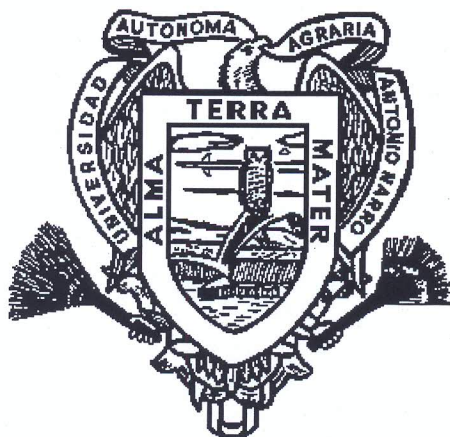


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**Los machos cabríos sexualmente activos estimulan las neuronas del núcleo
arcuato y del área preóptica en cabras anéstricas**

POR

ERICK ALEJANDRO CORTÉS RUIZ

**TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA

JUNIO DE 2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

**Los machos cabríos sexualmente activos estimulan las neuronas del núcleo
arcuato y del área preóptica en cabras anéstricas**

POR

ERICK ALEJANDRO CORTÉS RUIZ

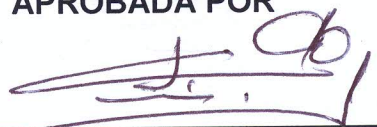
TESIS

**QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

PRESIDENTE:



DR. JOSÉ ALBERTO DELGADILLO SÁNCHEZ

VOCAL:



DRA. MARIE BEDOS

VOCAL:

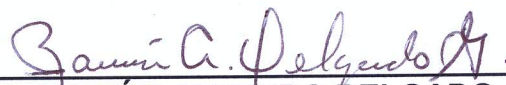


DR. JOSÉ ALFREDO FLORES CABRERA

VOCAL SUPLENTE:



DR. GERARDO DUARTE MORENO



MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



TORREÓN, COAHUILA

JUNIO DE 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Los machos cabríos sexualmente activos estimulan las neuronas del núcleo
arcuato y del área preóptica en cabras anéstricas

POR

ERICK ALEJANDRO CORTÉS RUIZ

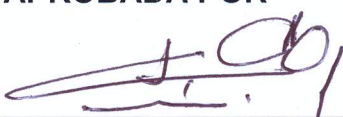
TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

ASESOR PRINCIPAL:


DR. JOSÉ ALBERTO DELGADILLO SÁNCHEZ

ASESOR:


DRA. MARIE BEDOS

ASESOR:


DR. JOSÉ ALFREDO FLORES CABRERA

ASESOR:


DR. GERARDO DUARTE MORENO


MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA

JUNIO DE 2015

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por brindarme oportunidades para realizar una nueva vida y haberme proporcionado la fortaleza necesaria para poder levantarme de aquellos momentos agobiantes para poder llegar hasta donde hoy estoy.

A mi abuela **Pánfila Ruiz Martínez** que en paz descanse que más que abuela fue una madre por haberme brindado todo el cariño necesario y darme la confianza en mi mismo de poder lograr cualquier cosa que me propusiera.

A mi **madre Janeth Cortés Ruiz** por todo el esfuerzo que realizó para poder brindarme los estudios junto con mi padre **Enner Cortés Ruiz**; asimismo por haberme dado los consejos necesarios y la educación precisa para poder aplicarla en mi vida diaria.

A mis tíos **Héctor Cortés Ruiz** y **Edith Cortés Ruiz** por su apoyo incondicional, y proporcionarme los consejos de no desistir a pesar de las malas circunstancias que se presentan en la vida, luchar por mis sueños y cumplirlos. A mi tía **María Luz Gutiérrez Ulloa** por el cariño que me brindó, y de igual forma, su apoyo incondicional. A todos mis familiares por demostrarme su cariño y enseñarme a comprender el valor de la solidaridad.

A mis amigos universitarios que fueron como una familia en el transcurso de la carrera de M.V.Z, al demostrarme su apoyo en los malos y buenos momentos. A mi amigo **Ignacio Idabel Mejía Martínez e Irvin Francisco Segura Rincón**, que más que amigos son mis hermanos con quienes he pasado buenos momentos; además me apoyaron en muchas ocasiones.

Al Dr. **José Alberto Delgadillo Sánchez**, mi agradecimiento por haberme dado la oportunidad de poder realizar esta tesis al brindarme su asesoría.

A la Dra. **Marie Bedos, Dr. José Alfredo Flores Cabrera y Dr. Gerardo Duarte** mi agradecimiento por brindarme su apoyo y paciencia en la asesoría de la realización de esta tesis, ya que sin su ayuda no hubiera sido posible esto.

A la **UAAAN** por haberme brindado el espacio y las enseñanzas necesarias para ejercer mi carrera como tal.

Se agradece al **CONACyT** y a la “**Agence Nationale de la Recherche**” por el apoyo proporcionado para la realización del trabajo de la presente tesis (Proyecto 159884: “El efecto macho en ungulados: reproducción aplicada y mecanismos neuroendocrinos/ANR Blanche Internationale France-Mexique” 11-ISV7-001–01).

DEDICATORIA

A DIOS

Por haberme permitido a la realización de esta meta.

A MIS PADRES

Pánfila Ruiz Martínez, Janeth Cortés Ruiz

y

Enner Cortés Ruiz

Por ser mis pilares de vida, por haberme dado la formación personal que me conllevó a terminar mis estudios con satisfacción, y por ser sus orgullo. Estos es para ustedes.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar si en las cabras anovulatorias expuestas a los machos foto-estimulados existe una mayor activación de neuronas en el área preóptica medial (APOM) y el núcleo arcuato (ARC) que en aquellas expuestas a machos no foto-estimulados, sexualmente inactivos. Se utilizaron 4 machos cabríos locales adultos de la Comarca Lagunera los cuales se dividieron en 2 grupos (n=2 cada uno). Un grupo se sometió a las variaciones naturales del fotoperiodo (machos sexualmente inactivos). El otro grupo fue sometido a 2.5 meses de días largos artificiales (16 h de luz/día), a partir del 1 de noviembre (machos foto-estimulados, sexualmente activos). Se utilizaron, además, 21 cabras locales, multíparas, y anovulatorias. Las hembras se dividieron en 3 grupos (n=7 cada uno) según su condición corporal y se alojaron en 3 corrales diferentes: i) un grupo de hembras se aisló de los machos; ii) otro grupo de hembras se expuso a los machos sexualmente inactivos; iii) el tercer grupo de hembras se expuso a los machos sexualmente activos. Se determinó el comportamiento sexual de los machos durante 20 minutos a partir de su introducción con las hembras. Después de 2 h de exposición a los machos, las hembras se sacrificaron por decapitación y las hembras que quedaron aisladas de los machos se sacrificaron a la misma hora del día que aquellas expuestas a los machos. Las cabezas de las hembras se perfundieron por ambas arterias carótidas y se extrajo el cerebro del cráneo y se cortó en

bloques. De estos bloques se hicieron cortes de la región hipotalámica que contenía el ARC y el APOM. Posteriormente, se determinó el número de células con c-Fos o kisspeptina dentro de las secciones anterior y medial del núcleo arcuato contando el número de núcleos o cuerpos celulares inmunoreactivos a c-Fos y kisspeptina mediante inmunohistoquímica.

El comportamiento sexual mostrado por los machos sexualmente activos fue mayor al mostrado por los machos sexualmente inactivos en todas las variables del comportamiento que fueron registradas. Además, la densidad de células positivas para c-Fos aumentó gradualmente según el tipo de estímulo que recibieron las hembras. En efecto, las hembras aisladas de los machos mostraron el nivel de expresión más bajo, mientras las hembras que se expusieron a los machos sexualmente activos expresaron el nivel más alto de células positivas a c-Fos ($P < 0.0001$). Las hembras expuestas a machos sexualmente inactivos expresaron un nivel intermedio de c-Fos entre los otros dos grupos ($P = 0.18$: machos inactivos vs aisladas de los machos; $P < 0.0001$: machos inactivos vs machos activos). La densidad de células positivas para la kisspeptina y el porcentaje de células que co-expresaron c-Fos y kisspeptina no difirió entre los grupos ($P > 0.05$). En el APOM, los machos sexualmente activos estimularon un mayor número de neuronas que los machos sexualmente inactivos. En efecto, las hembras que se expusieron a los machos sexualmente activos mostraron una expresión de c-Fos más alta que en las aisladas de los machos ($P < 0.01$), y esta expresión tendió a ser más alta también que en las hembras que se

expusieron a los machos sexualmente inactivos ($P=0.08$). No hubo diferencia en la densidad de células activadas entre las hembras aisladas de los machos y las expuestas a machos sexualmente inactivos ($P=0.43$). Los resultados del presente estudio demuestran que los machos cabríos que despliegan un intenso comportamiento sexual estimulan las neuronas del área preóptica y el núcleo arcuato de las cabras en anestro, dos regiones claves del hipotálamo involucradas en el control del funcionamiento del eje gonadotrópico.

