al.*, 2000). El estímulo en la producción de IGF-I puede también mejorar consistentemente la acción de la aromatasa en diferentes tipos de células, en los testículos, por ejemplo, en las células de Leydig (Reed *et al.*, 1993; Chabrolle *et al.*, 2009). La aromatasa, que es considerada como un miembro de la superfamilia P450, es una enzima clave de la biosíntesis de estrógenos y cataliza la conversión de andrógenos en estrógeno. Se expresa en las gónadas, la placenta y otros tejidos extraglandulares. Todos estos tejidos extraglandulares son receptores de estrógenos positivos, y se supone que el estrógeno sintetizado *in situ* actúa directamente sobre las células de manera juxtacrina (Shippen *et al.*, 2004; Shozu *et al.*, 2004; Bulun *et al.*, 2005; Santen *et al.*, 2009).

Los resultados de la concentración espermática obtenidos al analizar los datos de los toros tratados con rBST y controles, sin considerar el genotipo, coinciden con los resultados publicados por Masood *et al.*, (2016), quienes trataron búfalos con rBST y la concentración espermática fue mejor ($P < 0.05$) que los animales control, 982.2 y 731.9 $\times 10^6/\text{ml}$ respectivamente, es decir un 25.4 % superiores a los animales control, mientras que para esta investigación el incremento de la concentración espermática entre los toros tratados y los controles fue de un 21.37 %. Esto se podría atribuir a que la rBST tiene efecto sobre el aumento del parénquima testicular, lo que se traduce en un aumento de la producción espermática. Por otro lado, la vía de proteína quinasa activada por mitógenos

(MAPK) es activada por la BST (Kopchick & Andry, 2000), que estimula la proliferación celular, misma que se ve reflejada en el incremento de la concentración de células espermáticas.

Una aportación importante fue evaluar el efecto del tratamiento con rBST sobre las características seminales post-descongelación. Los resultados obtenidos indican que en ambos genotipos, la aplicación de la hormona tuvo efecto ($P < 0.05$) en el índice de integridad de la membrana plasmática mediante la técnica HOST. En los toros sintéticos a los que se les aplicó rBST, se obtuvo un incremento del 11.37 % en dicha prueba con respecto a los controles. Por el contrario, en los toros europeos, los animales tratados con rBST fueron menores a los toros control en un 21.16 %. Estos datos son importantes pues al momento no hay registros de dicha evaluación.

En cuanto a la concentración sérica de IGF-I en el día cero no hubo diferencia ($P > 0.05$) entre los tratamientos, pues ambos grupos se encontraban bajo las mismas condiciones, es decir, aun no recibían la inyección de rBST o el placebo, los animales tratados y controles respectivamente (136.63 ± 20.10 y 128.29 ± 5.02 ng/ml respectivamente). Estos resultados coinciden con los resultados publicados por Ribeiro *et al.*, (2014) quienes indican concentraciones de IGF-I promedio de 59.6 ng/ml al día cero para ambos grupos, las concentraciones de IGF-I permanecieron inalteradas en los controles durante los 31 días de evaluación. Jousan *et al.*, (2007), utilizaron 500 mg de rBST vía subcutánea y registraron las concentraciones de IGF-1 al día 0, 7 y 35, los animales presentan concentraciones similares el día 0 ($P > 0.05$).

En el día 14 la concentración de IGF-1 fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en los toros tratados con rBST en comparación con los controles (338.54 ± 93.80 vs 130.67 ± 6.50 ng/ml, respectivamente). Estos hallazgos son similares con los reportados por Ribeiro *et al.*, (2014) en donde las concentraciones de IGF1 fueron mayores ($P = 0.01$) en los animales tratados con rBST en comparación con las de los controles en los primeros 14 días del estudio y por Jousan *et al.*, (2007) pues las concentraciones de IGF-I aumentaron (rBST x tiempo: $P < 0,001$) aproximadamente 4 veces en los días 7 y 35 después del

tratamiento en el grupo tratado con rBST. Una de las acciones clave de la ST es la estimulación de la expresión hepática del gen IGF-I y su consecuente producción.

