



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**DESARROLLO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS DEL VENADO
COLA BLANCA DURANTE EL CICLO REPRODUCTIVO PARA EL
USO ÓPTIMO DEL SEMEN**

M. C. PABLO ARENAS BAÉZ

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE:**

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

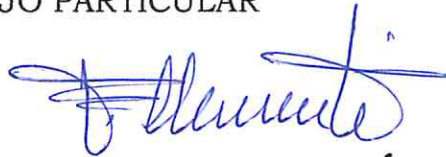
2017

La presente tesis titulada: “**Desarrollo de células espermáticas del venado cola blanca durante el ciclo reproductivo para el uso óptimo del semen**”, realizada por el alumno: **Pablo ARENAS BAÉZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. FERNANDO CLEMENTE SÁNCHEZ

ASESOR:



DR. JAIME GALLEGOS SÁNCHEZ

ASESOR:




DR. CESAR CORTEZ ROMERO

ASESOR:



DR. JUAN SALAZAR ORTIZ

ASESOR:



DR. GUSTAVO RAMÍREZ VALVERDE

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 15 de mayo de 2017

DESARROLLO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS DEL VENADO COLA BLANCA DURANTE EL CICLO REPRODUCTIVO PARA EL USO ÓPTIMO DEL SEMEN

Pablo Arenas Baéz, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

La adquisición de conocimientos científicos sobre especies de fauna silvestre son fundamentales para llevar a cabo la conservación de las mismas y en algunos casos frenar el riesgo de extinción a los que se enfrenta dichas especies. La conservación, el manejo y sobre todo el aprovechamiento sustentable del venado cola blanca ha sido una gran oportunidad para subsanar los riesgos de extinción a los que se ha enfrentado. La información disponible sobre la biología reproductiva de la especie es escasa. En el presente trabajo se realizaron muestreos de semen y tejido testicular mediante cortes histológicos para determinar la época del año en que el venado produce la mejor calidad de semen tomando como base a su fisiología testicular. La evaluación seminal agrupada en dos periodos (invierno y primavera) mostro diferencias ($P < 0.05$) tanto para la variable de respuesta motilidad masal (MM) como para la motilidad progresiva (MP) y la viabilidad espermática (VIA). Además, las motilidades de los espermatozoides estuvieron fuertemente relacionadas con la viabilidad de los mismos ($MM = 0.92$, $MP = 0.89$); es decir; que al comparar las tendencias de la motilidad masal y la viabilidad espermática se observó que al bajar la MM, la capacidad fecundante (VIA) de los espermatozoides también disminuyó. Respecto al proceso de espermatogénesis, éste no fue igual durante los periodos de muestro ya que hubo diferencias ($P < 0.05$) en la presencia de las espermátidas elongadas en los túbulos seminíferos lo cual denota un cambio en el desarrollo celular de las gónadas durante el periodo de muestreo (invierno y primavera). Concluyendo que la calidad del semen, así como el desarrollo celular en los testículos es variable a través del ciclo reproductivo del venado, detectando una fase de dormancia o letargo en el proceso de la espermatogénesis; pero con un número constante de Células de Sertoli en el ciclo anual.

Palabras clave: venado, espermatogénesis, semen, reproducción.

SPERMATIC CELLS DEVELOPMENT OF THE WHITE TAILED DEER DURING THE REPRODUCTIVE CYCLE FOR THE OPTIMAL USE OF SEMEN

Pablo Arenas Baéz, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

Acquiring scientific knowledge of wildlife species is essential in order to conserve them, and in some cases to reduce the risk of extinction. The conservation, management and above all the sustainable use of white-tailed deer has been a great opportunity to compensate the risks of extinction this species has faced. However, available information about the reproductive biology of the species is scarce. In the present study, semen and testicular tissue samples were analyzed through histology slides to determine the season in which the deer produces the best quality of semen considering its testicular physiology as basis. The seminal assessment grouped in two periods (winter and spring) presented differences ($P < 0.05$) in the mass motility (MM) variable as well as in the progressive motility (MP) and sperm viability (VIA). Further, sperm motility was strongly related with sperm viability ($MM = 0.92$, $MP = 0.89$). That is, by comparing the tendencies of mass motility and sperm viability we observed that while dropping MM, the fertility capability (VIA) of the sperms also dropped. In regards to the spermatogenesis process, it was different during the sampling periods since there were differences ($P < 0.05$) in the presence of elongated spermatids in the seminiferous tubules, which indicates a change in the cell development of the gonads during the sampling periods. It was concluded that both the semen quality and the cell development in the testicles varies throughout the deer reproductive cycle, detecting a dormancy or lethargic phase in the spermatogenesis process but with a constant number of Sertoli cells in the annual cycle.

Key words: deer, spermatogenesis, semen, reproduction

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, por permitirme llevar a cabo mis estudios doctorales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el financiamiento otorgado.

Al Dr. Fernando Clemente Sánchez, gracias por sus enseñanzas y por dirigirme en este trabajo de tesis; además de motivarme siempre a hacer correctamente la labor de la investigación. Espero que continúe guiando en la investigación a muchas generaciones más.

Al Dr. Jaime Gallegos Sánchez y al Dr. Cesar Cortez Romero, a quienes considero que son ustedes un ejemplo de sabiduría y humildad, así como grandes expertos en la reproducción en pequeños rumiantes de nuestro país. Gracias por su importante participación y asesoría para la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Juan Salazar Ortiz y al Dr. Gustavo Ramírez Valverde, por su valiosa participación como asesores de este trabajo de investigación.

Al Dr. Humberto Vaquera Huerta, por su interminable paciencia y disponibilidad para asesorarme en la elaboración del trabajo de tesis además de brindarme su sincera amistad.

A mi Esposa...

A mi Hijo...

A mi madre...

A mi familia...

*Por todo el apoyo incondicional que siempre me han
dado durante todo este camino recorrido hacia la
grandeza....*

LOS AMO A TODOS.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1	GENERALIDADES DE LA ESPECIE <i>Odocoileus virginianus</i>	3
2.1.1	Descripción de la especie.....	4
2.1.2	Distribución de la especie	5
2.1.3	Características etológicas	6
2.2	GENERALIDADES ANATÓMICAS Y FISIOLÓGICAS DE LA GÓNADA DEL MACHO	7
2.2.1	Escroto	7
2.2.2	Testículos.....	7
2.2.2.1	Túbulos Seminíferos	9
2.2.2.2	Las células de Sertoli	10
2.2.2.2a	Proliferación y Diferenciación de las células de Sertoli	11
2.2.2.3	La barrera hematotesticular	14
2.2.2.4	Las células germinales y las células mioides peritubulares.....	14
2.2.2.5	El tejido intersticial y las células de Leydig.....	15
2.2.2.6	El espermatozoide y el semen.....	16
2.2.2.6a	El espermatozoide	16
2.2.2.6b	El plasma seminal	16
2.2.2.6c	Proteínas del plasma seminal.....	17
2.3	ESPERMATOGÉNESIS.....	18
2.3.1	Espermatogénesis	18
2.3.2	Espermatocitogénesis	20
2.3.3	Meiosis I y II.....	20
2.3.4	Espermiogénesis.....	21
2.4	LA COMUNICACIÓN DE LAS CÉLULAS TESTICULARES Y LA REGULACIÓN DEL AMBIENTE INTRATUBULAR.....	22
2.4.1	La importancia de las células de Sertoli en la comunicación intercelular	23
2.4.2	La comunicación celular en el intersticio	24
2.5	REGULACIÓN HORMONAL DE LA ESPERMATOGÉNESIS	25
2.5.1	Mecanismo de acción de las gonadotropinas	26
2.5.2	La acción hormonal en el testículo	27
2.5.3	Transporte de testosterona en plasma	28
2.6	COLECTA Y EVALUACIÓN SEMINAL.....	29
2.6.1	Valoración del semen.....	30

2.7	EL FOTOPERIODO EN EL MACHO	31
2.7.1	El sistema del reloj circadiano	34
2.7.2	El efecto del fotoperiodo en las gonadotropinas y hormonas esteroides	35
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	38
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
4.1	Localización del área de estudio	40
4.2	Adquisición de venados y su manejo	40
4.3	Colecta de semen.....	41
4.4	Evaluación del semen	42
4.5	Gonadectomía, tratamiento quirúrgico y posquirúrgico.....	43
4.6	Preparación del tejido testicular	43
4.7	Procedimiento para la toma de fotografías histológicas	47
4.8	Análisis estadístico.....	48
V.	RESULTADOS	50
5.1	Evaluación seminal.....	50
5.2	Desarrollo Celular en testículo	51
VI.	DISCUSIÓN	57
VII.	CONCLUSIONES	60
VIII.	LITERATURA CITADA	61
IX.	ANEXOS.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de las diferentes capas o tunicas que integran al testículo	9
Figura 2	Esquema que muestra la disposición del tejido testicular	11
Figura 3	Esquema del proceso de espermatogénesis	19
Figura 4	Diagrama de la disposición de coordenadas en el corte histológico	48
Figura 5	Formaciones celulares en la espermatogénesis	52
Figura 6	Corte de túbulos en periodo reproductivo	53
Figura 7	Corte de túbulos en periodo no reproductivo	54
Figura 8	Células de Sertoli en un corte del túbulo seminífero	56

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1	Ingredientes del alimento comercial Trophy Maker 18	41
Cuadro 2	Prueba de medias para variables evaluadas en semen	51

LISTA DE GRAFICAS

Grafica 1	Motilidad Masal de espermatozoides	50
Grafica 2	Viabilidad espermática	51
Grafica 3	Relación entre la proporción de túbulos con la presencia de EE y el área de los mismos	55

I. INTRODUCCIÓN

La importancia del venado cola blanca en México es irrefutable como alimento para consumo directo a través de la cacería de subsistencia, la cacería deportiva y usos artesanales. La importancia de la cacería de subsistencia principalmente en el sur de México ha sido documentada, indicando que el mayor volumen de carne de monte cosechada en la región de Calakmul, Campeche, corresponde al venado cola blanca. El uso del venado cola blanca en ceremonias religiosas por las culturas indígenas ha sido documentado por diferentes autores (**Montiel et al., 2000; Gonzáles y Briones, 2000; Naranjo et al., 2004**). Uno de los 20 días del Calendario Azteca o Piedra del Sol estaba dedicado al venado lo que revela que fue venerado desde tiempos prehispánicos.