Palabras clave: Caprinos, Tratamiento fotoperiódico, Kisspeptina, c-Fos, Comportamiento sexual

Índice de contenido

Página

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA	iii
RESUMEN	iv
Índice de contenido	vii
Índice de tablas	ix
Índice de figuras.....	x
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II REVISIÓN DE LITERATURA	3
II.1 Estacionalidad reproductiva de ovinos y caprinos.....	3
II.2 Uso del fotoperiodo para inducir la actividad sexual en los machos	7
II.3 Bioestimulación sexual	9
II.3.1 Efecto macho.....	9
II.3.1.1 Respuesta de las hembras al efecto macho	10
II.4 Regulación del eje reproductivo neuroendocrino por las kisspeptinas.....	12
CAPÍTULO III OBJETIVO E HIPÓTESIS.....	15
CAPÍTULO IV MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
IV.1 Localización del estudio.....	16
IV.2 Animales experimentales.....	16
IV.2.1 Machos.....	16
IV.2.2 Hembras.....	17
IV.3 Efecto macho	18
IV.4 Sacrificio, perfusión y preparación de los cortes histológicos del APOM y ARC	19
IV.5 Inmunohistoquímica.....	20
IV.6 Análisis de las imágenes y conteo.....	22
IV.7 Variables determinadas	23

IV.7.1 Hembras.....	23
IV.7.2 Machos.....	24
IV.8 Análisis estadísticos.....	24
CAPÍTULO V RESULTADOS.....	25
V.1 Activación de las neuronas a kisspeptina en el ARC.....	25
V.2 Activación de las neuronas en el APOM.....	28
V.3 Comportamiento sexual de los machos.....	30
CAPÍTULO VI DISCUSIÓN.....	31
CAPÍTULO VII CONCLUSIÓN	34
CAPÍTULO VIII LITERATURA CITADA	35

Índice de tablas

Página

Tabla 1. Condición corporal (promedio $\pm$ EEM) de las hembras de los 3 grupos experimentales utilizados en el presente estudio.	19
---	-----------

Índice de figuras

Página

Figura 1: Representación esquemática de la respuesta al efecto macho de cabras anovulatorias.	11
Figura 2. Densidad de células inmunomarcadas con c-Fos (A) o kisspeptina (B) y porcentaje de células a kisspeptina que co-expresaron c-Fos (C) en el ARC de hembras caprinas aisladas de machos, expuestas a machos sexualmente inactivos o expuestas a machos sexualmente activos.	26
Figura 3. (A) Localización anatómica y puntos de referencia usados en el núcleo arcuato (ARC). Las imágenes ilustran las células a kisspeptina co-marcadas con c-Fos (B); la cantidad de marcaje c-Fos (rojo) y kisspeptina (verde) en el ARC de hembras aisladas (C); hembras expuestas a machos sexualmente inactivos (D) o hembras expuestas a machos sexualmente activos (E).	27
Figura 4. (A) Densidad de células inmunomarcadas con c-Fos en el área preóptica (APOM) de hembras caprinas aisladas de machos, expuestas a machos sexualmente inactivos o expuestas a machos sexualmente activos. (B) Localización anatómica y puntos de referencia usados en el APOM. Las imágenes ilustran la cantidad de marcaje c-Fos en las hembras aisladas de los machos (C), hembras expuestas a machos sexualmente inactivos (D) o hembras expuestas a machos sexualmente activos (E).	29
Figura 5. Número de conductas del comportamiento sexual (Promedio $\pm$ EEM) de los machos cabríos sexualmente inactivos y activos. Los machos sexualmente inactivos permanecieron bajo el fotoperiodo natural de la Comarca Lagunera (n=2). Los machos sexualmente activos se sometieron a días largos artificiales (16 h de luz por día) del 1 de noviembre al 15 de enero (n=2) para estimular su actividad sexual.	30

Desde el punto de vista productivo, los caprinos son una especie muy importante para el hombre, ya que estos animales son capaces de producir leche y carne en los diferentes ecosistemas del mundo, incluso en aquellas regiones áridas y semiáridas donde la agricultura es muy escasa o limitada. En México, la mayor población de caprinos se encuentra en las regiones semidesérticas de Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Puebla y Oaxaca. Además de la escasa vegetación para la producción caprina, los productores de cabras de estas regiones tienen que lidiar con la estacionalidad en la actividad reproductiva que presentan la mayoría de las razas caprinas (Valencia *et al.*, 1990; Delgadillo *et al.*, 1999; Duarte *et al.*, 2010). Por ejemplo, en la Comarca Lagunera (26° Norte), una de las principales regiones productoras de caprinos en el país, las hembras caprinas locales presentan un periodo de inactividad sexual de marzo a agosto (Duarte *et al.*, 2010). En los machos cabríos, la libido, el peso testicular y la secreción de testosterona, disminuyen de enero-abril (periodo de reposo sexual), mientras que estas variables se incrementan notablemente de mayo-diciembre (periodo de actividad sexual; Delgadillo *et al.*, 1999). Durante muchos años se ha tratado de contrarrestar los problemas causados por la estacionalidad reproductiva y para ello se han desarrollado diversos tratamientos. Algunos de ellos incluyen la manipulación del número de horas luz que los animales perciben diariamente. Por ejemplo, se ha logrado inducir la actividad sexual de los machos durante el periodo de

reposo sexual al exponerlos en el otoño e invierno (días cortos naturales) a 16 horas de luz por día (días largos artificiales) durante dos meses y medio (Delgadillo *et al.*, 2002). Gracias a este tratamiento, los machos manifiestan intensa actividad sexual durante el periodo de reposo natural, es decir, en marzo-abril. Los machos foto-estimulados son muy eficientes para estimular la actividad sexual (estro y ovulación: Flores *et al.*, 2000; Delgadillo *et al.*, 2002) y endocrina (LH y FSH; Vielma *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2011) de las cabras anéstricas mediante un fenómeno conocido como efecto macho (Flores *et al.*, 2000; Delgadillo *et al.*, 2002; Bedos *et al.*, 2010). Recientemente con el desarrollo de nuevas técnicas se ha demostrado en ovejas y cabras que la introducción de un macho en el grupo de hembras anéstricas induce la activación de las neuronas que secretan GnRH en el área preóptica media (APOM) y las que secretan kisspeptina en el núcleo arcuato (ARC). Sin embargo, no se conoce si la activación de estas neuronas es diferente cuando las cabras son expuestas a machos foto-estimulados, sexualmente activos, o a unos no tratados, sexualmente inactivos.

II.1 Estacionalidad reproductiva de ovinos y caprinos

Los ciclos reproductivos en los animales obedecen a situaciones que, al ser interpretadas, determinan la conveniencia o no de su presentación. En la mayoría de los mamíferos, la actividad sexual se inicia sólo si se cumple la siguiente regla: “Las condiciones presentes deberán ser tales, que aseguren una probabilidad alta de supervivencia tanto a la cría como a la madre”. Con el propósito de determinar si tal condición se cumple, el animal utiliza una serie de mecanismos complejos que tienen como fin informar sobre el estado actual del medio ambiente y que durante su evolución le han permitido prever las características del mismo en un periodo determinado (Lindsay, 1991).

Dado que los ovinos y caprinos se encuentran en diferentes zonas ecológicas, estas especies han desarrollado diferentes estrategias reproductivas. En las regiones templadas, la mayoría de las razas ovinas y caprinas manifiestan una actividad sexual estacional, presentando un período de actividad sexual, que se caracteriza por la presentación de ciclos estrales regulares, seguido por un período de inactividad sexual o anestro, el cual se caracteriza por la ausencia de dichos ciclos (Hafez, 1952; Ortavant *et al.*, 1985). Por ejemplo, el período natural de reproducción de las hembras ovinas de las razas Ile-de-France y Suffolk, se produce de septiembre a febrero. En cambio,

el período de anestro se presenta de marzo a agosto (Thimonier y Mauléon, 1969; Karsch *et al.*, 1984). En las hembras caprinas originarias de estas latitudes templadas, también se observa la existencia de importantes variaciones de la actividad estral y ovulatoria. Por ejemplo, en las hembras de la raza Alpina, el período natural de reproducción ocurre de septiembre a marzo, y el período de anestro se presenta de abril a agosto (Chemineau *et al.*, 1992a).

Los machos ovinos y caprinos originarios de estas regiones, también muestran marcadas variaciones en su actividad sexual. Por ejemplo, en los machos ovinos, el peso testicular, reflejo de la actividad espermatogénica, varía de acuerdo a la estación del año. Durante el otoño y el invierno (período de actividad sexual), se observa un elevado peso testicular, mientras que durante la primavera y el verano (período de reposo sexual), este peso testicular es bajo (Lincoln y Short, 1980; Pelletier *et al.*, 1988). En los machos cabríos, la actividad sexual también se modifica profundamente durante el año. Estas variaciones se han observado en los machos de las razas Alpina y Saanen, en los cuales el peso testicular es más elevado en octubre-noviembre, período de actividad sexual (Delgadillo *et al.*, 1991). De la misma manera, la libido, la producción y la calidad del semen en estas razas son más elevadas durante el otoño e invierno que en primavera y verano (Chemineau *et al.*, 1988; Delgadillo *et al.*, 1992, 1993).

Diversos estudios han demostrado que el comportamiento reproductivo estacional de los ovinos y caprinos originarios de las zonas templadas es debido a las variaciones del fotoperíodo a través del año. La actividad

reproductiva es estimulada durante los días decrecientes e inhibida durante los días crecientes, por lo que la actividad reproductiva de estas especies se presenta en otoño e invierno (Hafez, 1952; Ortavant *et al.*, 1964).

En las regiones subtropicales se ha demostrado recientemente que en algunas razas de ovinos y caprinos también existe una marcada estacionalidad reproductiva, semejante a la reportada en las razas de regiones templadas (Santa María *et al.*, 1988; Walkden-Brown *et al.*, 1994; Delgadillo y Malpaux, 1996; Rivera *et al.*, 2003). En Chile (33° latitud sur), el período de actividad sexual de las cabras locales se presenta de febrero a octubre (otoño-invierno), mientras que el período de anestro o reposo sexual, se registra de noviembre a enero (primavera-verano; Santa María *et al.*, 1988). En las cabras de la raza Cashmere en Australia, la época de actividad estral se presenta de febrero a agosto (otoño-invierno), mientras que el período de reposo sexual es de septiembre a enero (primavera-verano; Restall, 1992). En el norte de México, la estación sexual de las cabras locales se desarrolla de septiembre y marzo, mientras que el periodo de anestro ocurre de marzo a agosto (Duarte *et al.*, 2008).

Los machos cabríos originarios de regiones subtropicales también presentan variaciones importantes en su actividad reproductiva anual. En estos machos la estación sexual se desarrolla de mayo a diciembre y se caracteriza por un intenso comportamiento sexual y olor, así como de elevadas concentraciones de testosterona plasmática. Por el contrario, durante el periodo de reposo sexual, el cual ocurre de enero a abril, estas variables disminuyen

considerablemente (Delgadillo *et al.*, 1999). Al igual que en las regiones templadas, el fotoperiodo es el principal factor que controla las variaciones de la actividad sexual en estas regiones. Sin embargo, otros factores del medio ambiente como las relaciones socio-sexuales y la nutrición, actúan como moduladores de la actividad sexual de los animales en estas latitudes (Martin *et al.*, 2004; Forcada y Abecia, 2006).