Los resultados de las concentraciones de testosterona que se obtuvieron al día 0, no difieren entre los toros tratados con rBST y los controles ($P > 0.05$), con una concentración de testosterona en suero de 2.5 y 3.0 ng/ml. Las concentraciones permanecieron inalteradas en los toros control en los 28 días en que fueron evaluadas las muestras. El hallazgo de las concentraciones de testosterona similares en el día 0 se justifica debido a que en ese momento todos los animales se encontraban en las mismas condiciones, es decir que aún no recibían la primera dosis de rBST los animales tratados.

Las concentraciones de testosterona fueron mayores ($P < 0.05$) en los toros tratados con rBST en comparación con los toros control en los días 14 y 28 (8.98 ± 4.52 vs 3.89 ± 2.23 ng/ml y 8.57 ± 2.94 vs 4.53 ± 0.80 ng/ml, respectivamente). Este resultado concuerda con los publicados por El-Harairy, (2000), quien informó una mayor concentración de testosterona ($P < 0.05$) en el plasma sanguíneo en carneros tratados con rBST en comparación con los carneros no tratados (2.65 vs 2.52 ng/ml). Hafez *et al.*, (2005) reportaron que en toros tratados con rBST detectaron una concentración de testosterona en plasma más alta ($P < 0.05$) que en el grupo control con un promedio de 2.9 ± 2.5 y 1.8 ± 1.3 ng/ml, respectivamente, Dilbar *et al.*, (2014) registraron concentraciones séricas de testosterona (14.02 ± 0.19 vs 12.55 ± 0.44 ng/ml) en animales tratados con rBST en comparación con los controles ($P < 0.05$). Masood *et al.*, (2016) reportaron que la testosterona sérica media fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en los búfalos tratados con rBST en comparación con los controles (4.02 ± 0.21 vs 2.37 ± 0.07 ng/ml, respectivamente).

Probablemente el motivo del aumento en el nivel de testosterona fue que la administración exógena de somatotropina aumentó el número de receptores de la hormona LH en las células de Leydig, lo que aumenta la capacidad de respuesta a la LH. En ese caso, ST provoca que la liberación de LH de las células de Sertoli junto con el aumento de la

capacidad de respuesta de las células de Leydig a la LH, que actúa sobre las células de Leydig para producir testosterona (Hamidi *et al.*, 2011).

6. CONCLUSIONES

El uso de rBST en los centros de procesamiento de semen podría ser una alternativa para mejorar los parámetros productivos del semen fresco ya que se observó un efecto positivo en algunos parámetros de las características del semen fresco.

No fue posible obtener evidencia que soporte el efecto mostrado en el semen fresco, en los parámetros del semen descongelado a excepción de la prueba HOST.

El efecto de la aplicación de la rBST en las características seminales se puede observar de manera clara y positiva cuando se aplica a sementales con parámetros reproductivos aceptables, es decir, que cumplen con los parámetros mínimos establecidos en el CBR.

Se recomienda incrementar el número de animales por grupo en futuros estudios, así como también considerar realizar las evaluaciones del semen de los animales previamente al inicio del tratamiento en un periodo mínimo de un mes, posteriormente iniciar con la aplicación de la hormona y, una vez finalizado el experimento, continuar con las evaluaciones por lo menos un mes y medio más, con ello se tendrán resultados que ayuden a analizar y evaluar de manera más clara un posible efecto positivo en las características seminales por parte de la rBST.