En el norte de México el valor económico de la fauna silvestre y principalmente el venado cola blanca, ha cobrado importancia desde los noventas debido a sus valor como trofeo en la cacería deportiva, de tal manera que los productores se vieron en la necesidad de establecer compromisos para mejorar el manejo del hábitat para venado cola blanca o venado bura y la producción de forraje para el ganado doméstico que continúa representando un componente importante del ingreso de los propietarios de los ranchos. El valor económico del venado cola blanca en el norte de México ha facilitado la recuperación de las poblaciones y el establecimiento de acciones de conservación, manejo y aprovechamiento sustentable, considerando que en la década de 1960 el venado cola blanca estuvo al borde de la extinción (**Villarreal, 1999**). Actualmente, las densidades reportadas por diferentes autores varían de 4.3 a 25 venados/km² en los estados de Tamaulipas, Nuevo León y Coahuila (**Ortega et al., 2011**).

La rentabilidad por el turismo cinegético ha motivado a los dueños de las tierras a implementar técnicas que mejoren la calidad de los servicios mediante el

mejoramiento y conservación de la fauna silvestre. Tal es el caso del mejoramiento genético del venado cola blanca, a través de la introducción de sementales sobresalientes y la aplicación de técnicas de reproducción asistida como la inseminación artificial, conservación de semen fresco y su criopreservación.

En virtud de que el macho proporciona la mitad del patrimonio genético de su descendencia (**Daza, 1997**), es fundamental verificar la calidad del semen y para garantizar el éxito reproductivo y la transferencia de sus características genéticas a las siguientes generaciones. Por ello, para recomendar programas de reproducción asistida, es importante conocer la mejor época del año para producir semen de calidad y desarrollar tecnología dirigida a su criopreservación. Por tal motivo, el objetivo de la presente investigación fue determinar la época del año en que el venado produce la mejor calidad de semen estudiando su fisiología testicular.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES DE LA ESPECIE *Odocoileus virginianus*

La familia Cervidae, a la que pertenece el venado cola blanca, se originó en Asia, desplazándose a través del tiempo en Europa y gradualmente hasta el Continente Americano. Los venados del género *Odocoileus* son los colonizadores más antiguos de América (**Medina, 1990**) siguiendo otros cérvidos como el wapití (*Cervus elaphus*; Linneaus, 1758), el alce (Ales alces; Linneaus, 1758) y el caribú (*Rengifer tarandus*; Rafinesque, 1832).

De acuerdo a Geist (**1994**) hace aproximadamente 11,000 años se sucedió una extinción masiva de los grandes mamíferos de esa época, en la cual el ciervo de montaña (*Moschus sp*; Linneaus, 1758) y el ciervo de pantano (*Hydropotes inermes*; Swinhoe, 1870) desaparecieron, mientras que los venados cola blanca y los cola negra (*Odocoileus hemionus columbianus*; Richardson, 1829) lograron sobrevivir, de igual manera que sus parientes distantes el berrendo (*Antilocapra americana*; Ord, 1815) y el pecarí (*Pecari tajacu*; Linneaus, 1758). Se puede atribuir la sobrevivencia del venado cola blanca a su condición de especie generalista, es decir, distribuida ampliamente en una extensa gama de ecosistemas y adaptada a consumo de una gran variedad de especies vegetales. Así, cuando el clima y la vegetación cambiaron, los ciervos de la época simplemente cambiaron su dieta adaptándose a los nuevos ecosistemas (**Geist, 1994; Medina, 1990**).

Debido a la vocación natural de sus tierras, el noreste de México (Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas), ha sido una región eminentemente ganadera. De hecho, durante siglos, los ecosistemas de matorral de esta región han sido utilizados para la crianza y producción ganadera, donde destaca la producción extensiva de bovinos de carne, lo que ha generado un impacto ecológico significativo, afectando el desarrollo económico de esta región. Esta situación fue

el motivo fundamental que impulsó la creación de la ganadería diversificada en todo el país, donde el aprovechamiento del venado es de suma importancia para los propietarios de ranchos en el noroeste de México.

2.1.1 Descripción de la especie

El venado cola blanca es probablemente la especie más antigua en el continente americano la cual está muy relacionada con otras especies de cérvidos norteamericanos como el alce (*Alces alces*), el wapití (*Cervus canadensis*) y el caribú (*Rangifer tarandus*), (**Halls, 1984; Villarreal, 1999; Demarais, et al., 2000**). Actualmente, en México se distribuyen cuatro especies nativas de cérvidos, el Venado bura (*O. hemionus*), el venado Tamazate rojo (*Mazama temama*), el venado Tamazate negro (*M. gouazoubira*) y el venado cola blanca (**Halls, 1984; Villa y Cervantes, 2003**).

El venado cola blanca es de talla mediana, cuya altura a los hombros varía entre 0.65 y 1.10 m dependiendo de la subespecie. Las más grandes son las del norte del país, disminuyendo el tamaño hacia latitudes más al sur (**Roa, 1986**). Los machos son más grandes que las hembras. En los machos la longitud total varía de 1.3 a 1.8 m, con un peso corporal de 36 a 70 kg y de 22 a 45 kg en las hembras, la cual depende de la estación y la disponibilidad de alimento (**Smith, 1991**).

El macho es sexualmente maduro al año de edad, pero generalmente en poblaciones estables ni los machos ni las hembras se aparean antes de los dos años. La hembra es estacionalmente poliéstrica con una duración de su ciclo de 21 días aproximadamente y un estro de 18-24 horas (**Drew y Amass, 2004**). La gestación dura entre 195 y 212 días. Las hembras generalmente paren 1 cría en su primer parto, 2 de manera subsecuente, en ocasiones 3 y muy rara vez 4. Generalmente los venados cola blanca viven 10 años en vida libre, pero se estima que en cautiverio pueden vivir hasta 20 años (**Álvarez, 2005**).

Los venados cola blanca pueden correr hasta 64 km h^{-1} y son buenos nadadores. Se distribuyen en una gran variedad de ecosistemas, pero prefieren áreas boscosas para refugiarse, aunque no muy densamente arboladas. Los ecosistemas en donde al venado cola blanca se le encuentra son los bosques templados y tropicales, pastizales templados, chaparrales, semidesiertos, bosque tropical caducifolio y matorral. Su alimentación consiste de hierbas, pastos, hongos, nueces, líquenes y ramonean las ramas tiernas de arbustos. Generalmente no forma grupos grandes y la unidad social básica se compone por una hembra adulta, su hija (o) y las dos crías de la temporada reciente. La reproducción ocurre en períodos específicos que suelen ser de 3 meses a partir de la disminución de horas luz, sin embargo, puede ocurrir a lo largo de todo el año en latitudes cercanas al Ecuador (**Álvarez, 2005**).

2.1.2 Distribución de la especie

El venado cola blanca se distribuye desde el sur de Canadá hasta el norte de Chile y Bolivia, área en donde se han registrado 38 subespecies. De estas 38 especies, en México se distribuyen 14 especies (*Odocoileus virginianus acapulcensis*, *O. v. carminis*, *O. v. couesi*, *O. v. mexicanus*, *O. v. miquihuanensis*, *O. v. nelsoni*, *O. v. oaxacensis*, *O. v. sinaloae*, *O. v. texanus*, *O. v. thomasi*, *O. v. toltecus*, *O. v. truei*, *O. v. vereacrusis* y *O. v. yucatanensis*) con variaciones en talla corporal, forma de astas, largo de puntas, y color del pelaje (**William, 1986**).

Medina (**1990**) señaló que a través de los siglos muchas de las poblaciones de venado cola blanca se adaptaron a los ambientes que actualmente ocupan, otras fueron aisladas por cataclismos o por barreras geográficas. Esto ocasionó que muchas quedaran aisladas genéticamente y se modificaran evolutivamente en las diversas y actuales subespecies, las cuales se distinguen, por rasgos drásticos en su talla, peso corporal, conformación de astas y coloración. Smith (**1991**) indica que las subespecies con tamaños corporales más grandes ocurren

a mayores latitudes o en zonas elevadas, mientras que las subespecies de menor tamaño ocurren en latitudes cercanas al ecuador o en zonas de menor altitud.

2.1.3 Características etológicas

El venado cola blanca presenta un patrón de actividad marcado durante las primeras horas del día y durante el crepúsculo, sin embargo gran parte de su actividad está determinada por el sexo, edad, época reproductiva, presencia de depredadores, disponibilidad de recursos y actividades humanas (**Galindo-Leal y Weber, 1998**).

Su área de actividad es muy variable; sin embargo, se ha podido identificar que en Arizona, el promedio del tamaño de las áreas que ocupan las hebras *O. v. couesi* es de 5.18 km² (518 ha), y de 10.57 km² (1,057 ha) para los machos, mientras que su zona núcleo es de 1.89 km² (189 ha) y 4.47 km² (447 ha), respectivamente. El área de actividad puede variar de acuerdo con la subespecie y la disponibilidad y calidad del hábitat.