En las zonas tropicales, los ovinos y caprinos tienen el potencial para reproducirse en cualquier época del año (Delgadillo y Malpaux, 1996). Las hembras de las razas originarias de estas latitudes manifiestan, en ausencia de gestación, una actividad estral y ovulatoria durante todo el año (Yenikoye, 1984; Chemineau, 1993). Por ejemplo, en las cabras criollas originarias de la Isla de Guadalupe en el Caribe, más del 80 % y 90 % de las hembras presentan una actividad estral y ovárica durante todo el año, respectivamente (Chemineau, 1986). De la misma manera, los machos Criollos de la Isla de Guadalupe, no presentan variaciones estacionales de la libido, del peso testicular, ni de la producción espermática (Chemineau, 1993). Al parecer, en estas regiones, la disponibilidad de alimento es el principal factor del medio ambiente que regula la actividad reproductiva (González-Stagnaro, 1983; Chemineau, 1986; Bronson y Heideman, 1994).

II.2 Uso del fotoperiodo para inducir la actividad sexual en los machos

El fotoperiodo, como definición, es la variación estacional de la duración del periodo de iluminación diaria y es el factor ambiental más repetible a lo largo de los años (Chemineau *et al.*, 1992b; Malpaux, 2006; Chemineau *et al.*, 2010). Como se mencionó anteriormente, las variaciones del fotoperiodo durante el año regulan la estacionalidad reproductiva en la mayoría de las razas ovinas y caprinas de las zonas templadas y subtropicales (Malpaux *et al.*, 1997; Delgadillo *et al.*, 1999; Rivera *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2010). El fotoperiodo controla la secreción de melatonina, esta hormona es la responsable de la sincronización del ritmo anual de la reproducción. El estímulo luminoso es recibido en la retina y transmitido hasta la glándula pineal, la cual secreta melatonina solamente en los periodos de oscuridad. Una duración larga en la secreción de melatonina es percibida como un día corto, mientras que una duración corta de secreción es percibida como un día largo. El efecto final de la melatonina es modular la secreción de GnRH que a su vez controla la secreción de LH y FSH, y por tanto la actividad de las gónadas (Malpaux *et al.*, 1998).

Diversos estudios han demostrado que manipulando artificialmente el fotoperiodo natural se puede manipular la actividad sexual de los ovinos y caprinos. Estos tratamientos fotoperiódicos se basan en la alternancia de días largos y cortos. Por ejemplo, se ha demostrado en condiciones artificiales que

en los machos ovinos sometidos a cambios rápidos en la duración del día, los días largos inhiben la actividad sexual y los días cortos la estimulan (Lincoln y Short, 1980). Sin embargo, no existe hasta el momento un tratamiento fotoperiódico que asegure una actividad sexual permanente. Es decir, que los animales dejen de manifestar periodos de actividad e inactividad sexual en el transcurso de un año. Por ejemplo, en los machos ovinos de las razas Merino y Suffolk, mantenidos durante dos años continuos en un fotoperiodo de equinoccio (12 h de luz/día), la circunferencia testicular mostró variaciones similares a las observadas en los animales testigos que percibieron el fotoperiodo natural (Martin *et al.*, 1999). Por ello, para manipular la actividad sexual de los animales a través de manipulaciones en la duración del fotoperiodo, es necesaria la alternancia de días largos y días cortos o bien la utilización de hormonas exógenas como la melatonina, que simula los efectos de días cortos (Chemineau *et al.*, 1992b). En los machos cabríos de las razas Alpina y Saanen, la exposición a dos meses de días largos a partir de diciembre o enero seguidos de la aplicación de melatonina, inducen una intensa actividad sexual durante el periodo de reposo sexual (Chemineau *et al.*, 1992b; Arranz *et al.*, 1995). Un efecto similar es observado en los machos locales de la Comarca Lagunera. En estos animales, la aplicación de 2.5 meses de días largos (16 h de luz/día) a partir del 1 de noviembre, seguidos de la aplicación subcutánea de dos implantes de melatonina (18 mg c/u), permite inducir una intensa actividad sexual durante el periodo de reposo sexual natural (Flores *et al.*, 2000; Delgadillo *et al.*, 2001; 2002; Rivas- Muñoz *et al.*, 2007). De igual manera, en los machos cabríos alojados en instalaciones abiertas y sometidos a días largos

artificiales seguidos de días naturales (sin el uso de melatonina exógena), los niveles plasmáticos de testosterona, así como las montas, los intentos de montas, aproximaciones y olfateos ano-genitales son superiores a los registrados en los machos no tratados (Flores *et al.*, 2000; Delgadillo *et al.*, 2002).

II.3 Bioestimulación sexual

Se ha demostrado que las relaciones socio-sexuales modifican el ciclo anual reproductivo en los ovinos y caprinos (Cheminau, 1987; Zarco *et al.*, 1995; Álvarez *et al.*, 1999). En efecto, las interacciones sociales entre compañeros de la misma especie provocan respuestas estimuladoras o inhibitorias en los centros neuroendocrinos que regulan la actividad sexual en ambos sexos.

II.3.1 Efecto macho

En cabras y ovejas en anestro estacional, la introducción repentina del macho induce ovulaciones y estros en la mayoría de las hembras. Este fenómeno, comúnmente llamado “efecto macho”, representa una forma eficaz y barata para el control del empadre, sobre todo durante el periodo de reposo

sexual (Underwood *et al.*, 1944; Shelton, 1960; Chemineau, 1987; Ungerfeld *et al.*, 2004).

II.3.1.1 Respuesta de las hembras al efecto macho

En las cabras anéstricas, la exposición a un macho provoca inmediatamente un incremento en la frecuencia y en la amplitud de los pulsos de LH (Poindron *et al.*, 1980; Chemineau *et al.*, 1986; Vielma *et al.*, 2009). Si el estímulo de los machos permanece por varias horas o días, el incremento en la secreción de hormonas hipofisarias (LH y FSH) provoca el desarrollo de los folículos ováricos, los cuales secretan elevadas cantidades de estradiol, lo que permite la aparición del pico preovulatorio de LH y la ovulación (Chemineau, 1987; Ungerfeld *et al.*, 2004). En un 60% de las cabras, la primera ovulación va acompañada de comportamiento estral entre los días 2 y 5 después de la exposición al macho (Figura 1). El cuerpo lúteo que se forma de esta primera ovulación es, en la mayoría de los casos, de mala calidad y secreta bajas cantidades de progesterona, la cual no es capaz de impedir un nuevo incremento en la secreción de LH (Chemineau *et al.*, 2006). Por ello, la mayoría de las cabras manifiestan un segundo estro entre los días 6 y 12 después del primer contacto con el macho, el cual es acompañado generalmente de ovulación y el cuerpo lúteo que se forma es de calidad y duración normal, es

decir, alrededor de 21 días (Flores *et al.*, 2000; Delgadillo *et al.*, 2002; Chemineau *et al.*, 2006).

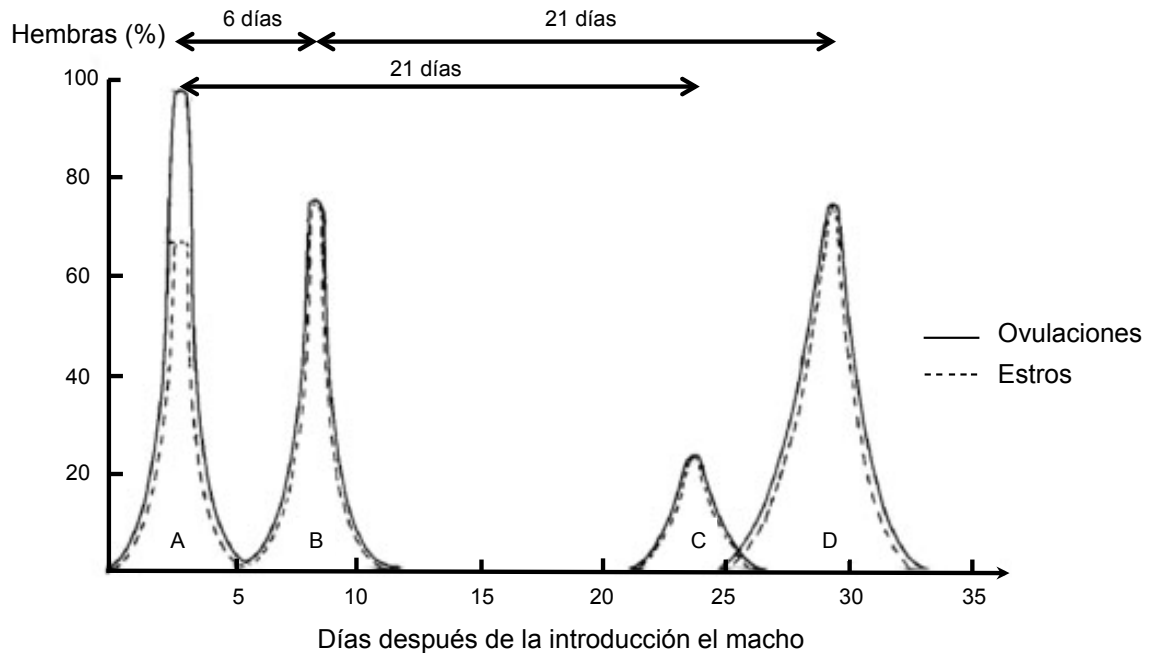


Figura 1: Representación esquemática de la respuesta al efecto macho de cabras anovulatorias. Más del 90 % de las hembras ovulan alrededor del día 3 después de la introducción de los machos (pico A). Esta primera ovulación está asociada con un comportamiento de estro en el 60 % de las hembras. La mayoría de las hembras que ovularon alrededor del día 3 experimentan un ciclo ovárico corto y ovulan nuevamente 6 días después (pico B). Si las hembras no quedan gestantes, ovulan por tercera ocasión 21 días más tarde (pico D). Las otras cabras (25 %) experimentan un ciclo normal después de la primera ovulación y, si no quedan gestantes, ovulan nuevamente 21 días después (pico C). Las ovulaciones de los picos B, C y D están asociadas con comportamiento de estro (Chemineau, 1987).