7. LITERATURA CITADA

- Andrade LP, Rhind SM, Wright IA, Mcmillen SR, Goddard PJ and Bramley TA. 1996. Effects of bovine somatotrophin (bST) on ovarian function in post-partum beef cows. *Reproduction Fertility and Development*. 8:951–960.
- Amann RP, Wise ME, Glass JD and Nett TM. 1986. Prepubertal changes in the hypothalamic-pituitary axis of Holstein bulls. *Biology of Reproduction*. 34:71–80.
- Aravindakshan JP, Honaramooz A, Bartlewski PM, Beard AP, Pierson RA and Rawlings NC. 2000. Pattern of gonadotropin secretion and ultrasonographic evaluation of developmental changes in the testis of early and late maturing bull calves *Theriogenology*. 54:339–354.
- Bagu ET, Cook S, Gratton CL and Rawlings NC. 2006. Postnatal changes in testicular gonadotropin receptors, serum gonadotropin, and testosterone concentrations and functional development of the testes in bulls. *Reproduction*. 132:403–411.
- Bagu ET, Gordon JR and Rawlings NC. 2010a. Postnatal changes in testicular concentrations of interleukin-1 alpha and beta and interleukin-6 during sexual maturation in bulls. *Reproduction in Domestic Animals*. 45:336–341.
- Bagu ET, Gordon JR and Rawlings NC. 2010b Postnatal changes in testicular concentrations of transforming growth factors-alpha and-beta 1, 2 and 3 and serum concentrations of insulin like growth factor I in bulls. *Reproduction in Domestic Animals*. 45:348–353.
- Ball L, Ott RS, Mortimer RG and Simons JC. 1983. Manual for breeding soundness examination of bulls. *Journal of the Society for Theriogenology*. 12:1–65.
- Ballerini MG and Ropelato MG. 2008. El receptor de la hormona de crecimiento humana (hGH) y la proteína de transporte de alta afinidad de la hGH. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*. 45:28–46.
- Barkay J, Zuckerman H, Sklan D and Gordon S. 1997. Effect of caffeine on increasing the motility of frozen human sperm. *Fertility and Sterility*. 28:175–177.
- Bartke A, Naar EM, Johnson L, May MR, Cecim M, Yun JS and Wagner TE. 1992. Effects of expression of human or bovine growth hormone genes on sperm

- production and male reproductive performance in four lines of transgenic mice. *Journal of Reproduction and Fertility*. 95:109–118.
- Breier BH, Vickers MH, Gravance CG and Casey PJ. 1996. Growth hormone (GH) therapy markedly increases the motility of spermatozoa and the concentration of insulin-like growth factor-I in seminal vesicle fluid in the male GH-deficient dwarf rat. *Endocrinology*. 137:4061–4064.
- Breton MH, Rochereau-Roulet S, Pinel G, Cesbron N and Le Bizec B. 2009. Elimination kinetic of recombinant somatotrophin in bovine. *Anal. Chim. Acta*. 637:121–127.
- Brito LF, Silva AE, Rodríguez LH, Vieira FV, Deragon LAG and Kastelic JP. 2002. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. *Animal Reproduction Science*. 70:181–190.
- Brito LF, Silva AE, Barbosa RT and Kastelic JP. 2004. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. *Theriogenology*. 61:511–528.
- Brito LF, Barth AD, Rawlings NC, Wilde RE, Crews DH Jr, Mir PS and Kastelic JP. 2007a. Circulating metabolic hormones during the peripubertal period and their association with testicular development in bulls. *Reproduction in Domestic Animals*. 42:502–508.
- Brito LF, Barth AD, Rawlings NC, Wilde RE, Crews DH Jr, Boisclair YR, Ehrhardt RA and Kastelic JP. 2007b. Effect of feed restriction during calthood on serum concentrations of metabolic hormones, gonadotropins, testosterone, and on sexual development in bulls. *Reproduction*. 134:171–181.
- Brito LF, Barth AD, Rawlings NC, Wilde RE, Crews DH Jr, Mir PS and Kastelic JP. 2007c. Effect of improved nutrition during calthood on serum metabolic hormones, gonadotropins, and testosterone concentrations, and on testicular development in bulls. *Domestic Animal Endocrinology*. 33:460–469.
- Brito LF, Barth AD, Rawlings NC, Wilde RE, Crews DH Jr, Mir PS and Kastelic JP (2007d) Effect of nutrition during calthood and peripubertal period on serum