El grupo familiar generalmente se conforma por la hembra y sus crías de la misma camada, mientras que los machos adultos durante la época no reproductiva se segregan en grupos que incluyen también a machos juveniles. Durante la época reproductiva los machos adultos se asocian temporalmente con hembras adultas para el apareamiento (**Galindo-Leal y Weber, 1998**). Las asociaciones con un número alto de individuos son poco frecuentes.

El venado cola blanca es una especie que presenta “territorialidad”, es decir, los machos adultos defienden su territorio de otros machos marcándolo mediante el tallado de sus astas contra árboles y arbustos y a través de marcas olfativas mediante la orina y glándulas interdigitales (**Galindo-Leal y Weber, 1998**), esto parece ser exclusivo para la época reproductiva.

2. 2 GENERALIDADES ANATÓMICAS Y FISIOLÓGICAS DE LA GÓNADA DEL MACHO

A grandes rasgos, las gónadas del macho, tienen como función principal, la producción de espermatozoides. Están anatómicamente suspendidos en el saco escrotal y están constituidos por un sistema de conductos, que incluye a los túbulos rectos, red testicular, conductos eferente y deferente, conducto epididimario y conducto eyaculador. Fuera de las gónadas, están las glándulas sexuales accesorias, que están conformadas por las vesículas seminales, próstata y las glándulas bulbouretrales (**Lesson y Páparo *et al.*, 1990**).

2.2.1 Escroto

El escroto o saco escrotal, es una estructura péndula, en forma de saco en donde se encuentran los testículos, la parte distal de los conductos deferentes y los cordones espermáticos. Éste tiene como función, regular la temperatura testicular, que en ovinos varía desde 4 a 7° C por debajo de la temperatura corporal, variación necesaria para llevar a cabo la espermatogénesis. Además, también contiene a los conductos deferentes y el haz neurovascular, que inerva e irriga a cada testículo (**Durán-Ramírez *et al.*, 2008**).

2.2.2 Testículos

Los testículos tienen dos funciones principales: la síntesis de hormonas (esteroidogénesis) y la producción de gametos maduros (espermatogénesis); ambas funciones, están estrechamente relacionadas ya que la producción de espermatozoides depende de la producción de andrógenos (**Durán Ramírez *et al.*, 2008**).

Además, se caracterizan por ser estructuras muy vascularizadas, conformados por arterias testiculares, que son ramas directas de la aorta abdominal, es por

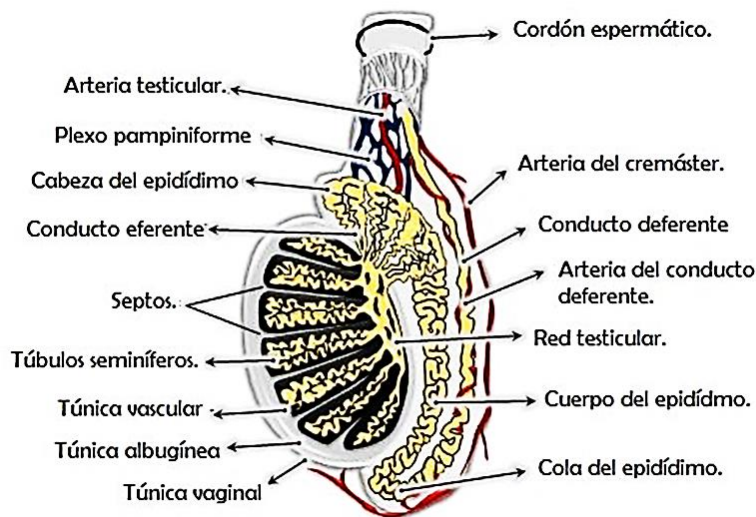
ello que la circulación se da a través del plexo venoso pampiniforme y pasa a la vena cava por la derecha y hacia la vena renal por la izquierda. La circulación linfática transcurre junto a las arterias y hasta los ganglios paraórticos (**Lesson et al., 1990; Figura 1**).

Los testículos, están rodeados por la cápsula testicular, que actúa como una membrana capaz de efectuar contracciones periódicas, esto sirve para conservar una presión sanguínea adecuada dentro de los testículos, regular el movimiento afuera de los capilares y al sistema de conductos, ayudando al desplazamiento de los espermatozoides hacia afuera (**Lesson et al., 1990**).

La cápsula testicular, está formada por tres capas (Figura 1):

1. La capa externa o túnica vaginal.
2. La capa media o túnica albugínea.
3. La capa interna o túnica vascular.

El tejido testicular, está compuesto por túbulos seminíferos, donde se encuentran las células de Sertoli, mioides-peritubulares y germinales, y tejido intersticial, conformado por vasos sanguíneos, linfáticos y las células de Leydig.



*Figura 1: Esquema que muestra las diferentes capas o túnicas (capa externa o túnica vaginal, capa media o túnica albugínea y la capa interna o túnica vascular) que integran al testículo, así como su vascularización. Se pueden observar las arterias testiculares, que son ramas directas de la aorta abdominal, el plexo venoso pampiniforme, donde se produce la circulación venosa y desde allí, la circulación se dirige hacia la vena cava por la derecha y hacia la vena renal por la izquierda. La circulación linfática transcurre junto a las arterias y hasta los ganglios paraórticos (tomado de **Arellano-Lezama et al., 2015**)*

2.2.2.1 Túbulos Seminíferos

En el interior de los túbulos seminíferos, se lleva a cabo, el proceso de espermatogénesis. Cada túbulo seminífero está contorneado y se encuentran revestidos por un epitelio germinal o seminífero, de tipo cúbico estratificado y rodeados de una delgada lámina basal.

Los túbulos seminíferos están compuestos, principalmente, de tres tipos de células. Las células mioides o peritubulares, las células de Sertoli y las células germinales. Estas células se encuentran divididas en dos tipos de compartimientos en el interior del túbulo seminífero, el compartimiento basal y el compartimiento adluminal. El compartimiento basal, se extiende entre las uniones y la lámina basal, de esta forma, permite un intercambio de sustancias nutritivas y otros materiales entre los vasos intersticiales y las células germinales

que se encuentran en él y el compartimiento adluminal, que se encuentra entre las uniones y la luz del túbulo seminífero, está aislado de este intercambio directo, así como las células que lo conforman; este compartimiento tiene células germinales más diferenciadas de las que hay en el compartimiento basal, pero ambos dependen de las células de Sertoli para disponer de nutrientes y otras sustancias (**Lesson y Páparo et al., 1990**).

2.2.2.2 Las células de Sertoli

Las células de sostén, somáticas o de Sertoli se encuentran de manera espaciada en el interior del túbulo seminífero, dispuestas a intervalos bastante regulares. Son células muy grandes y sus bases están sobre la lámina basal del túbulo. En la región cercana al lumen de la célula, se encuentran las cabezas de los espermatozoides en proceso de maduración, ubicadas en depresiones de su citoplasma. El núcleo de estas células se distingue con facilidad de las células germinales que comparten el espacio tubular. El sitio en donde se juntan dos células de Sertoli forma una unión estrecha con la fusión de membranas, que junto con el tejido peritubular, constituyen la barrera hematotesticular (**Lesson y Paparo et al., 1990**).

Las células de Sertoli son multifuncionales e indispensables para el proceso de espermatogénesis, algunas de las funciones es que 1) contienen receptores para FSH; 2) sintetizan una proteína que se une a andrógenos (Androgen Binding Protein o ABP), la cual mantiene una concentración elevada de testosterona en el interior de los túbulos seminíferos; 3) constituye la barrera entre la sangre y los testículos (hematotesticular); 4) crean un entorno para la diferenciación de las células espermáticas; 5) facilitan la liberación de espermatozoides durante la espermiación y 6) degradan el citoplasma residual que se desecha durante la espermiogénesis. Además, aportan el apoyo físico y los nutrientes necesarios para el desarrollo de las células germinales (**Russell, 1980; Ritzen, Hansson y French, 1981; Márquez-Orozco, 1997**) (Figura 2).

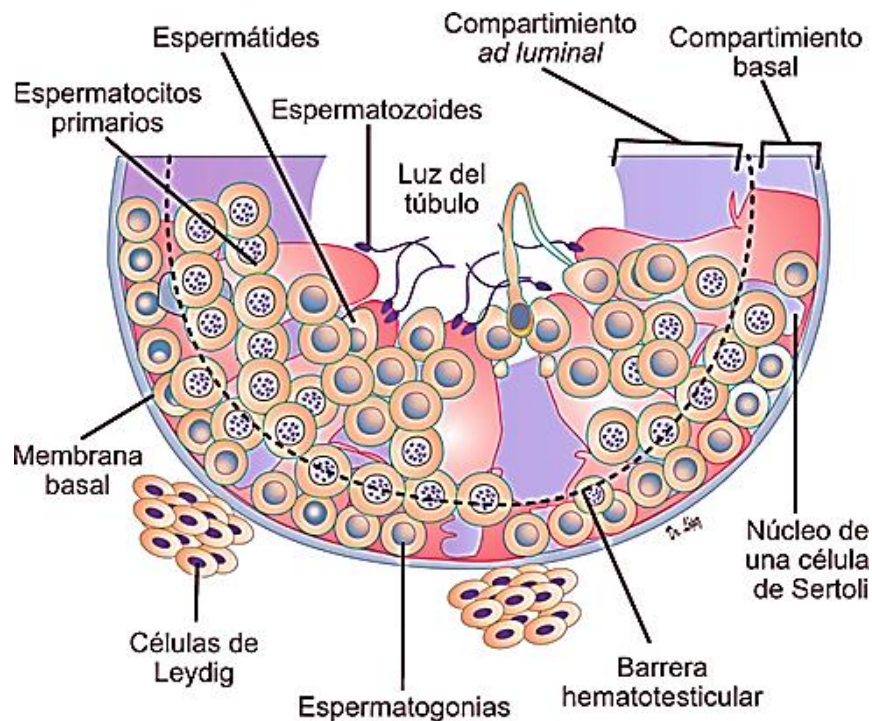


Figura 2: Esquema que muestra la disposición del tejido testicular. Tomada y modificada de internet: <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1476§ionid=95222997>

2.2.2.2a Proliferación y Diferenciación de las células de Sertoli

Durante etapas embrionarias tempranas, uno de los eventos que más influyen en el desarrollo de la cresta genital del macho, es el surgimiento de las células de Sertoli. Estas células, se consideran un componente estructural primario para la formación del epitelio seminífero del testículo (**Sharpe et al., 2003**). Durante el desarrollo embrionario de la gónada, diversos genes están involucrados, para controlar la determinación de la cresta XY, como el gen de la región determinante del sexo SRY (por sus siglas en inglés), que inicia una serie de eventos secuenciados que determinan el desarrollo del testículo embrionario, además, la transcripción de SRY en las células pre- Sertoli regulan la alta expresión de otro gen importante el SOX9, que secreta la hormona anti-Mülleriana (AMH; **Mackay, 2000; Josso et al., 2001**).