II.4 Regulación del eje reproductivo neuroendocrino por las kisspeptinas.

Las Kisspeptinas, también conocidas como metastinas, son neuropéptidos hipotalámicos producto de la transcripción y traducción del gen Kiss1. Su procesamiento postraducciona puede dar lugar a una serie de péptidos de 54, 14, 13 y 10 aminoácidos, los cuales poseen una actividad similar, dado que comparten los 10 aminoácidos en los que reside su actividad biológica (Roa *et al.*, 2008). Sin embargo, datos obtenidos en experimentos en placenta muestran que posiblemente el principal péptido de la familia kisspeptina sea la kisspeptina-10, dado que fue el único que logró activar la liberación de Ca^{2+} intracelular (Bilban *et al.*, 2004). Además, es el más común en la mayoría de las especies hasta hoy estudiadas.

Las kisspeptinas ejercen su efecto a través de la activación del receptor GPR54, que está acoplado a una proteína G (Messenger *et al.*, 2005), cuya vía de transducción de señales no está aún bien dilucidada; sin embargo, se le relaciona con una compleja red de señalización, debido a sus múltiples funciones fisiológicas. Por ejemplo, se ha encontrado que kisspeptina actúa como supresor de metástasis en células de melanoma y cáncer de mama (Lee *et al.*, 1996; Lee y Welch, 1997).

Las kisspeptinas están fisiológicamente involucradas en el proceso de diferenciación sexual cerebral, en el momento de la pubertad, en la transmisión de los efectos de la retroalimentación positiva y negativa de los esteroides

sexuales, en la generación del pico preovulatorio de gonadotropinas y en la modulación de la función reproductiva por las señales ambientales, como el fotoperiodo y el estrés (Pineda *et al.*, 2010).

La administración de kisspeptina, ya sea en forma sistémica (Caraty *et al.*, 2007) o central (Messenger *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2004), induce la liberación de GnRH e indirectamente de las gonadotropinas hipofisiarias, por lo que podría tener aplicaciones potenciales para manipular la reproducción.

En ovejas y cabras, las neuronas que secretan kisspeptina están localizadas en el área preóptica dorso-lateral (APO) y en el núcleo arcuato (ARC; Franceschini *et al.*, 2006; Wakabayashi *et al.*, 2010; De Bond *et al.*, 2013), y la expresión del gen *Kiss1*, así como la producción del péptido se incrementa en el ARC al principio de la estación sexual (Smith *et al.*, 2008; Clarke *et al.*, 2009). Además, durante la estación sexual, existe un mayor número de fibras de neuronas que secretan kisspeptina en posición cercana con neuronas que secretan GnRH (Smith *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha demostrado que durante el anestro existen niveles más bajos de kisspeptina, y una infusión de éste péptido causa la ovulación de las hembras en anestro estacional (Caraty *et al.*, 2007). Es interesante notar que la respuesta a la kisspeptina (estímulo de la secreción de GnRH) es mayor durante el anestro y esto puede ser debido a una mayor expresión del receptor a kisspeptina en las neuronas a GnRH durante este periodo del año (Smith *et al.*, 2008).

Durante el efecto macho en ovejas, la introducción de un carnero en un grupo de hembras anéstricas induce la activación de las células a GnRH en el APOM, y las que secretan kisspeptina en el ARC. Lo anterior fue demostrado al registrarse un mayor número de células que expresan el marcador de activación celular temprana c-Fos localizado en neuronas a GnRH y kisspeptina (De Bond *et al.*, 2013). Además, la inyección intracerebroventricular de un antagonista a la kisspeptina (P-271) bloquea la respuesta de LH inducida por el macho (De Bond *et al.*, 2013). Por otra parte, se demostró que el olor del macho es la señal sensorial más importante del efecto macho, aunque existen algunos debates para determinar si las señales olfatorias solas son suficientes para inducir una respuesta completa, es decir, la ovulación (Claus *et al.*, 1990; Martinez-Alfaro *et al.*, 2014). Trabajos recientes en cabras demostraron que cuando se les presenta a hembras feromonas de macho, y en particular el 4-ethyloctanal, se incrementa la actividad electrofisiológica de unidad múltiple (MUA; Sakamoto *et al.*, 2013; Murata *et al.*, 2014) en el ARC, área que se cree esencial en la generación de pulsos a GnRH (Lehman *et al.*, 2010; Wakabayashi *et al.*, 2010). En efecto, las neuronas que expresan kisspeptina, neurokinina B y dinorfina (KNDys) son en parte responsables de la actividad MUA en ovejas y cabras (Ohkura *et al.*, 2009; Wakabayashi *et al.*, 2010).

Considerando los resultados anteriormente descritos sobre la kisspeptina, y que los machos cabríos foto-estimulados, sexualmente activos, son más eficientes que los no tratados, sexualmente inactivos, para inducir la ovulación de las cabras expuestas al efecto macho, el objetivo del presente estudio fue determinar la respuesta de las neuronas en el APOM y ARC de las cabras expuestas a los machos. La hipótesis fue que la activación de las neuronas del APOM y ARC sería mayor en las hembras expuestas a los machos foto-estimulados que en aquellas en contacto con los machos no tratados.

CAPÍTULO IV MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Localización del estudio

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación en Reproducción Caprina de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna y en el Ejido El Cambio, Municipio de Matamoros, Coahuila. Ambas localidades se encuentran enclavadas en la Comarca Lagunera la cual está situada a la latitud 26° Norte y a una altitud que varía de 1100 a 1400 metros sobre el nivel del mar.

IV.2 Animales experimentales

IV.2.1 Machos

En el presente estudio se utilizaron 6 machos cabríos locales adultos de la Comarca Lagunera. Estos machos fueron alojados en un corral al aire libre de 5 x 6 m y se alimentaron durante todo el estudio con heno de alfalfa a libre acceso y 300 g de concentrado comercial (14 % de P.C, 2.5 Mcal/kg) por día y por animal; el agua y sales minerales se proporcionaron a libre acceso.

El 1 de noviembre, los machos se dividieron en 2 grupos (n=2 cada uno). Un grupo se sometió a las variaciones naturales del fotoperiodo, por lo que estaban en reposo sexual al momento de realizar el efecto macho (ver sección efecto macho). A estos machos se les denominó machos sexualmente inactivos. El otro grupo de machos fue sometido a un tratamiento fotoperiódico de 2.5 meses de días largos artificiales (16 h de luz/día), a partir del 1 de noviembre. Para ello, en el corral se instalaron 6 lámparas fluorescentes que proporcionaron una intensidad luminosa de 250-350 lux a nivel de los ojos de los machos. Los días largos fueron proporcionados combinando luz artificial y luz natural. El mecanismo de encendido y apagado de las lámparas se realizó mediante un reloj automático y programable (Interamic, Timerold, USA). Por la mañana, las lámparas se encendieron diariamente a la 06:00 h, y se apagaron a las 09:00 h. Por la tarde, las lámparas se encendieron a las 17:00 h y se apagaron a las 22:00 h. Este tratamiento fotoperiódico estimula la actividad sexual de los machos durante el periodo de reposo sexual (marzo-abril). Por lo tanto, a estos machos se les denominó machos sexualmente activos.

IV.2.2 Hembras

Para este estudio se utilizaron 21 cabras locales, multíparas, y anovulatorias. La ciclicidad de las hembras se determinó el 1 y 9 de abril mediante ultrasonografía transrectal utilizando para ello un Scanner modo-B

(Aloka SSD 550, Tokio, Japón) equipado con un transductor lineal de 7.5 MHz. El criterio para determinar si una hembra estaba cíclica, fue la presencia de al menos un cuerpo lúteo en alguna de las ecografías (CL; De Castro *et al.*, 1999). Ninguna de las 21 cabras estaba cíclica al momento de iniciar el estudio. A partir de ese día, las hembras se alimentaron con heno de alfalfa a libre acceso; asimismo tenían libre acceso al agua y sales minerales.

IV.3 Efecto macho

El 10 de abril las hembras se dividieron en 3 grupos (n=7 cada uno) según su condición corporal (Tabla 1), y se alojaron en 3 corrales diferentes: i) un grupo de hembras se aisló de los machos; ii) otro grupo de hembras se expuso a los machos sexualmente inactivos; iii) el tercer grupo de hembras se expuso a los machos sexualmente activos. La exposición a los machos se llevó a cabo en 6 días. Para ello, subgrupos de 3-4 hembras se llevaron a un nuevo corral donde se pusieron en contacto con los machos sexualmente inactivos o activos (n=2).

Tabla 1. Condición corporal (promedio $\pm$ EEM) de las hembras de los 3 grupos experimentales utilizados en el presente estudio.

Grupo	n	Condición corporal
Aislada de machos	7	2.0 ± 0.1
Con macho inactivo	7	2.0 ± 0.1
Con macho activo	7	2.0 ± 0.2

IV.4 Sacrificio, perfusión y preparación de los cortes histológicos del APOM y ARC

Después de 2 h de exposición a los machos, las hembras se sacrificaron por decapitación por un carnicero calificado bajo la supervisión de médicos veterinarios. Las hembras que fueron aisladas de los machos se sacrificaron a la misma hora del día que aquellas expuestas a los machos.

Las cabezas de las hembras se perfundieron por ambas arterias carotideas con 2 L de nitrito de sodio al 1%, seguidos de 4 L de una solución de fijación al 4% de paraformaldehído en tampón de fosfato (pH 7.4, 0.1 M). Después de la perfusión, el cerebro se extrajo del cráneo y se cortó en bloques, que se postfijaron en la misma solución de fijación durante 24 h y después se sumergieron en una solución de sacarosa al 30% en el tampón de fosfato. De los bloques obtenidos, se hicieron cortes de 30 micras de grosor de la región hipotalámica que contenía el ARC y el APOM, utilizando un criostato (Leica).

Posteriormente, los cortes se guardaron a 4 °C en una solución tampón de PBS-azide hasta su análisis.