- metabolic hormones, gonadotropins and testosterone concentrations, and on sexual development in bulls *Domestic Animal Endocrinology*. 33:1–18.
- Brozos CN, Saratsis PH, Boscós C, Kyriakis SC and Alexopoulos C. 1999. The effect of bovine somatotropin (bST) administration on reproduction, progesterone concentration during lactation and LH secretion during estrus, in dairy ewes. *Animal Reproduction Science*. 56:177–187.
- Bulun SE, Imir G, Utsunomiya H, Thung S, Gurates B, Tamura M and Lin Z. 2005. Aromatase in endometriosis and uterine leiomyomata. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 95:57 – 62.
- Cailleau J, Vermeire S and Verhoeven G. 1990. Independent control of the production of insulin-like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 69:79–89.
- Carani C, Granata ARM, De Rosa M, Garau C, Zarrilli S, Paesano L, Colao A, Marrama P and Lombardi G. 1999. The effect of chronic treatment with GH on gonadal function in men with isolated GH deficiency. *European Journal of Endocrinology* 140:224–230.
- Cartwright TC. 1980. Prognosis of zebu cattle: research and application. *Journal of Animal Science* 50:1221–1226.
- Carvalho FA, Lammoglia MAL, Simoes MJ and Randel RD. 1995. Breed affects thermoregulation and epithelial morphology in imported and native cattle subjected to heat stress. *Journal of Animal Science* 73:3570–3573.
- Cells T, Kanzaki M and Morris PL. 1998. Primary Rat Leydig Cells and MA-10 Mouse Leydig. *Fertility and Sterility*. 139:1872–1882.
- Chabrolle C, Tosca L, Ramé C, Lecomte P, Royère D and Dupont J. 2009. Adiponectin increases insulin-like growth factor I-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. *Fertility and Sterility*. 92:1988–1996.
- Chacón J, Aranda D and Pérez E. 2000. Scrotal circumference in grass-fed bulls extensively reared in Costa Rica. In *Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction, Stockholm*. 1: p.105.
- Chacón J. 2009. Manejo reproductivo y diagnóstico andrológico del toro en ganaderías extensivas del trópico centroamericano [Breeding management and andrological

- diagnosis in bulls extensively reared in tropical Central America] In *Memorias de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA)*, Volume XVII, Suplemento 1, San Juan, Puerto Rico, 17–24 October 2009 pp 14–29.
- Chandrashekar V and Bartke A. 1998. The role of growth hormone in the control of gonadotropin secretion in adult male rats. *Endocrinology*. 139:1067–74.
- Chandrashekar V, Zaczek D and Bartke A. 2004. The consequences of altered somatotrophic system on reproduction. *Biology of Reproduction*. 71:17–27.
- Chenoewth PJ and Lorton SP. 2014. In: *Animal andrology: Theories and applications* Chenoewth PJ and Lorton SP (eds). CAB International: Boston, MA, USA. pp 297–351.
- Closset J, Gothot A, Sente B, Scippo ML, Igout A, Vandebroek M, Dombrowicz D, Hennen G. 1989. Pituitary hormones dependent expression of insulin-like growth factors I and II in the immature hypophysectomized rat testis. *Molecular Endocrinology*. 3:1125–1131.
- Colon JM, Ginsburg F, Lessing JB, Schoenfeld C, Goldsmith LT and Amelar RD. 1986. The effect of relaxin and prostaglandin E2 on the motility of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 46:1133–1139.
- Curtis SK and Amann RP. 1981. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. *Journal of Animal Science*. 53:1645–1657.
- Deaver DR and Bryan KA. 1999. Effects of exogenous somatotropin (ST) on gonadal function in ruminants and swine. *Domestic Animal Endocrinology* 17:287–297.
- Dilbar GH, Ahmad N, Ahmad M, Ahmad I, Waqas MS and Younis M. 2014. Effects of bovine somatotropin on libido, serum testosterone, hematology and certain biochemical metabolites of Sahiwal bulls. *Pakistan Journal of Agriculture Science*. 51:501–506.
- Donahue CP, Kosik KS and Shors TJ. 2006. Growth hormone is produced within the hippocampus where it responds to age, sex, and stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:6031–6036.
- Dostalova P, Zatecka E and Dvorakova-Hortova K. 2017. Of Oestrogens and Sperm: A Review of the Roles of Oestrogens and Oestrogen Receptors in Male Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(5), 904.