Después de la activación del SOX9, las células de Sertoli, continúan proliferando

y forman fuertes contactos alrededor de los agrupamientos de células germinales, para posteriormente comenzar a agregar grupos de células germinales, comenzando con ello la formación de cordones durante las etapas fetales. En ese momento, los cordones se encuentran conformados por epitelio seminífero, separado del tejido peritubular que lo rodea por una membrana basal y el tejido intersticial.

Por su parte, la FSH desencadena la división y proliferación durante la etapa fetal/posnatal de células de Sertoli e incrementa la expresión de receptores de andrógenos de manera progresiva, este efecto incrementa los efectos de T3, el cual conduce a la maduración funcional de las células de Sertoli y a la pérdida de la expresión de AMH (**Herrera-Alarcón *et al.*, 2007**).

En general, las células de Sertoli experimentan cambios importantes durante dos periodos de vida, en la vida fetal o neonatal y en el periodo peripuberal en todas las especies. Las funciones de la célula de Sertoli, que se expresan en la vida peripuberal-adulta para regular la espermatogénesis no se presentan durante la vida fetal, ya que las células de Sertoli inmaduras se dividen mitóticamente y proliferan, y el número total que abarcan en el túbulo seminífero es determinado antes de la edad adulta (**Sharpe *et al.*, 2003**).

Posteriormente, el cambio que experimentan estas estructuras, es decir, su maduración, desde etapas fetales a adultas, ocurre durante la pubertad, a este proceso se le llama maduración funcional o diferenciación. Durante este periodo, el número de células de Sertoli establecido, determina la talla testicular final y el número de espermatozoides producidos en animales sexualmente maduros (**Sharpe *et al.*, 2003**).

Los factores que determinan el número de células de Sertoli son principalmente genéticos y hormonales, en particular la FSH, las hormonas tiroideas, pero también la hormona del crecimiento (HG) y varios factores de crecimiento

paracrino IGF-1 (**Sharpe, 1994, 1999**).

Durante la pubertad, las células de Sertoli experimentan un cambio radical en su morfología y función, ya que pasan, desde un estado proliferativo inmaduro, a un estado no proliferativo maduro pero en el que hay diferenciación celular. Los núcleos se alargan, llegando a ser tripartitas y los nucléolos llegan a ser más prominentes. Las células de Sertoli adyacentes comienzan a formar uniones estrechas para crear un compartimiento adluminal único en el cual las etapas meióticas y post-meióticas de la espermatogénesis se llevan a cabo; en esta etapa comienza a formarse un lumen lleno de fluido y como resultado de esto, comienzan a surgir y desarrollarse las células germinales en el compartimiento adluminal, además, tienen acceso directo a muchos nutrientes, ya que llegan a ser dependientes de la secreción de cada factor que secreta la célula de Sertoli (**Sharpe et al., 2003**). Durante las etapas peripuberales, la FSH permite la maduración final de las células de Sertoli, además de incrementar la secreción de proteínas como la proteína que se une a andrógenos ABP (por sus siglas en inglés) (**González et al., 1988**).

La expresión de densas poblaciones de receptores de andrógenos se presenta durante etapas peripuberales, ya que las concentraciones elevadas de FSH y testosterona, coinciden con la expresión de receptores de andrógenos en las células de Sertoli, que permiten su maduración final (**Sharpe et al., 2003**).

Además, las hormonas tiroideas desempeñan una función importante para la diferenciación de las células de Sertoli, ya que durante la etapa fetal y posnatal, existe un incremento en las concentraciones de T3 (**Jannini et al., 1995**). Durante la etapa peripuberal, la T3 interactúa con andrógenos y tal vez con FSH, para la maduración final de las células de Sertoli, ejemplo de ello, son algunos experimentos in vitro, utilizando ratas, en las que se demuestra que la FSH y T3 inducen la expresión del receptor de andrógenos en células de Sertoli inmaduras (**Arambepola et al., 1998a**) y reprimen la expresión de AMH (**Arambepola et**

al., 1998b), por tanto, la FSH y la T3 tienen efectos aditivos, de hecho, se ha demostrado en humanos y primates, que la ausencia o bajas poblaciones de T3 en la célula de Sertoli, previene la inducción de receptores de andrógenos (**Jannini et al., 2000**).

2.2.2.3 La barrera hematotesticular

Un importante mecanismo en el testículo, es la regulación de las sustancias que entran al interior de los túbulos seminíferos, este evento se da a través de la barrera hematotesticular, que como se había mencionado, se forma por las uniones estrechas entre células de Sertoli. La barrera hematotesticular, es necesaria para prevenir que el sistema inmunológico destruya las células espermáticas que se encuentran en el proceso de maduración, ya que son antigénicamente diferentes del resto del organismo. Esta barrera consta de una lámina entrecruzada compuesta principalmente por los citoplasmas de las células de Sertoli, los cuales se adhieren entre sí por uniones estrechas, en tanto que al exterior de la barrera hay espermatogonias y espermatocitos que apenas inician la meiosis I y que también controlan el ambiente intratubular (**Tähkä, 1989; Sylvester y Griswold, 1993**).

Además, la barrera hematotesticular divide al túbulo seminífero en dos compartimientos, el basal y el adluminal. Esto sucede durante la etapa de preleptoteno, en la meiosis I donde los espermatocitos pasan a través de la barrera hematotesticular y se mueven desde la membrana basal al compartimiento adluminal (**Setchell, 1978; Waites y Gladwell, 1982**).

2.2.2.4 Las células germinales y las células mioides peritubulares

La población de células germinales, está organizada en estratos o niveles. En el estrato basal, se encuentran las espermatogonias, y en el adluminal se

encuentran espermatoцитos I y II, y espermátidas en diferenciación. Es precisamente por esta disposición que se caracterizan por experimentar una diferenciación progresiva desde la región basal del túbulo hacia el lumen o luz, en la que su ploidía se modifica, ya que de ser células diploides, se convierten en haploides, por los diferentes procesos de división celular que experimentan. Por ello, las células germinales haploides dan lugar a los espermatozoides que se desprenden del túbulo seminífero para quedar libres en el lumen y desplazarse hacia el epidídimo.

Por otra parte, las células mioideas que se encuentran en la periferia del túbulo seminífero, debido a las contracciones que presentan, pueden modificar el diámetro de éste y ayudar al desplazamiento de los espermatozoides a lo largo de él. Estas células presentan uniones entre células vecinas que retardan, pero no evitan por completo el paso de macromoléculas del espacio intersticial al epitelio seminífero, además presentan receptores androgénicos (**Lesson et al., 1990**).

2.2.2.5 El tejido intersticial y las células de Leydig

El espacio o tejido intersticial, se encuentra situado entre los túbulos seminíferos y está formado por algunas fibras de colágeno, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios, las células de Leydig o intersticiales, fibroblastos, macrófagos, y algunas células mesenquimatosas indiferenciadas. Este tejido se caracteriza por tener una gran vascularización que durante la irrigación del tejido intersticial, los vasos sanguíneos y linfáticos y los nervios entran y salen por el mediastino, formando redes alrededor de los túbulos, esto es importante para las células de Leydig, que son células poliédricas grandes cuyo núcleo contiene gránulos gruesos de cromatina y un nucléolo bien marcado, estas células son muy importantes, ya que son las responsables de la producción de andrógenos, principalmente testosterona.

Aunque existe regulación hormonal local de andrógenos dentro de los testículos, la mayor parte de estas hormonas se vierten a la circulación general, a través de los vasos sanguíneos; es por ello que los andrógenos son promotores del crecimiento, produciendo la conformación característica del cuerpo del macho, estimulan sus características sexuales secundarias, regulan el sistema nervioso central y la espermatogénesis (**Durán-Ramírez et al., 2008**).

2.2.2.6 El espermatozoide y el semen

2.2.2.6a El espermatozoide

El espermatozoide es una célula altamente especializada que está formada por dos partes principales: cabeza y cola o flagelo. La parte anterior de la cabeza está envuelta por el acrosoma, que porta las enzimas necesarias para el proceso de fertilización.

La cola o flagelo del espermatozoide es la región locomotora de la célula y aporta la fuerza móvil necesaria para que se traslade hasta la superficie del ovocito, este está compuesto por cuatro segmentos, la pieza de conexión (cuello), la pieza media, la pieza principal y la pieza final con estructuras que lo integran como los paquetes mitocondriales, y los paquetes fibrosos. Debido a esto, su movimiento es responsable de la propulsión en el medio fluido, ya que el flagelo, genera remolinos que van desde la pieza principal, hasta la pieza final.