IV.5 Inmunohistoquímica

- Protocolo para Inmunohistoquímica sobre c-Fos revelada con diaminobenzidina (DAB) en el APOM

Para cada uno de los lavados e incubaciones realizadas los tejidos se mantuvieron en constante agitación. Se lavaron en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS; 5 lavados de 5 min cada uno), para después permeabilizar las membranas celulares con un lavado de H₂O₂ (1%; 1 lavado de 30 min). Después de un lavado en PBS (5 min), los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario (anticuerpo de ratón anti-Fos diluido al 1:10,000, sc-271243, Santa Cruz) durante 48 horas a 4° C en una solución de albúmina (0.1%) y Tritón 10X (0.52%). Al sacar los tejidos del anticuerpo primario, se realizaron lavados en PBS (5 lavados de 5 min cada uno). La incubación del anticuerpo secundario (IgG anti-conejo bioetnilado diluido al 1/300, BA-1000, Vector laboratories) se realizó por dos horas en una solución de albúmina (1%). El anticuerpo secundario se lavó con PBS (5 lavados de 5 min c/u). Para el revelado, los tejidos se incubaron en solución avidina-biotina (Kit ABC, Vector laboratories) durante 90 minutos, y la reacción de ABC se reveló con DAB

(3,3'Diaminobenzidina hidrato tetrahidroclorídrico; 0.02%) en una solución de PBS y H₂O₂ (0.01%). Al finalizar el revelado, los tejidos se lavaron por última vez en PBS (1 lavado de 5 min) y se montaron en laminillas gelatinizadas utilizando la resina Permout para cubrirlas para su posterior análisis.

- Protocolo para Inmunohistoquímica sobre c-Fos y Kisspeptina revelada con fluorescencia en el ARC

El protocolo para inmunohistoquímica con fluorescencia es muy similar al utilizado cuando se revela con DAB: los lavados e incubaciones realizadas a los tejidos se mantuvieron en constante agitación en un cuarto oscuro a partir del anticuerpo secundario. Los tejidos se lavaron en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (5 lavados de 5 min cada uno), para después permeabilizar las membranas celulares con un lavado de borohidrato de sodio (0.5%; 15 min). Después de lavar los cortes en PBS (3 lavados de 5 min c/u), se pre incubaron durante una hora en una solución de PBS-tritón-azida y albúmina al 1%. Los tejidos se incubaron con los anticuerpos primarios de c-Fos (anticuerpo de ratón anti-Fos diluido al 1:200, sc-271243, Santa Cruz) y kisspeptina (anticuerpo de conejo anti-kisspeptina diluido al 1:20,000; proporcionado por el Dr. Alain Caraty; Franceschini *et al.*, 2006) durante 48 horas a 4° C en una solución de albúmina 0.1% (1%) y Tritón 10X (0.32%). Al sacar los tejidos del anticuerpo primario, se realizaron lavados junto con el bloqueo para el anticuerpo

secundario con albúmina 0.1% (5 lavados de 5min cada uno). La incubación de los anticuerpos secundarios de c-Fos (anticuerpo de ratón diluido al 1:2000, Alexa 568, Invitrogen, A11031) y kisspeptina (anticuerpo de conejo diluido al 1:1,000, Alexa 488, Invitrogen, A11034) se realizó por tres horas a temperatura ambiente en una solución de PBS y albúmina 0.1%. El anticuerpo secundario se lavó con PBS y Tritón 10X (0.02%) (4 lavados de 5 minutos). Los tejidos se incubaron con Hoechst diluido al 1:1,000 por 15 minutos y finalmente se lavaron con PBS (4 lavados de 10 minutos) y se montaron en laminillas gelatinizadas utilizando la resina Acqua Poly/Mount (Polysciences, Inc., 633008) para cubrirlas. Las laminillas se mantuvieron protegidas de la luz y a 4° C para su posterior análisis.

IV.6 Análisis de las imágenes y conteo

Todas las imágenes marcadas reveladas con fluorescencia se tomaron con un microscopio confocal láser (LSM 700, Carl Zeiss, Germany) asociado con un programa denominado Zen. El brillo, contraste y rangos de color fueron ajustados.

IV.7 Variables determinadas

IV.7.1 Hembras

El números de células con c-Fos o kisspeptina dentro de las secciones anterior y medial del ARC se obtuvieron contando el número de núcleos o cuerpos celulares inmunoreactivos a c-Fos y kisspeptina dentro de secciones anatómicas parejas identificadas con el atlas Richard y con la ayuda de las siguientes referencias en caprinos y ovinos: Franceschini *et al.* (2006) y Keller *et al.* (2004). Se demostró que estos niveles son los que muestran una activación significativa en el ARC en respuesta a la presencia del macho (De Bond *et al.*, 2013). En relación con el APOM, analizamos 3 secciones dentro del área, es decir el APOM anterior, medial y posterior identificadas con la ayuda del atlas Richard y de referencias encontradas en la bibliografía (Welento *et al.*, 1969).

En ambos APOM y ARC, se delimitó, con puntos de referencia anatómicos, un área de tamaño constante para el conteo de inmunoreactividad a c-Fos y kisspeptina. El número absoluto de células marcadas con c-Fos y/o kisspeptina se contó en estas áreas y se comparó entre grupos. Los resultados se expresaron como densidad celular (número de células/mm²).

IV.7.2 Machos

Se determinó el comportamiento sexual de los machos durante 20 minutos a partir de su introducción con las hembras. Observadores entrenados observaron individualmente los machos y registraron los siguientes comportamientos: olfateos ano-genitales, aproximaciones, intentos de monta, flehmen y automarcaje con orina (Gonzalez *et al.*, 1988; Flores *et al.*, 2000; Fabre-Nys, 2000).

IV.8 Análisis estadísticos

Para cada región del cerebro, se agruparon los datos de los niveles que se analizaron (ARC: anterior y medial; APOM: anterior, medial y posterior) y se expresaron en promedio $\pm$ EEM. Las diferencias entre grupos en la expresión de Fos y/o kisspeptina se compararon con pruebas no-paramétricas. Primeramente, se usó una ANOVA de una vía para comparar los 3 grupos. Cuando existieron diferencias, las comparaciones entre 2 grupos se realizaron con una prueba post-hoc LSD de Fisher. El nivel de significancia estadística se estableció a $P < 0.05$. El comportamiento sexual entre los machos activos y los machos inactivos no se comparó estadísticamente a causa del bajo número de machos ($n=2$ en cada grupo).

V.1 Activación de las neuronas a kisspeptina en el ARC

La densidad de células positivas para c-Fos aumentó gradualmente según el tipo de estímulo que recibieron las hembras. En efecto, las hembras aisladas de los machos mostraron el nivel de expresión más bajo, mientras las hembras que se expusieron a los machos sexualmente activos expresaron el nivel más alto de células positivas a c-Fos ($P < 0.0001$). Las hembras expuestas a machos sexualmente inactivos expresaron un nivel intermedio de c-Fos entre los otros dos grupos ($P = 0.18$: machos inactivos vs aisladas de los machos; $P < 0.0001$: machos inactivos vs machos activos; Figures 2A y 3).

La densidad de células positivas para la kisspeptina y el porcentaje de células que co-expresaron c-Fos y kisspeptina no difirió entre los grupos ($P > 0.05$; Figures 2B,C y 3).

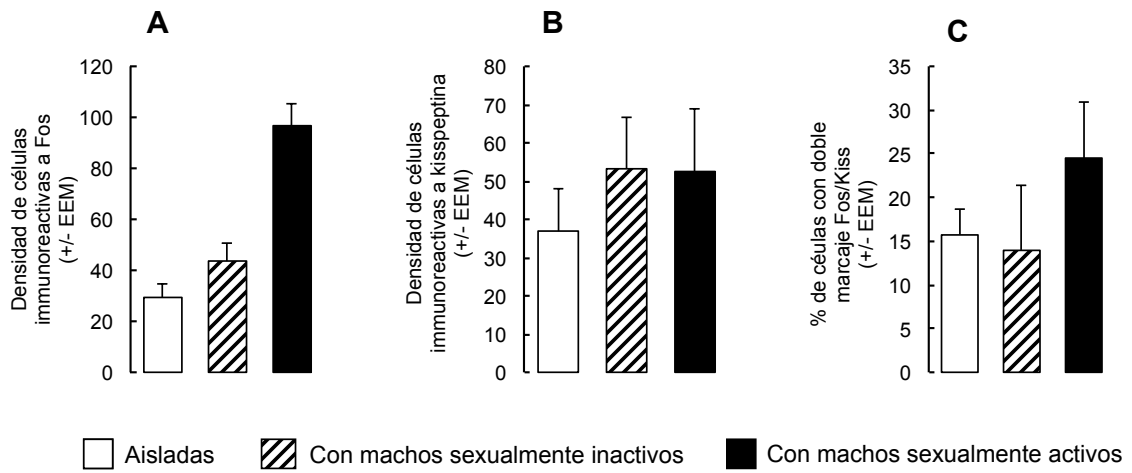


Figura 2. Densidad de células inmunomarcadas con c-Fos (A) o kisspeptina (B) y porcentaje de células a kisspeptina que co-expresaron c-Fos (C) en el ARC de hembras caprinas aisladas de machos, expuestas a machos sexualmente inactivos o expuestas a machos sexualmente activos.