- Dunn TG and Moss GE. 1992. Effects of nutrient deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. *Journal of Animal Science* 70:1580–1593.
- El-Harairy MA. 2000. Ram reproductive performance in response to treatment with somatotropin. *Journal of Agricultural Science, Mansoura University*. 25 (7):3987–3994.
- Finch VA. 1986. Body temperature in beef cattle: its control and relevance to production in the tropics. *Journal of Animal Science* 62:531–542.
- García AR. 2004. Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozoides de toros Simental (*Bos taurus*). M. Sc. thesis, Universidade de São Paulo, 258 pp.
- Gomez JM. 1998. Growth hormone receptors in testis and liver during the spermatogenic cycle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology of Reproduction*. 58:483–491.
- Gomez JM, Weil C, Ollitrault M, Le Bail PY, Breton B and Le Gac F. 1999. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*. 113:413–428.
- Gravance CG, Breier BH, Vickers MH and Casey PJ. 1997. Impaired sperm characteristics in postpubertal growth-hormone-deficient dwarf (*dw/dw*) rats. *Animal Reproduction Science*. 49:71–76.
- Hafez YM, Fawzy SA, El-Henawy MA and Barkawi HA. 2005. Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on semen physical characteristics and some biochemical constituents in seminal plasma of Friesian bulls. *Egyptian Journal of Animal Production*. 42(2):87–94.
- Hamidi A, Mamoei M, Mirzadeh K, Tabatabaei S and Roshanfekar HA. 2011. Correlation between blood growth hormone profile and reproduction performance in Arabic rams. *Comparative Clinical Pathology*. 21:819–823.
- Haverfield JT, Ham S, Brown KA, Simpson ER and Meachem SJ. 2011. Teasing out the role of aromatase in the healthy and diseased testis. *Spermatogenesis*. 1:240–249.

- Hull KL and Harvey S. 2000. Growth hormone: a reproductive endocrine-paracrine regulator. *Reviews of Reproduction*. 5:175–182.
- Jousan FD, de Castro e Paula LA, Block J and Hansen PJ. 2007. Fertility of Lactating Dairy Cows Administered Recombinant Bovine Somatotropin During Heat Stress. *Journal of Dairy Science*. 90:341–351.
- Kanzaki M, Morris PL. 1999. Growth hormone regulates steroidogenic acute regulatory protein expression and steroidogenesis in Leydig cell progenitors. *Endocrinology*. 140:1681–6.
- Kopchick JJ, Andry JM. 2000. Growth Hormone (GH), GH Receptor, and Signal Transduction. *Molecular Genetics and Metabolism*. 71:293–314.
- Laron Z, Klinger B. 1998. Effect of insulin-like growth factor-I treatment on serum androgens and testicular and penile size in males with Laron syndrome (primary growth hormone resistance). *European Journal of Endocrinology*. 138:176–180.
- Lee CY, Hunt DW, Gray SL and Henricks DM. 1991. Secretory patterns of growth hormone and insulinlike growth factor-I during peripubertal period in intact and castrate male cattle *Domestic Animal*. *Endocrinology*. 8:481–489.
- León H, Porrás AA, Galina CS and Navarro-Fierro R. 1991. Effect of the collection method on semen characteristics of zebu and European type cattle in the tropics *Theriogenology*. 36:349–355.
- Lobie PE, Breipohl W, Aragón JG and Waters MJ. 1990. Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems. *Endocrinology*. 126:2214–21.
- Lunstra DD and Cundiff LV. 2003. Growth and pubertal development in Brahman-, Boran-, Tuli-, Belgian Blue-, Hereford- and Angus-sired F1 bulls. *Journal of Animal Science*. 81:1414–1426.
- McCarthy MS, Hafs HD and Convey EM. 1979b. Serum hormone patterns associated with growth and sexual development in bulls. *Journal of Animal Science*. 49:1012–1020.
- Matsumoto AM, Snyder PJ, Bhasin S, Martin K, Weber T and Winters S. 2009. Stimulation of spermatogenesis with recombinant human follicle-stimulating

- hormone (follitropin alfa; GONAL-f): long-term treatment in azoospermic men with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertility and Sterility*. 92:979–990.
- Miao ZR, Lin TK, Bongso TA, Zhou X, Cohen P and Lee KO. 1998. Effect of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins on in vitro sperm motility. *Clin. Endocrinology. (Oxf)*. 49:235–239.
- Navarro L, Alpízar E and Chacón J. 2008. Conception rate in extensively managed beef cattle herds bred by bulls with different andrological status in the south area of tropical Costa Rica. *Reproduction in Domestic Animals* 43:166.
- Nyberg F. 2000. Growth Hormone in the Brain: Characteristics of Specific Brain Targets for the Hormone and Their Functional Significance. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 21:330–348.
- Rawlings NC and Evans AC. 1995. Androgen negative feedback during the early rise in LH secretion in bull calves. *Journal of Endocrinology*. 145:243–249.
- Reed MJ, Topping L, Coldham NG, Purohit A, Ghilchik MW and James VH. 1993. Control of aromatase activity in breast cancer cells: the role of cytokines and growth factors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 44:589–596.
- Reiter E, Hennuy B, Bruyninx M, Cornet A, Klug M, McNamara M, Closset J and Hennen G. 1999. Effects of pituitary hormones on the prostate. *The Prostate*. 38:159–165.
- Rekwot PI, Oyedipe EO and Ehoche OW. 1994. The effects of feed restriction and realimentation on the growth and reproductive function of Bokoloji bulls. *Theriogenology* 42:287–295.
- Rodriguez RE and Wise ME. 1989. Ontogeny of pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone in the bull calf during infantile and pubertal development. *Endocrinology*. 124:248–256.
- Rodriguez RE and Wise ME. 1991. Advancement of postnatal pulsatile luteinizing hormone secretion in the bull calf by pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone during infantile development. *Biology of Reproduction*. 44:432–439.