2.2.2.6b El plasma seminal

El plasma seminal, es una mezcla de líquidos secretados por la próstata, epidídimo, conductos deferentes y otras glándulas accesorias. Está constituido por espermatozoides suspendidos en un medio fluido y tiene como función principal regular la función química del eyaculado. Su pH puede variar de acuerdo a la especie, (6.8 a 7), pero se caracteriza por ser ligeramente ácido en

toros y carneros, en estos últimos, su consistencia es opaca y de color blanco o cremoso debido a su alta concentración de espermatozoides.

El principal componente del plasma seminal es el agua (75 %), aunque también aparecen sustancias orgánicas e inorgánicas que sirven de protectores y nutrientes, además de ser un líquido de tipo isotónico y neutro (**Durán-Ramírez et al., 2008**).

La composición química de las secreciones de las glándulas sexuales accesorias varía entre especies, entre machos de la misma especie y entre eyaculados del mismo macho, estas variaciones se deben principalmente a factores ambientales como la nutrición, el manejo, los métodos de obtención, la acción de las enzimas presentes en el plasma seminal y la actividad metabólica de los espermatozoides suspendidos en el plasma seminal (**Kilian et al., 1993; Aurich et al., 1996**).

En general, el plasma seminal tiene tres funciones principales. Primero, actúa como vehículo para los espermatozoides transportándolos desde el sistema reproductor del macho durante la eyaculación. Segundo, sirve de activador para los espermatozoides, y tercero, proporciona un medio rico en nutrientes, que ayuda a mantener su supervivencia después de ser depositados en el aparato genital de la hembra (**Durán-Ramírez et al., 2008**).

2.2.2.6c Proteínas del plasma seminal

Las proteínas que contiene el plasma seminal, son producto principalmente de la secreción de las vesículas seminales y del epidídimo (**Chandonnet et al., 1990**) y su función durante la maduración del espermatozoide y la eyaculación es muy importante ya que mantienen y regulan diversos procesos, como la estabilidad del plasma seminal (**Desnoyers y Manjunath, 1992**), la movilidad (**Henricks et al., 1998; Sánchez-Luengo et al., 2004**), la capacitación (**Therien et al., 1998**), la interacción espermatozoide-ovocito para la fertilización

(**Yanagimachi, 1994**), donde influyen en el proceso de fusión del espermatozoide con el ovocito (**El-Hajj Gahoui et al., 2007**), promueven la fagocitosis de los cuerpos residuales durante la espermiación, y regulan el transporte del espermatozoide a través del epidídimo (**Dacheux et al., 2003**). Es tanta su importancia, que existe una relación entre el plasma seminal y el contenido de proteína total; sin embargo, la cantidad de proteínas, varía entre especies y por efecto de algunos factores ambientales, como la estacionalidad reproductiva, la temperatura, la nutrición y el estrés (**Pérez-Pé et al., 2001**).

2.3 ESPERMATOGÉNESIS

2.3.1 Espermatogénesis

La gametogénesis se divide en cuatro fases: 1) el origen de las células germinales y su migración a las gónadas; 2) la multiplicación de las células germinales a través del proceso de mitosis; 3) la reducción del número de cromosomas a través de la meiosis y 4) las etapas finales de maduración y diferenciación de los gametos en espermatozoides con capacidad fecundante.

En el macho, la transformación de las células germinales primordiales mitóticamente activas a espermatozoides maduros recibe el nombre de espermatogénesis, proceso que implica una extensa serie de transformaciones estructurales de las células. En este evento, son aproximadamente 10 diferentes tipos de células las que se producen y participan de diferente manera en los túbulos seminíferos (**Márquez-Orozco, 1997**).

La espermatogénesis, integra diversos eventos, como la espermatocitogénesis, la meiosis I y II y la espermiogénesis. Las primeras etapas de la espermatogénesis se llevan a cabo en la periferia del túbulo (el compartimiento basal), y las etapas posteriores se realizan cerca de la luz en el compartimiento adluminal (**Krester et al., 1998**) (Figura 3).

Para que se inicie la espermatogénesis, las células de Sertoli deben producir un polipéptido mitogénico, el cual desencadena la multiplicación de los diferentes tipos de espermatogonias, también existe una gran cantidad de factores de crecimiento que están involucrados en los mecanismos de control local que influyen la replicación de las células madre por mitosis y las dos divisiones meióticas (**Krester et al., 1998**). A grandes rasgos, el proceso de espermatogénesis, puede dividirse en tres etapas (**Krester y Kerr, 1994**). 1) la multiplicación de espermatogonias por el proceso de mitosis; 2) la meiosis, que reduce el número de cromosomas de una célula diploide a una haploide, lo que comienza con la entrada de espermatogonias tipo B en la profase de la primera división meiótica, a las que se les llama espermatocitos primarios, que se dividen para formar espermatocitos secundarios en la segunda división meiótica, dando lugar a las espermatidas redondas; y 3) la culminación con la transformación que experimenta la espermatida redonda en el espermatozoide, a través del proceso conocido como espermiogénesis.

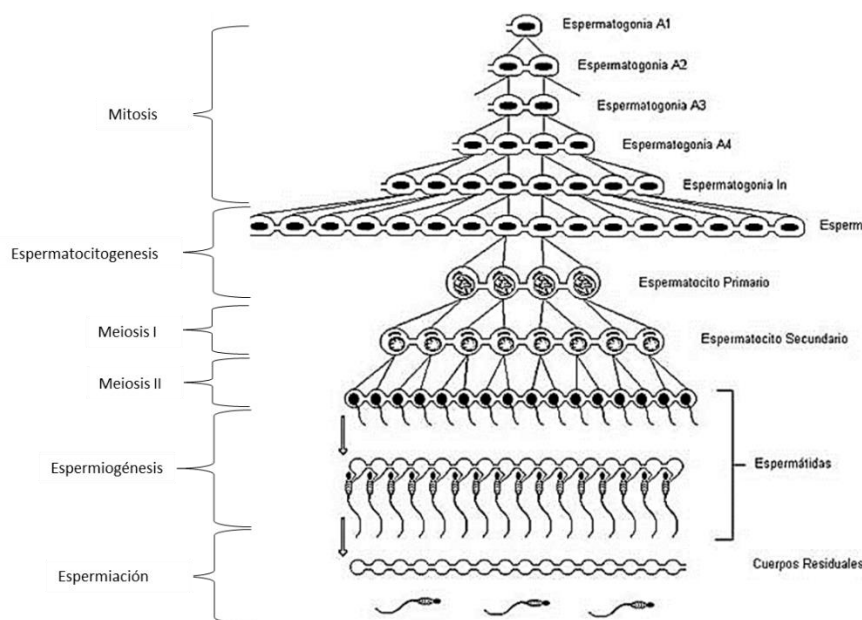


Figura 3. Esquema que muestra el proceso de Espermatogénesis (Espermatocitogénesis, Meiosis I y II y Espermiogénesis). Esquema tomado de Internet: www.histologia.uchile.cl

Por otro lado, la regulación y comunicación hormonal de la espermatogénesis ocurre de dos maneras (**de Krester y Kerr, 1994; de Krester et al., 1998**). 1) de tipo endócrino, que involucra la regulación hormonal del SNC y la gónada, y 2) de tipo parácrino/Autócrino, que involucra la comunicación celular y la regulación hormonal entre las células testiculares que integran la gónada.

2.3.2 Espermatocitogénesis

En la espermatocitogénesis, existen diversos tipos de espermatogonias que se dividen a través del proceso de mitosis, el tipo A representa la población de células madre, que a su vez, se dividen en un grupo de células no cíclicas (Ad) que son células de reserva a largo plazo, algunas de estas se transforman en células mitóticamente activas (Ap). Las tipo A1 forman primero dos espermatogonias A2 o espermatogonias claras, estas células, por mitosis dan origen sucesivamente a las espermatogonias A3, las A4, y las I o Intermedias. Las tipo I, al dividirse forman las espermatogonias tipo B, que son las últimas que se multiplican por mitosis, y son las precursoras de los espermátocitos primarios, por lo tanto, se experimentan 6 divisiones mitóticas (Figura 3).

Tan pronto comienzan las divisiones mitóticas de las espermatogonias tipo A, las células hijas se conectan entre sí mediante puentes intercelulares de citoplasma, también llamados sincitios, que son resultado de una citocinesis (división celular) incompleta; estas estructuras, facilitan la comunicación y división sincrónica, hasta que son espermátidas (Figura 3; **Hyttel, 2010**).

2.3.3 Meiosis I y II

La última división mitótica de espermatogonias tipo B, tiene como resultado la formación de espermátocitos primarios, dando lugar a la Meiosis I. Esta transformación celular se caracteriza por tener una profase muy prolongada;

además, los espermatocitos se van relocalizando a través de la barrera hematotesticular y se van dirigiendo al compartimento adluminal de los túbulos seminíferos, este mecanismo es similar al de un cierre en el que las células están ligadas por medio de las uniones estrechas de las células de Sertoli. La culminación de la meiosis I, tiene como resultado, la formación de dos grupos de espermatocitos secundarios, estructuras que ya son células haploides, en donde cada uno de los cuales se divide a través del proceso de meiosis II, para dar lugar a la formación de 4 espermátidas haploides. A través de esta serie de divisiones, desde la segunda generación de espermatogonias tipo A a las espermátidas, la citocinesis está incompleta, porque deja a todas las células aún conectadas por los sincitios (Figura 3) y así se quedan hasta el proceso de espermiación, cuando se libera la espermátida tardía del citoplasma de la célula de Sertoli (**Marquez-Orozco, 1997; Hyttel, 2010**).