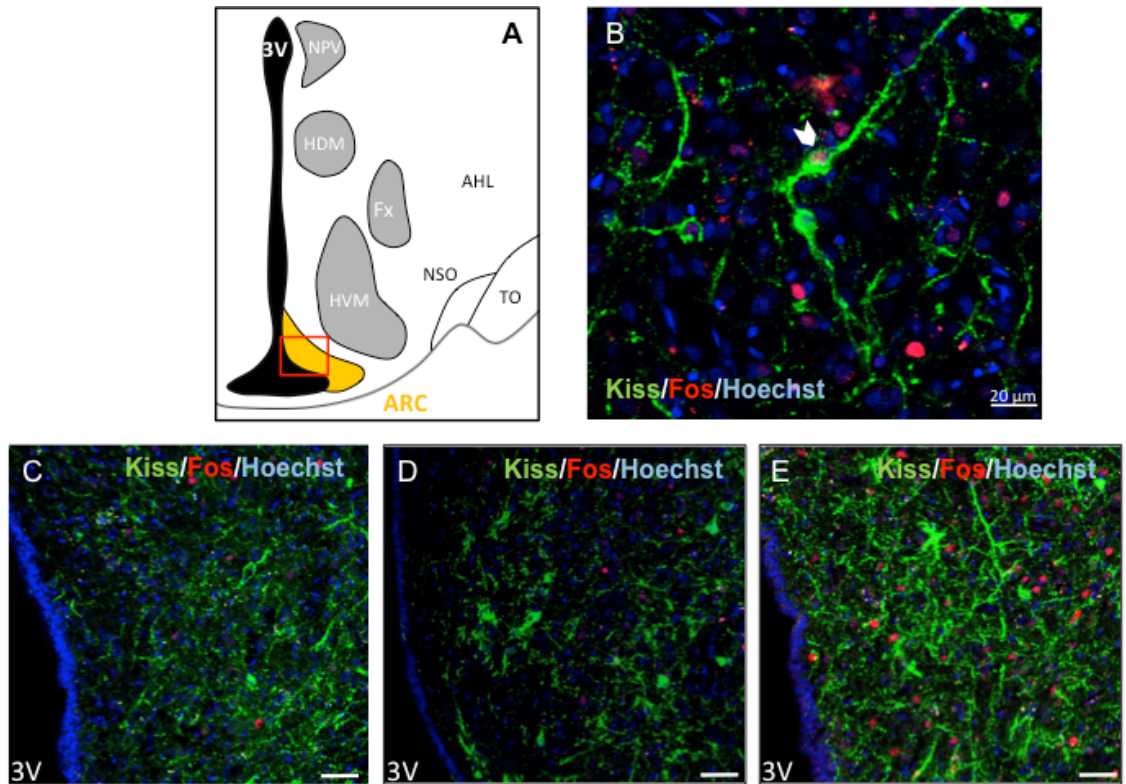


Figura 3. (A) Localización anatómica y puntos de referencia usados en el núcleo arcuato (ARC). HDM: núcleo hipotalámico dorsomedial, Fx: fornix, AHL: área hipotalámica lateral, TO: tracto óptico, NPV: núcleo paraventricular, NSO: núcleo supraóptico, HVM: núcleo hipotalámico ventromedial, 3V: tercer ventrículo (Adaptado de Ohara *et al.*, 2014). Las imágenes ilustran las células a kisspeptina co-marcadas con c-Fos (B); la cantidad de marcaje c-Fos (rojo) y kisspeptina (verde) en el ARC de hembras aisladas (C); hembras expuestas a machos sexualmente inactivos (D) o hembras expuestas a machos sexualmente activos (E).

V.2 Activación de las neuronas en el APOM

En el APOM, los machos sexualmente activos estimularon un mayor número de neuronas que los machos sexualmente inactivos. En efecto, las hembras que se expusieron a los machos sexualmente activos mostraron una expresión de c-Fos más alta que en las aisladas de los machos ($P=0.003$), y esta expresión también tendió a ser más alta que en las hembras que se expusieron a los machos sexualmente inactivos ($P=0.08$). No hubo diferencia en la densidad de células activadas entre las hembras aisladas de los machos y las expuestas a machos sexualmente inactivos ($P=0.43$; Figure 4).

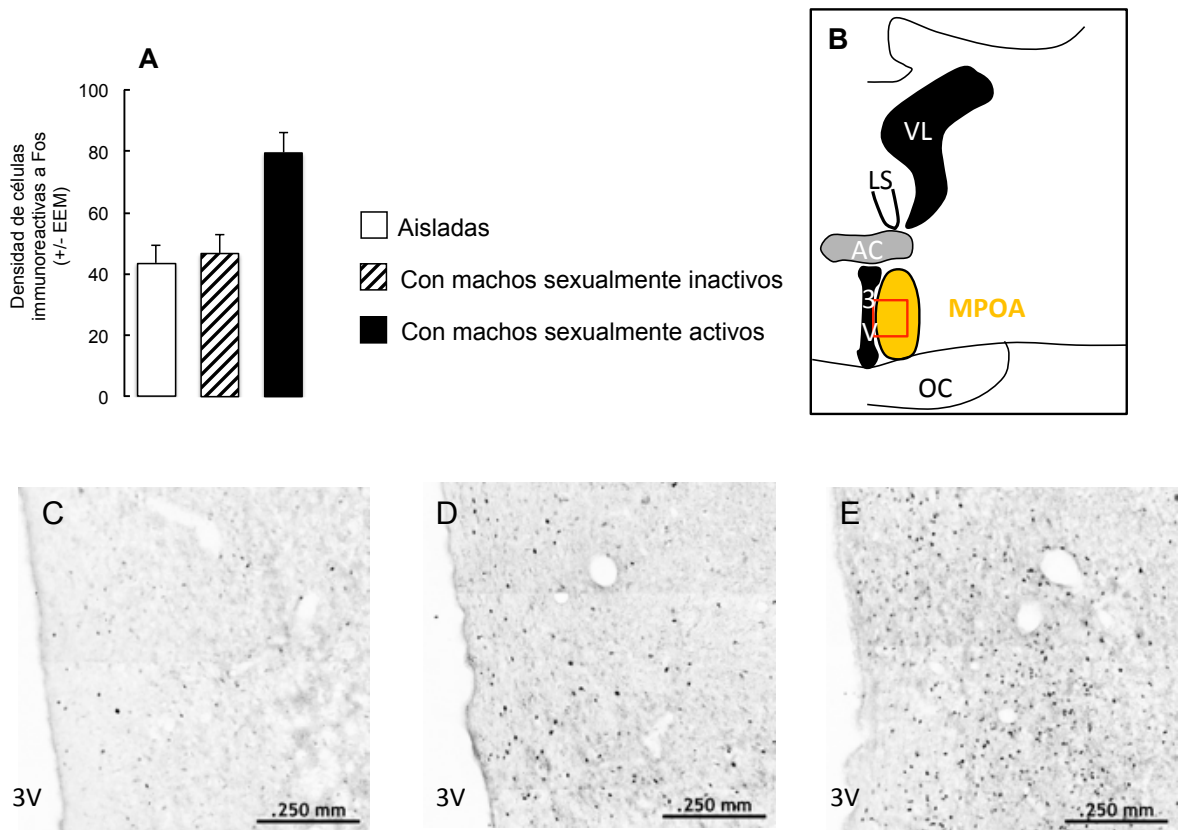


Figura 4. (A) Densidad de células inmunomarcadas con c-Fos en el área preóptica (APOM) de hembras caprinas aisladas de machos, expuestas a machos sexualmente inactivos o expuestas a machos sexualmente activos. (B) Localización anatómica y puntos de referencia usados en el APOM. CA: comisura anterior, SL: septum lateral, VL: ventrículo lateral, CO: chiasma óptico, 3V: tercer ventrículo (Adaptado de Meurisse *et al.*, 2009). Las imágenes ilustran la cantidad de marcaje c-Fos en las hembras aisladas de los machos (C), hembras expuestas a machos sexualmente inactivos (D) o hembras expuestas a machos sexualmente activos (E).

V.3 Comportamiento sexual de los machos

En la Figura 5 se muestra el comportamiento sexual desplegado por los machos machos sexualmente inactivos y activos. El número de conductas mostradas por los machos sexualmente activos fue mayor a las mostradas por los machos sexualmente inactivos en todas las variables del comportamiento que fueron registradas.

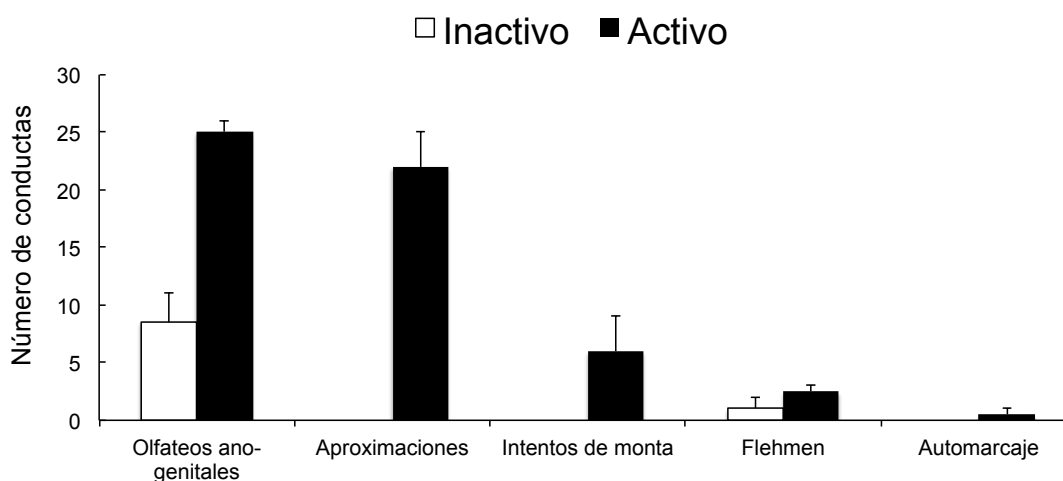


Figura 5. Número de conductas del comportamiento sexual (Promedio $\pm$ EEM) de los machos cabríos sexualmente inactivos y activos. Los machos sexualmente inactivos permanecieron bajo el fotoperiodo natural de la Comarca Lagunera (n=2). Los machos sexualmente activos se sometieron a días largos artificiales (16 h de luz por día) del 1 de noviembre al 15 de enero (n=2) para estimular su actividad sexual.

Los resultados de la presente investigación demuestran que la intensidad del comportamiento sexual de los machos cabríos influye la estimulación neuronal del APOM y ARC, dos regiones claves del hipotálamo involucradas en el control del funcionamiento del eje gonadotrópico de las hembras. En efecto, en el presente trabajo se demostró que los machos sexualmente activos estimulan un mayor número de células en ambas regiones en comparación a los machos sexualmente inactivos. Sin embargo, esta activación, determinada por la expresión del gen de expresión temprana c-Fos, al parecer no involucra específicamente las neuronas que secretan kisspeptina en el ARC, aunque se ha demostrado que éstas células son muy sensibles al olor del macho (Murata *et al.*, 2014).