- Santen RJ, Brodie H, Simpson ER, Siiteri PK and Brodie A. 2009. History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target. *Endocrine Reviews*. 30:343–375.
- Sauerwein H, Breier BH, Gallage BW, Gotz C, Kufner G, Montag T, Vickers M and Challenberger ES. 2000. Growth hormone treatment of breeding bulls used for artificial insemination improves fertilization rates. *Domestic Animal Endocrinology*. 18:1,145–158.
- Sharpe RM and Skakkebaek NE. 1993. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?. *The Lancet*. 341:1392–1395.
- Shippen ER and West Jr WJ. 2004. Successful treatment of severe endometriosis in two premenopausal women with an aromatase inhibitor. *Fertil Steril*. 81:1395–1398.
- Shozu M, Murakami K and Inoue M. 2004. Aromatase and leiomyoma of the uterus. *Seminars in Reproductive Medicine*. 22:51–60.
- Silva-Mena C. 1997. Peripubertal traits of Brahman bulls in Yucatán. *Theriogenology* 48:675–685.
- Sinowatz F and Amselgruber W. 1986. Postnatal development of bovine Sertoli cells. *Anatomy and Embryology*. 174:413–423.
- Sirianni R, Chimento A, Ruggiero C, De Luca A, Lappano R, Ando S, Maggiolini M and Pezzi V. 2008. The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17 β -estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line. *Endocrinology*. 149:5043–5051.
- Spiteri-Grech J and Nieschlag E. 1992. The role of growth hormone and insulin-like growth factor I in the regulation of male reproductive function. *Hormone Research*. 38:22–27.
- Tabares FP, Jaramillo JVB and Ruiz-Cortés ZT. 2014. Pharmacological Overview of Galactogogues. *Veterinary Medicine International*.
- Tartaglione CM and Ritta MN. 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 62: 1245–1252.

- Trocóniz JF, Beltrán J, Bastidas H, Larreal H and Bastidas P. 1991. Testicular development, body weight changes, puberty and semen traits of growing Guzerat and Nellore bulls. *Theriogenology* 35:815–827.
- Turner JW. 1980. Genetic and biological aspects of zebu adaptability. *Journal of Animal Science* 50:1201–1205.
- Vale Filho VR, Andrade V, Bergmann J, Reis S, Mendonça R and Mourão G. 1996. Breeding soundness evaluation (BSE-Z) of prospective young Nellore bulls (zebu) supplemented with pasture. In *Proceedings of the 13th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Sydney, Australia Volume II* pp 6–9.
- Wolf FR, Almquist JO and Hale EB. 1965. Pubertal behaviour and pubertal characteristics of beef bulls on a high nutrition allowance. *Journal of Animal Science* 24:761–765.
- Wrobel KH, Dostal S and Schimmel M. 1988. Postnatal development of the tubular lamina propria and the intertubular tissue in the bovine testis. *Cell and Tissue Research*. 252:639–653.
- Wrobel KH. 1990. The postnatal development of the bovine Leydig cell population. *Reproduction in Domestic Animals*. 25:51–60.
- Wrobel KH. 2000. Prespermatogenesis and spermatogoniogenesis in the bovine testis. *Anatomy and Embryology*. 202:209–222.
- Zhang B, Shozu M, Okada M, Ishikawa H, Kasai T, Murakami K, Nomura K, Harada N and Inoue M. 2010. Insulin-like growth factor I enhances the expression of aromatase P450 by inhibiting autophagy. *Endocrinology*. 151:4949–4958.