2.3.4 Espermiogénesis

Después de la Meiosis II, quedan 4 espermátidas redondas, estructuras haploides que experimentan espermiogénesis. Este proceso es caracterizado por cambios estructurales de la espermátida redonda, que ocurre al finalizar la segunda división meiotica, para convertirse en espermatozoides. La espermiogénesis presenta 4 etapas (**Olivera et al., 2006**):

- 1) *La fase de golgi*: Durante este periodo, el aparato de Golgi se acerca al núcleo y desprende vesículas que se unen para convertirse en la vesícula acrosomal que se localiza en la parte apical del núcleo. Los centriolos migran hacia lo que será la base del núcleo y, a partir del centriolo distal crece el axonema conformado por dos microtúbulos centrales y 9 pares de microtúbulos periféricos.
- 2) *La fase de capuchón*: Esta fase se caracteriza porque los gránulos acrosomales se aplanan y cubren una amplia porción, formando un capuchón en el núcleo. La cromatina se condensa a histonas que se intercambian con

protaminas y los gránulos acrosomales que forman el capuchón acrosómico.

3) *Fase acrosomal*: La espermátida gira de tal forma que el acrosoma queda en dirección de la membrana basal; el citoplasma se desplaza hacia la base de la cabeza y se localiza por debajo de la unión núcleo-axonema; las mitocondrias se agrupan alrededor de este último en su parte cercana al núcleo, formando la pieza media, En esta fase, el espermatozoide adquiere su morfología definitiva.

4) *Fase de maduración*: La morfología de la cabeza del espermatozoide (falciforme, como en los roedores o espatulada, como en ungulados) y la cola o flagelo se desarrollan. La cabeza ya está cubierta en sus dos terceras partes por el acrosoma, la cola o flagelo compuesta por la pieza media, principal y terminal, y en la pieza media se encuentran las mitocondrias en forma de hélice. En esta fase se elimina gran parte del citoplasma por desplazamiento del mismo hacia la pieza terminal de la cola originando la llamada gota citoplasmática.

Las espermátidas tardías, son liberadas desde las células de Sertoli al lumen del túbulo seminífero, a través del proceso de espermiación. Una gran parte del citoplasma, que incluye muchos organelos que forman parte de los cuerpos residuales de las espermátidas tardías son fagocitados por estas células. Posteriormente, mediante movimientos peristálticos, son transportadas desde la rete testis a los conductos eferentes y de allí se almacenan en la cola del epidídimo, en donde adquieren madurez, movilidad y capacidad fecundante.

2.4 LA COMUNICACIÓN DE LAS CÉLULAS TESTICULARES Y LA REGULACIÓN DEL AMBIENTE INTRATUBULAR

La comunicación celular, es esencial para que se lleve a cabo la espermatogénesis, así como para la regulación local de andrógenos en la microcirculación testicular.

Las hormonas, diversos factores de crecimiento y péptidos activos en la regulación de los diversos tipos celulares que participan en la espermatogénesis,

ejercen su función a través del ciclo espermatogénico o del epitelio seminífero, que se define como las diferentes etapas en tiempo y espacio, que experimenta el tejido testicular (**O'Shaughnessy, 2014**), por lo tanto, la coordinación de las células que participan en él, presenta relaciones espacio-temporales, de tal forma que todos los procesos de señalización química y de regulación hormonal, a través del torrente sanguíneo y de los sistemas que regulan el testículo de manera local están definidos por la comunicación parácrina entre las células (**Tähkä, 1985**). La comunicación y regulación de las células que integran el testículo presenta tres características importantes (**Sharpe, 1986**). 1) la regulación de la entrada de sustancias al epitelio seminífero, a través de las células mioideas peritubulares, así como en las uniones estrechas entre las células de Sertoli, por medio del fluido intersticial, que es un medio de transporte importante en el tejido testicular. Esos mecanismos permiten la creación de un microambiente óptimo, tanto en el tejido intersticial, como en los túbulos seminíferos; 2) la regulación que ejerce la célula de Sertoli en las células germinales, que involucra la multiplicación de estas últimas, su diferenciación y su translocación desde el compartimiento basal al adluminal en los túbulos seminíferos, así como la liberación de la espermátida madura durante el proceso de espermiación; y 3) la interacción que existe entre los túbulos seminíferos y las células de Leydig, para la regulación hormonal está en función de los requerimientos de las células germinales (**Sharpe, 1986**). Durante estas interacciones, las hormonas, nutrientes y factores de crecimiento, son esenciales para la función normal de la espermatogénesis; sin embargo, hay otros factores que influyen la comunicación intercelular, como la tasa del flujo sanguíneo, la permeabilidad de los capilares testiculares y la eficiencia de la barrera hematotesticular (**Sharpe, 1986**).

2.4.1 La importancia de las células de Sertoli en la comunicación intercelular

El volumen, diámetro y otros aspectos de la célula de Sertoli, cambian de acuerdo

a la fase del ciclo espermatogénico, esto se ha demostrado porqué se han observado cambios cíclicos en la organización de su citoesqueleto, en la población de receptores de FSH y andrógenos, en la actividad de algunas enzimas tubulares y en la secreción de la hormona antimülleriana (**Parvinen, 1982; Mali et al., 1985; Parvinen et al., 1986; Mali et al., 1987**), Además de esto, y en el transcurso de las diferentes etapas del ciclo del epitelio seminífero, las células de Sertoli producen ciertas proteínas que tienen gran importancia para el desarrollo y proliferación de las células germinales, como la ABP, la transferrina y la ceruloplasmina (**Parvinen, 1982**). La ABP, ejerce una función de reservorio y transportador de testosterona, actuando, principalmente, en el túbulo seminífero y epidídimo (**Waites y Gladwell, 1982**) y la transferina, la principal glicoproteína secretada por las células de Sertoli transporta hierro que está presente en el plasma, en los túbulos seminíferos y además es necesaria para nutrir a las células germinales (**Skinner y Griswold, 1980**).

2.4.2 La comunicación celular en el intersticio

El tejido intersticial del testículo posee un sistema vascular que transporta nutrientes, oxígeno y hormonas, estos son elementos con una alta demanda cuando se lleva a cabo la espermatogénesis (**Tähkä, 1989**). Este sistema de transporte está regulado por el fluido intersticial, además de las interacciones paracrinas en las que están involucradas las células de Leydig y las mioides peritubulares para secretar diversas hormonas como estrógenos, andrógenos, prostaglandinas, angiotensina y oxitocina, las cuales tienen diversas funciones que se llevan a cabo en los túbulos seminíferos, por ello, cualquier anomalía con la función endócrina de los túbulos seminíferos provoca cambios estructurales primeramente en las células de Leydig y Sertoli y después en las células germinales (**Aoiki y Fawcett, 1978; Huhtaniemi et al., 1984; Tähkä y Rajaniemi, 1985; Kerr y Donachie, 1986**).

Por otra parte, las células mioides peritubulares y las células de Sertoli, poseen

receptores de andrógenos que se secretan como respuesta a la síntesis de testosterona, estos son factores paracrinos no mitogénicos, como el Factor Peritubular que regula a las células de Sertoli tipo A y B (P-Mod-S A y B, por sus siglas en inglés) que estimulan la producción de transferrina, ABP induce la síntesis de algunas proteínas en las células de Sertoli que sirven para nutrir y cubrir los requerimientos de las células germinales (**Skinner y Fritz, 1986; Verhoeven et al., 2000**).

2.5 REGULACIÓN HORMONAL DE LA ESPERMATOGÉNESIS

Los compartimientos intersticiales de los túbulos seminíferos están bajo el control de diferentes hormonas como la LH, FSH y testosterona, que tienen receptores en algunos tipos celulares del testículo como las células de Sertoli, Leydig y mioides-peritubulares; la función principal de estas hormonas incluye la regulación, iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis, formación del fenotipo del macho durante la diferenciación sexual, y estimula la madurez sexual durante la pubertad (**Tähkä, 1989**).

Para que estas hormonas ejerzan su efecto, se necesita de la participación de diversos núcleos cerebrales y otras estructuras que se encuentran en el SNC, como el hipotálamo, que integra y regula la función de neurotransmisores, a través de conexiones sinápticas entre las diferentes neuronas productoras de GnRH (**Meites, 1981; Wray et al., 1989; Veldhuis, 1991**). Estas neuronas, proyectan sus axones hacia la eminencia media y ahí liberan su contenido, el cual viaja a través del sistema sanguíneo porta hipotalámico-hipofisiario (**Silverman et al., 1994**), además, la secreción pulsátil de la GnRH, es regulada por múltiples neurotransmisores que estimulan o inhiben su secreción, como por ejemplo, los aminoácidos glutamato y aspartato, que funcionan como neurotransmisores, así como la noradrenalina, dopamina, acetilcolina, la serotonina, GABA y las β -endorfinas, entre otros (**Marshall, 2008**).

Posteriormente, la GnRH actúa en los gonadotropos de la adenohipófisis para estimular la secreción de LH y FSH. El paso inicial involucra la unión de GnRH al receptor membranal de los gonadotropos. La unión del receptor parece ser dependiente de AMP cíclico (AMPC) e instantáneamente requiere calcio y la activación de la proteína kinasa C. Después de los procesos de transcripción del gen específico de las gonadotropinas, la transducción del ARN mensajero (ARNm), síntesis de proteínas y la glicosilación post-traduccion de los polipéptidos gonadotrópicos, y el empaquetamiento intracelular de las hormonas gonadotrópicas en vesículas exocitóticas, son transportadas hacia la membrana plasmática y descargadas en el torrente sanguíneo para ser transportadas al órgano blanco, en este caso, el testículo (**Knobil et al., 1980**).