En el presente estudio los machos foto-estimulados, sexualmente activos, desplegaron un mayor comportamiento sexual que los sexualmente inactivos al estar en contacto con las hembras, lo que coincide con lo reportados en otros estudios (Flores *et al.*, 2000; Delgadillo *et al.*, 2002; Zarazaga *et al.*, 2010). Además, se reportó que los machos foto-estimulados son más eficientes para inducir la ovulación de las cabras anéstricas que los machos no tratados (Flores *et al.*, 2000; Rivas-Muñoz *et al.*, 2007; Zarazaga *et al.*, 2010). Es probable que la intensidad del comportamiento sexual de los machos sea el factor principal que determina las respuestas endocrina y sexual de las cabras en contacto con los machos. En efecto, en un estudio realizado

con cabras de la Comarca Lagunera, se demostró que los machos foto-estimulados sedados, los cuales no despliegan comportamiento sexual, pero si un intenso olor, estimularon transitoriamente la pulsatilidad de la secreción de LH. Sin embargo, solamente los machos foto-estimulados despiertos, los cuales despliegan, además de un intenso olor, un intenso comportamiento sexual, lograron estimular y mantener elevada la pulsatilidad de la LH hasta alcanzar el pico preovulatorio (Vielma *et al.*, 2009; Martínez-Alfaro *et al.*, 2014). En el presente estudio, es muy probable que la mayor estimulación de las neuronas del APOM y ARC se debió principalmente a la intensidad del comportamiento sexual de los machos foto-estimulados. En conjunto, estos datos refuerzan la idea de que la estimulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas de las cabras depende de la intensidad del comportamiento sexual de los machos.

A pesar de nuestra hipótesis inicial, la población de neuronas que expresan kisspeptina en el ARC y que pertenecen al grupo de neuronas Kisspeptina/Neurokinina B/Dinorfina (KNDy) involucradas en el control de la actividad pulsátil de la GnRH y LH, no fue activada por los machos sexualmente activos. Estos resultados son sorprendentes si se toma en cuenta los resultados previos en ovejas que demostraron que la introducción de un carnero induce una activación específica de esta población de neuronas (De Bond *et al.*, 2013). Además, estos autores demostraron que la inyección intracerebroventricular de un antagonista a la kisspeptina (P-271) bloquea la respuesta de la LH inducida por el macho. En cabras, trabajos recientes demostraron que las feromonas de macho, y en particular el 4-ethyloctanal, incrementa la actividad

electrofisiológica de unidad múltiple en el ARC de las cabras (MUA; Sakamoto *et al.*, 2013; Murata *et al.*, 2014). Las diferencias entre nuestros resultados y los antes mencionados podrían provenir de diferencias fisiológicas entre ovejas y cabras, o de diferencias raciales caprinas. En efecto, el grupo japonés utiliza cabras de la raza Shiba, que no son animales estacionales, mientras que las cabras utilizadas en el presente estudio son muy estacionales. Además, los experimentos realizados por Sakamoto *et al.* (2013) y Murata *et al.* (2014) para determinar la respuesta MUA a las feromonas de macho se realizaron con hembras ovariectomizadas, mientras que en el presente estudio se utilizaron cabras intactas.

Los resultados de la presente investigación demuestran que los machos cabríos que despliegan un intenso comportamiento sexual estimulan las neuronas del área preóptica y el núcleo arcuato, dos regiones claves del hipotálamo involucradas en el control del funcionamiento del eje gonadotrópico de las hembras.

Álvarez, R.L., Ducoing, W.A.E., Zarco, Q.L., Trujillo, G.A.M. (1999). Conducta estral, concentraciones de LH y función lútea en cabras en anestro estacional inducidas a ciclar mediante el contacto con cabras en estro. *Veterinaria México*, 30, 25-31.

Arranz, J.M., Lagriffoul, G., Guérin, Y, Chemineau, P. (1995). Control of sperm production in rams by treatments associating extra-light and melatonin implants. *Rencontres Recherches Ruminants*. 2, 22-26.

Bedos, M., Flores, J.A., Fitz-Rodríguez, G., Keller, M., Malpaux, B., Poindron, P., Delgadillo, J.A. (2010). Four hours of daily contact with sexually active males is sufficient to induce fertile ovulation in anestrus goats. *Hormones and behavior*, 58, 473-477.

Bilban, M., Ghaffari-Tabrizi, N., Hintermann, E., Bauer, S., Molzer, S., Zoratti, C., Malli, R., Sharabi, A., Hiden, U., Graier, W., Knofler, M., Andreae, F., Wagner, O., Quaranta, V., Desoye, G. (2004). Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastatin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *Journal of Cell Science*, 117, 1319-1328.

Bronson, F.H., Heideman, P.D. (1994). Seasonal regulation of reproduction in mammals. *The physiology of reproduction*, 2, 541-584.

Caraty, A., Smith, J.T., Lomet, D., Ben Said, S., Morrissey, A., Cognie, J., Doughton, B., Baril, G., Briant, C. Clarke, I.J. (2007). Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology*, 148, 5258-5267.

Chemineau, P. (1986). Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. II. Male mating behaviour, testis diameter, ejaculate characteristics and fertility. *Reproduction Nutrition Développement*, 26, 453-460.

Chemineau, P., Levy, F., Thimonier, J. (1986). Effects of anosmia on LH secretion, ovulation and oestrous behaviour induced by males in the anovular Creole goat. *Animal Reproduction Science*, 10, 125-132.

Chemineau, P. (1987). Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrous cycles in anovulatory goats-a review. *Livestock Production Science*, 17, 135-147.

Chemineau, P., Pelletier, J., Guerin, Y., Colas, G., Ravault, J. P., Touré, G., Almeida, G., Thimonier, J. Ortavant, R. (1988). Photoperiodic and melatonin treatments for the control of seasonal reproduction in sheep and goats. *Reproduction Nutrition Développement*, 28, 409-422.

Chemineau, P., Daveau, A., Maurice, F., Delgadillo, J. A. (1992a). Seasonality of estrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod. *Small Ruminant Research*, 8, 299-312.

Chemineau, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A., Guerin, Y., Ravault, J.P., Thimonier, J., Pelletier, J. (1992b). Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Animal Reproduction Science*, 30, 157-184.

Chemineau, P. (1993). Reproducción de las cabras originarias de las zonas tropicales. *Revista Latinoamericana de Pequeños Rumiantes*, 1, 167-172.

Chemineau, P., Pellicer-Rubio, M.T., Lassoued, N., Khaldi, G., Monniaux, D. (2006). Male-induced short oestrous and ovarian cycles in sheep and goats: a working hypothesis. *Reproduction Nutrition Development*, 46, 417-429.

Chemineau, P., Bodin, L., Migaud, M., Thiéry, J.C., Malpaux, B. (2010). Neuroendocrine and genetic control of seasonal reproduction in sheep and goats. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 42-49.

Clarke, I.J., Smith, J.T., Caraty, A., Goodman, R.L., Lehman, M.N. (2009). Kisspeptin and seasonality in sheep. *Peptides*, 30, 154-163.

Claus, R., Over, R., Dehnhard, M. (1990). Effect of male odour on LH secretion and the induction of ovulation in seasonally anoestrous goats. *Animal Reproduction Science*, 22, 27-38.

De Bond, J.A.P., Li, Q., Millar, R.P., Clarke, I.J., Smith, J.T. (2013). Kisspeptin Signaling Is Required for the Luteinizing Hormone Response in Anestrous Ewes. *PLoS One*, 8:e57972

De Castro, T., Rubianes, E., Menchaca, A., Rivero, A. (1999). Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. *Theriogenology*, 52, 399-411.

Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P. (1991). Decrease in the seasonality of sexual behavior and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology*, 36, 755-770.

Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P. (1992). Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. *Small Ruminant Research*, 9, 47-59.

Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P. (1993). Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles. *Reproduction Nutrition Development*, 33, 609-617.

Delgadillo, J.A., Malpaux, B. (1996). *Reproduction of Goats in the Tropics and Subtropics. 6th International Conference On Goats*, 2, 785-793.

Delgadillo, J.A., Canedo, G.A., Chemineau, P., Guillaume, D., Malpaux, B. (1999). Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male Creole goats in subtropical northern Mexico. *Theriogenology*, 52, 727-737.

Delgadillo, J.A., Carrillo, E., Morán, J., Duarte, G., Chemineau, P., Malpaux, B. (2001). Induction of sexual activity of male creole goats in

subtropical northern Mexico using long days and melatonin. *Journal Of Animal Science*, 79, 2245-2252.

Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Véliz, F.G., Hernández, H.F., Duarte, G., Vielma, J., Poindron, P., Chemineau, P., Malpaux, B. (2002). Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. *Journal of Animal Science*, 80, 2780-2786.

Duarte, G., Flores, J.A., Malpaux, B., Delgadillo, J.A. (2008). Reproductive seasonality in female goats adapted to a subtropical environment persists independently of food availability. *Domestic Animal Endocrinology*, 35, 362-370.

Duarte, G., Nava-Hernández, M.P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A. (2010). Ovulatory activity of female goats adapted to the subtropics is responsive to photoperiod. *Animal Reproduction Science*, 120, 65-70.

Fabre-Nys, C. (2000). Le comportement sexuel des caprins: contrôle hormonal et facteurs sociaux. *INRA Productions Animales*, 13, 11–23.

Fernández, I.G., Luna-Orozco, J.R., Vielma, J., Duarte, G., Hernández, H., Flores, J.A., Gélez, H., Delgadillo, J.A. (2011). Lack of sexual experience does not reduce the responses of LH, estrus or fertility in anestrous goats exposed to sexually active males. *Hormones and behavior*, 60, 484-488.

Flores, J.A., Véliz, F.G., Pérez-Villanueva, J. A., De La Escalera, G.M., Chemineau, P., Poindron, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A. (2000). Male

reproductive condition is the limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anestrus in female goats. *Biology of Reproduction*, 62, 1409-1414.

Forcada, F., Abecia, J.A. (2006). The effect of nutrition on the seasonality of reproduction in ewes. *Reproduction Nutrition Développement*, 46, 355-365.