2.5.1 Mecanismo de acción de las gonadotropinas

Las gonadotropinas ejercen su efecto en los testículos mediante la unión a receptores específicos, localizados en la membrana celular. Es por ello que los túbulos seminíferos, son sitios de acción de la FSH (**Means y Vaitukaitis, 1972**). Los eventos bioquímicos iniciales después de la unión de la FSH a su receptor son similares a los de la LH. En las células de Sertoli, la elevación en los niveles de AMPC después de que la FSH se une a su receptor membranal activa la proteína kinasa C (PKC) y estimula la síntesis de proteínas, incluyendo la síntesis de la ABP y la síntesis de la enzima aromatasa que convierte la testosterona a estradiol (**Dorrington and Armstrong, 1975**), es por ello que se considera que la FSH desempeña una función importante en la esteroidogénesis induciendo la maduración de las células de Leydig que se encuentran en desarrollo e incrementa el número de receptores de LH (**Kerr y Sharpe, 1985**).

En el caso de la LH, esta interactúa con receptores membranales en las células de Leydig; la unión al receptor estimula a la adenilato ciclasa que cataliza la formación del AMPC. La liberación del AMPC dentro del citoplasma en la célula

de Sertoli, es seguida por la unión de AMPc a la PKC, una disociación de la subunidad reguladora y una activación de la subunidad catalítica de la enzima. La activación de la PKC en las células de Leydig, tiene como resultado, la conversión de colesterol a pregnenolona, esta conversión, incrementa la síntesis de testosterona (**Podesta et al., 1978**).

2.5.2 La acción hormonal en el testículo

La función de las células de Leydig, es principalmente, secretar andrógenos y el principal esteroide que secreta es la testosterona; sin embargo, la androstendiona también es secretada por el testículo.

Además, es en la célula de Leydig de donde derivan todos los andrógenos que ejercen su acción en las diferentes estructuras en el testículo, a partir de la molécula precursora, el colesterol. Esta célula, capta el colesterol desde lipoproteínas plasmáticas, y lo utiliza como sustrato para la síntesis de esteroides.

Las lipoproteínas que transportan colesterol son las lipoproteínas de baja densidad (LDL), para las cuales, existen receptores específicos de membrana. Estos receptores median la endocitosis de las LDL, que en el interior de las células se fusionan con los lisosomas, que degradan las proteínas y desesterifican el colesterol. El colesterol libre es reesterificado y acumulado en gotitas lipídicas en el citoplasma celular. Posteriormente, el colesterol será de nuevo desesterificado y rescatado de la gotita lipídica en el primer paso de la síntesis de las hormonas esteroides, una proteína transportadora traslada el colesterol a través del citoesqueleto a la mitocondria, donde comienza la síntesis de esteroides.

Las señales para iniciar la síntesis de esteroides proceden de la LH, en contacto con sus receptores específicos de la membrana, que activan la síntesis

intracelular de AMP-cíclico, uno de los mediadores necesarios de la síntesis de esteroides.

El primer paso de este evento, comienza en la membrana interna de las mitocondrias, donde iniciarán un proceso de reducción del número de carbonos de 27 hasta 21 en el caso de la progesterona, 19 en el caso de los andrógenos y 18 en el caso de los estrógenos. La reducción del número de carbonos se produce por oxidaciones catalizadas por enzimas de la familia de los citocromos P450, Esta enzima, corta la cadena lateral de 6 carbonos del colesterol, produciendo ácido isocaproico y pregnenolona. La pregnenolona, es precursor de todas las hormonas esteroides (**Hall et al., 1994**).

2.5.3 Transporte de testosterona en plasma

La testosterona circulante en el plasma se une a una proteína plasmática. La principal molécula se llama globulina que une testosterona, también llamada globulina que enlaza hormonas sexuales (SHGB) (**Wilson et al., 1992**).

En el interior de la célula de Leydig, la testosterona puede convertirse en dihidrotestosterona por la 5 α -reductasa, ya que las dos hormonas se unen al receptor de andrógenos con la misma afinidad, de esta forma, el complejo hormona-receptor (H-R) regula la secreción de gonadotropinas y la diferenciación sexual masculina, sin embargo, el complejo dihidrotestosterona-receptor es responsable de la masculinización externa durante la embriogénesis y el desarrollo de las características sexuales secundarias del macho (**Wilson et al., 1992**). Por tanto, los efectos de los andrógenos en el epitelio seminífero, son regulados por el receptor de andrógenos, que es una proteína que se localiza en el núcleo o citoplasma de la célula (**Lyon et al., 1975; Johnston et al., 2001; Tsai et al., 2006; Wang et al., 2009**). La testosterona pasa a las células de Sertoli a través de los receptores de andrógenos que se encuentran en el citoplasma y el núcleo, e inicia la respuesta funcional requerida para apoyar la

espermatogénesis, además, interactúa con los receptores de andrógenos expresados en las células de Leydig, peritubulares, capilares y células vasculares endoteliales (**Smith et al., 2014**).

En el macho adulto, los niveles de testosterona se mantienen relativamente constantes, además, se ha comprobado que altos niveles de receptores de andrógenos en las células mioides-peritubulares, sugieren que la testosterona es activada también en esas células (**Rey et al., 2009**).

2.6 COLECTA Y EVALUACIÓN SEMINAL

La obtención de semen, en la mayoría de los casos, tiene el propósito de ser evaluado y utilizado en la reproducción asistida de las especies, y para la selección de sementales por su potencial reproductivo. Existen varias técnicas para la obtención de semen por eyaculación en pequeños rumiantes, siendo las más empleadas, la obtenida con vagina artificial (VA), la obtenida por electro-eyaculación, y la colecta post-coital (**Evans y Maxwell, 1990**). Recientemente, en venados se prueban métodos para obtener espermatozoides maduros post-mortem a partir del lavado de epidídimos, aprovechando los venados cazados dentro de las unidades para el manejo y conservación de la vida silvestre (UMA) conservando de esta manera, los genotipos originales dentro de sus áreas de distribución.

Neria y Solar, (**1984**) compararon muestras de semen antes y después de la criopreservación obtenidas con vagina artificial (VA) y electro-eyaculación, y encontraron que las muestras de semen obtenidas con VA fueron de mejor calidad de acuerdo a su concentración espermática, pero no así en cuanto a su motilidad y pH. El semen colectado por electro-eyaculación resulta ser más voluminoso pero menos concentrado que el colectado por VA (**Cochran et al., 1985**) manifestando que “la calidad” del semen no difiere de la técnica de colección.

Se puede esperar que el volumen y densidad del semen eyaculado varíe con la época, edad, raza, temperatura ambiental y estado nutricional. De acuerdo a los estudios realizados por Refsal (1986), un eyaculado normal de borrego en promedio oscila entre 0.5-2.0 mL⁻¹ de volumen, conteniendo entre 1500-4000 millones de espermatozoides mL⁻¹ y una motilidad masal ≥ 75 %.

Para la obtención del semen, en venados se ha utilizado electro-eyaculadores con polos de anillos como los que se emplean en ovinos y caprinos (Samour, 1977). Haigh (1984), reportó que con un voltaje de 75 a 200 milivolts se puede obtener la eyaculación en un venado.

Para la obtención de semen de venado, empleando un electro-eyaculador éste debe ser inmovilizado con Clorhidrato de Xilacina por vía intramuscular en dosis de 1-4 mg kg⁻¹, empleando posteriormente Clorhidrato de Yumbina a razón del 10% de la dosis de Xilacina por vía endovenosa con el propósito de revertir el efecto de la Xilacina (Jacobson *et al.*, 1989). En la última década, para la inmovilización química de los venados sujetos a trabajarse con electro-eyaculador se reporta la inyección de mezclas de sustancias como la Xilacina con Ketamina; y la mezcla de Clorhidrato de Tiletamina y Clorhidrato de Zolazepam (conocida la combinación como Zoletil 100) con Ketamina, que proporcionan mejores resultados que el uso de la Xilacina sola. De igual manera, recientemente se ha reportado el uso del Clorhidrato de Tolazolina para revertir el efecto de la Xilacina con mejores resultados que la Yumbina en venados (Palazuelos *et al.*, 1986; Galindo-Leal y Weber, 1998, Kreeger, 2003).

2.6.1 Valoración del semen

Al igual que en los animales domésticos, se deben tomar en cuenta las variables a medir para obtener un semen de calidad. La primera variable se refiere a su aspecto, el cual no debe tener agentes de contaminación como sangre, orina,

pelo o polvo; además, debe ser uniforme, con apariencia opaca, lo que indica una elevada concentración espermática (**Hafez, 1984**). La segunda variable es la motilidad masal, la cual se recomienda esté dentro del rango de 70-80%, aunque un 70% es suficiente para lograr el 100% de concepción en venadas (**Jacobson et al., 1989**). La tercera variable es la morfología. El semen de casi todas las especies incluyendo a los venados, contiene espermatozoides anormales que incluso, algunos tipos de anomalías no están asociados a la esterilidad. En la determinación de la morfología, los niveles de espermatozoides anormales no están relacionados con un índice de fertilidad bajo, siempre y cuando no sobrepasen el 20% (**Hafez, 1984**). La cuarta y última variable que generalmente se emplea en la valoración de semen es la concentración espermática. Lambiase *et al.*, (**1972**) mencionó que la máxima concentración de espermatozoides en venado cola blanca fue de 3,400 millones, y Haigh (**1984**), reportó que una concentración de 36 a 200 millones de espermatozoides por mililitro de semen, es suficiente para llevar a cabo la concepción en una venada a través de la inseminación artificial.

2.7 EL FOTOPERIODO EN EL MACHO

La mayoría de los pequeños rumiantes en el mundo, originalmente habitaban entre los 35° latitud norte (LN) y los 35° latitud sur (LS) (**Lindsay, 1991**), pero al paso del tiempo y con la domesticación, comenzaron a poblar otras latitudes; de esta forma y como una respuesta adaptativa a lo largo de un proceso evolutivo desarrollaron estacionalidad reproductiva, la cual es regida por el fotoperiodo (**Sutama y Edey, 1985; Martin et al., 2002**).