Franceschini, I., Lomet, D., Cateau, M., Delsol, G., Tillet, Y., Caraty, A. (2006). Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neuroscience Letters*, 401, 225-230.

Gonzalez, R., Poindron, P., Signoret, J.P. (1988) Temporal variation in LH and testosterone responses of rams after the introduction of oestrous females during the breeding season. *Journal of Reproduction and Fertility*, 83, 201-208.

Gonzalez-Stagnaro, C. (1983). Control hormonal del ciclo estral en pequeños rumiantes del área tropical. *Les Coloques de l'INRA, Nouzilly*, 20, 433-471.

Hafez, E.S. (1952). Studies on the breeding season and reproduction of the ewe Part I. The breeding season in different environments Part II. The breeding season in one locality. *The Journal of Agricultural Science*, 42, 189-231.

Karsch, F.J., Bittman, E.L., Foster, D.L., Goodman, R.L., Legan, S.J., Robinson, J.E. (1984). Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Progress in Hormone Research*, 40, 185-232.

Keller, M., Meurisse, M., Lévy, F. (2004). Mapping the neural substrates involved in maternal responsiveness and lamb olfactory memory in parturient ewes using Fos imaging. *Behavioral neuroscience*, 118, 1274-1284.

Lee, J.H., Welch, D.R. (1997). Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Research*, 57, 2384-2387.

Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., Welch, D.R. (1996). KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute*, 88, 1731-1737.

Lehman, M.N., Coolen, L.M., Goodman, R.L. (2010). Minireview: Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 151, 3479–3489.

Lincoln, G., Short, R. (1980). Seasonal breeding: Nature's contraceptive. *Progress in Hormone Research*, 36, 1-52.

Lindsay, D.R. (1991). Reproduction in the sheep and goat. *Reproduction in Domestic Animals*. Academic Press Inc., San Diego, California.

Malpaux, B., Viguié, C., Skinner, D.C., Thiéry, J.C., Chemineau, P. (1997). Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Research Bulletin*, 44, 431-438.

Malpaux, B., Daveau, A., Maurice-Mandon, F., Duarte, G., Chemineau, P. (1998). Evidence That Melatonin Acts in the Premammillary Hypothalamic Area to Control Reproduction in the Ewe: Presence of Binding Sites and Stimulation of Luteinizing Hormone Secretion by in Situ Microimplant Delivery 1. *Endocrinology*, 139, 1508-1516.

Malpaux, B. (2006). Seasonal regulation of reproduction in mammals. *Knobil and Neill's physiology of reproduction. Neill JD,(Ed), Elsevier, UK*, 2231-2281.

Martin, G.B., Tjondronegoro, S., Boukhliq, R., Blackberry, M.A., Briegel, J. R., Blache, D., Fisher J.A., Adams, N.R. (1998). Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male merino and Suffolk sheep: modification of endogenous rhythms by photoperiod. *Reproduction, fertility, and development*, 11, 355-366.

Martin, G.B., Milton, J.T.B., Davidson, R.H., Hunzicker, G.B., Lindsay, D. R., Blache, D. (2004). Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 82, 231-245.

Martínez-Alfaro, J.C., Hernández, H., Flores, J.A., Duarte, G., Fitz-Rodríguez, G., Fernández, I.G., Bedos, M., Chemineau, P., Keller, M., Delgadillo, J.A., Vielma, J. (2014). Importance of intense male sexual behavior

for inducing the preovulatory LH surge and ovulation in seasonally anovulatory female goats. *Theriogenology*, 82, 1028-1035.

Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M.B., Colledge, W.H., Caraty, A., Aparicio, S.A. (2005). Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 1761-1766.

Murata, K., Tamogami, S., Itou, M., Ohkubo, Y., Wakabayashi, Y., Watanabe, H., Okamura, H., Takeuchi, Y., Mori, Y. (2014). Identification of an olfactory signal molecule that activates the central regulator of reproduction in goats. *Current Biology*, 24, 681-686.

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernandez-Fernandez, R., Barreiro, M. L., Roa, J., Sanchez-Criado, J.E., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M. (2004). Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology*, 145, 4565-4574.

Ohkura, S., Takase, K., Matsuyama, S., Mogi, K., Ichimaru, T., Wakabayashi, Y., Uenoyama, Y., Mori, Y., Steiner, R.A., Tsukamura, H., Maeda, K.-I., Okamura, H. (2009). Gonadotrophin - Releasing Hormone Pulse Generator Activity in the Hypothalamus of the Goat. *Journal of Neuroendocrinology*, 21, 813-821.

Ortavant, R., Pelletier, J., Ravault, J. P., Thimonier, J., Volland-Nail, P. (1985). Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm mammals. *Oxford reviews of Reproductive Biology Clarendon Press, Oxford*, 7, 305-345.

Ortavant, R., Mauleon, P., Thibault, C. (1964). Photoperiodic control of gonadal and hypophyseal activity in domestic mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 117, 157-193.

Pelletier, J., Chemineau, P., Delgadillo, J.A. (1988). Seasonality of sexual activity and its photoperiodic control in the adult ram and buck. *Proceedings 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, pp. 211-219.

Pineda, R., Aguilar, E., Pinilla, L., Tena-Sempere, M. (2010). Physiological roles of the kisspeptin/GPR54 system in the neuroendocrine control of reproduction. *Progress in Brain Research*, 181, 55-77.

Poindron, P., Cognie, Y., Gayerie, F., Orgeur, P., Oldham, C.M., Ravault, J.P. (1980). Changes in gonadotrophins and prolactin levels in isolated (seasonally or lactationally) anovular ewes associated with ovulation caused by the introduction of rams. *Physiology and Behavior*, 25, 227-236.

Restall, B.J. (1992). Seasonal variation in reproductive activity in Australian goats. *Animal Reproduction Science*, 27, 305-318.

Rivas-Muñoz, R., Fitz-Rodríguez, G., Poindron, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A. (2007). Stimulation of estrous behavior in grazing female goats by continuous or discontinuous exposure to males. *Journal of Animal Science*, 85, 1257-1263.

Rivera, G.M., Alanis, G.A., Chaves, M.A., Ferrero, S.B., Morello, H.H. (2003). Seasonality of estrus and ovulation in Creole goats of Argentina. *Small Ruminant Research*, 48, 109-117.

Roa, J., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M. (2008). New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29, 48–69.

Sakamoto, K., Wakabayashi, Y., Yamamura, T., Tanaka, T., Takeuchi, Y., Mori, Y., Okamura, H. (2013). A population of kisspeptin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus may be the central target of the male effect phenomenon in goats. *PloS one*, 8, e81017.

Santa Maria, A., Cox, J., Munoz, E., Rodriguez, R., Caldera, L. (1988). Estudio del ciclo sexual, estacionalidad reproductiva y control del estro en la cabra Criolla en Chile. Livestock reproduction in Latin America. In *Proceedings of the Final Research Co-ordination Meeting* (pp. 363-385).

Shelton, M. (1960). The influence of the presence of the male goat on the initiation of oestrous and ovulation in Angora does. *Journal of Animal Science*, 19, 368–375.

Smith, J.T., Coolen, L.M., Kriegsfeld, L.J., Sari, I.P., Jaafarzadehshirazi, M.R., Maltby, M., Bateman, K., Goodman, R.L., Tilbrook, A.J., Ubuka, T., Bentley, G.E., Clarke, I.J., Lehman, M.N. (2008). Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology*, 149, 5770-5782.

Thimonier, J., Mauleon, P. (1969). Variations saisonnières du comportement d'oestrus et des activités ovariennes et hypophysaires chez les Ovins. In *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, 9, 233-250.

Underwood, E.J., Shier, F.L., Davenport, N. (1944). Studies in sheep husbandry in Western Australia. V. The breeding season of Merino crossbred and British breed ewes in the agricultural districts. *Department of Agriculture, Western Australia*, 11, 135–143.

Ungerfeld, R., Forsberg, M., Rubianes, E. (2004). Overview of the response of anoestrous ewes to the ram effect. *Reproduction Fertility and Development*, 16, 479-490.

Valencia, J., Zarco, L., Ducoing, A. (1990). Breeding season of Criollo and Granadina goats under constant nutritional level in the Mexican highlands. In: *Livestock*

Valencia, J., Zarco, L., Ducoing, A., Murcia, C., Navarro, H. (1990). Breeding season of Criollo and Granadina goats under constant nutritional level in the Mexican highlands. In *Livestock reproduction in Latin America*.

Proceedings of the final research co-ordination meeting, Bogota, 19-23 September 1988. Organized by the joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. pp. 321-333.

Vielma, J., Chemineau, P., Poindron, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A. (2009). Male sexual behavior contributes to the maintenance of high LH pulsatility in anestrus female goats. *Hormones and Behavior*, 56, 444-449.

Yenikoye, A. (1984). Variations annuelles du comportement d'oestrus, du taux et des possibilités d'ovulations chez la brebis Peulh du Niger. *Reproduction Nutrition Développement*, 24, 11-19.

Wakabayashi, Y., Nakada, T., Murata, K., Ohkura, S., Mogi, K., Navarro, V.M., Clifton, D.K., Mori, Y., Tsukamura, H., Maeda, K., Steiner, R.A. Okamura, H. (2010). Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *The Journal of Neuroscience*, 30, 3124-3132.

Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Norton, B.W., Scaramuzzi, R.J., Martin, G.B. (1994). Effect of nutrition on seasonal patterns of LH, FSH and testosterone concentration, testicular mass, sebaceous gland volume and odour in Australian cashmere goats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 102, 351-360.

Welento, J., Szteyn, S., Milart, Z. (1969). Observations on the stereotaxic configuration of the hypothalamus nuclei in the sheep, *Anatomischer Anzeiger*. 124, 1–27.

Zarazaga, L.A., Gatica, M.C., Celi, I., Guzmán, J.L., Malpaux, B. (2010). Effect of artificial long days and/or melatonin treatment on the sexual activity of Mediterranean bucks. *Small ruminant research*, 93, 110-118.

Zarco, L., Rodríguez, E.F., Angulo, M.R.B., Valencia, J. (1995). Female to female stimulation of ovarian activity in the ewe. *Animal Reproduction Science*, 39, 251-258.