En los venados, la estacionalidad reproductiva es un mecanismo de adaptación para que los nacimientos de los cervatos coincidan con el período de mayor abundancia de alimento, periodo durante el cual hay una mayor probabilidad de sobrevivencia y mayor tasa de crecimiento. Asimismo, el fotoperiodo, la alimentación, el clima y los factores sociales de la población, van a influir sobre

el genotipo que será determinado por la respuesta reproductiva (**Galindo-Leal y Weber, 1998**).

Los sistemas que regulan estos mecanismos reproductivos responden de manera muy marcada al fotoperiodo; por ejemplo, las razas que habitan a latitudes mayores a 35° son más estacionales que aquellas razas que habitan latitudes menores (regiones tropicales), en éstas últimas, la actividad reproductiva está más influenciada por otros factores, como la nutrición, la temperatura y los estímulos socio-sexuales (**Martin et al., 2010**).

Por lo tanto, la respuesta al fotoperiodo es especie-específica. Las especies con gestación de 5 a 7 meses como las ovejas, las cabras y los venados, requieren que el apareamiento tenga lugar entre el otoño e invierno (**Fowler, 1988; El Omari et al., 1989; Tsubota et al., 1997**), para que los nacimientos ocurran entre primavera y verano, esto como una ventaja ambiental y adaptativa, (**Lincoln y Short, 1980**).

Cuando se presenta la época de anestro estacional, la fertilidad y todos los eventos neuroendocrinos y reproductivos en el macho disminuyen a un nivel mínimo, aunque como se ha mencionado también, el grado de domesticación es muy importante, ya que si se comparan especies de vida silvestre con especies domésticas, las variaciones circanuales en las concentraciones de LH, testosterona y FSH son menos marcadas en las especies domésticas (**Lincoln et al., 1990**).

Los machos, que serán sementales, deben ser evaluados con diferentes exámenes físicos, que incluyan las características antes mencionadas y los perfiles hormonales (LH y testosterona) en diferentes épocas, ya que esto determina su actividad reproductiva anual (**Schanbacher y Lunstra, 1977**).

El fotoperiodo ejerce su acción por medio de la secreción de melatonina

producida por la glándula pineal. Diversos estudios coinciden en señalar que el fotoperiodo influye de manera determinante en el diámetro testicular, concentración espermática, nivel de testosterona, LH, motilidad y volumen seminal (**Fuentes et al., 1997 Mandiki et al., 1998; Aguirre et al., 2007**).

En los mamíferos, la melatonina sensibiliza al hipotálamo por los efectos del fotoperiodo para coordinar los cambios cíclicos en la reproducción y el crecimiento, principalmente, para sincronizar estos eventos en las diferentes épocas del año. La melatonina es secretada sólo en ausencia de luz por lo que su secreción varía con la duración de la noche, proporcionando una señal endocrina de duración variable, la cual actúa en el cerebro e hipófisis a través de receptores específicos (**Lincoln y Clarke, 1997**).

En animales domésticos sometidos a la exposición de un cambio en el fotoperiodo artificial de días cortos a largos, provoca una secuencia de respuestas neuroendocrinas similares a las observadas en otoño bajo condiciones de luz natural. Estos cambios incluyen un incremento en la secreción de LH, FSH y la activación funcional del eje reproductivo (**Pelletier y Almeida 1987; Lincoln, 1994**).

El patrón reproductivo estacional de los ciervos varía notablemente según la especie y la ubicación geográfica, existiendo desde especies de ciervos no estacionales, hasta otros con una estacionalidad muy marcada (**Bronson, 1989**). En especies de ciervos estacionales se produce un aumento del peso corporal, tamaño testicular, y del perímetro del cuello de los machos asociado a la estación reproductiva (**Lincoln et al., 1972; Clutton-Brock et al., 1982**). También se ha descrito que previo a la estación reproductiva y asociado al aumento de la concentración de testosterona ocurre un aumento del número de espermatozoides en el eyaculado (**Haigh et al., 1984**). Según los autores se alcanza simultáneamente en ese momento el máximo porcentaje de espermatozoides con morfología normal. Además, se describen cambios

estacionales en el diámetro de los túbulos seminíferos y del epidídimo, número de espermatogonias en los túbulos seminíferos, y en el tamaño, peso y actividad de las glándulas sexuales secundarias (**Lincoln, 1971; Reyes et al., 1997**). Se ha reportado también un oscurecimiento en el color del pelaje (**Bubenik & Bubenik, 1985**), y mayor tamaño y actividad de las glándulas apócrinas y sebáceas del cuerpo (**Ebling, 1972**) en la estación reproductiva. Todos estos cambios han sido vinculados con la concentración de testosterona en cérvidos de diferentes especies (**Ebling, 1972; Gaspar-López et al., 2010**). Las astas de cérvidos son estructuras que presentan un marcado patrón estacional de crecimiento, el que se vincula a las concentraciones séricas de testosterona (**Bubenik, 2006**). Según este autor el crecimiento de las astas comienza con concentraciones de testosterona aún bajas (menor a 10 ng/ml), la mineralización y el fin del crecimiento cuando éstas ya han alcanzado concentraciones altas (entre 40 y 60 ng/ml), y la caída 2 a 4 semanas después de la disminución anual de la concentración de testosterona. El crecimiento de las astas se vincula también con los cambios estacionales en las concentraciones de melatonina y prolactina (**Bubenik, 2006**).

2.7.1 El sistema del reloj circadiano

El reloj circadiano, se refiere básicamente a los “ritmos circadianos” que tienen una duración aproximada de 24 h. La tierra rota cada 24 h y el sistema circadiano de los mamíferos se ha adaptado a este horario, con la finalidad de aprovechar la luz solar y con esto llevar a cabo todos los eventos fisiológicos que están relacionados con las horas luz-oscuridad (**Bass y Takahashi, 2010**).

Los sistemas circadianos están regulados por el SNC, particularmente por el núcleo supraquiasmático NSQ (por sus siglas en inglés), este recibe la información (luz-oscuridad) a través de la ruta retino-hipotalámica, de esta forma, la información de las horas luz, es captada por la retina, que es la señal externa, y de la retina hacia el NSQ, es la señal interna, con la finalidad de

producir melatonina, que es la hormona que regula la actividad reproductiva estacional y que es secretada por la glándula pineal (**Bass y Takahashi, 2010; Albrecht, 2012**), es por ello que la información fisiológica que un individuo posee del fotoperiodo se transforma en señales endógenas, con ayuda de esta hormona (**Chemineau et al., 2007**). De esta forma, con el inicio de la época reproductiva, es decir, con la llegada de los días cortos, se incrementa la duración del periodo de oscuridad y la duración de secreción de la melatonina, que se secreta únicamente durante la noche y con ello, permite el incremento en la secreción pulsátil de GnRH y de las gonadotropinas (**Malpaux et al., 1997; Vanecek, 1998**).

La melatonina, ejerce su acción reduciendo su síntesis, de acuerdo a las horas luz y también, regula la actividad de enzimas biosintéticas (**Minnerman y Wurtman, 1975**), además, se libera siguiendo los ritmos circadianos y esto generalmente es por la noche. Una disminución en la secreción diaria de melatonina se asocia a una disminución en la secreción pulsátil de GnRH, esto trae como consecuencia, una regresión o involución de las testículos durante los días largos; mientras que las mismas señales fisiológicas que estimulan su secreción durante los días cortos, son seguidas por una activación y restablecimiento de la actividad gonadal (**Grosse et al., 1993**). Esto se ha demostrado a nivel experimental, ya que tratamientos con melatonina en carneros, estimulan la secreción de LH y FSH y por lo tanto, en la función testicular (**Lincoln y Maeda, 1992; Lincoln, 1994; Tortonese y Lincoln, 1995**).

2.7.2 El efecto del fotoperiodo en las gonadotropinas y hormonas esteroides

El efecto del fotoperiodo se transmite por vías neuroendocrinas que regulan la actividad gonadal. La influencia del fotoperiodo en la secreción pulsátil de GnRH, refleja cambios circanuales en la secreción pulsátil de LH, porque se incrementa

durante el otoño (días cortos) y se reduce durante la primavera (días largos), esto con la finalidad de que exista una estimulación máxima en la actividad testicular durante el otoño-invierno (**Thompson et al., 1986; El Omari et al., 1989; Lerchl et al., 1993**). En carneros, la concentración y frecuencia de pulsos de LH en plasma durante la estación reproductiva, pueden incrementarse de 5 a 14 veces (**Ebling et al., 1994**) y las concentraciones de testosterona en plasma fluctúan de forma paralela a las de LH (**Berndtson et al., 1974; Cox et al., 1988; El Omari et al., 1989**).

En hembras, las variaciones circanuales en la secreción de LH, están asociadas con cambios en el sistema de retroalimentación negativa del estradiol, este disminuye la frecuencia de pulsos de GnRH/LH durante la época de anestro estacional (**Karsch et al., 1993; Gallegos-Sánchez et al., 1997**). Estos cambios circanuales son similares a los que tiene el sistema de retroalimentación hormonal del macho; por ejemplo, la época reproductiva, se rige por un incremento en la secreción pulsátil de LH como resultado del efecto de la regulación neuroendocrina de los esteroides (**Lincoln, 1984**). Además, también los opioides y la prolactina participan en el control de la secreción pulsátil de LH, en donde la secreción de melatonina afecta el sistema opioidérgico (**Aurich et al., 1994b, 1996**). El principal efecto de los opioides es la inhibición de la frecuencia de pulsos de LH (**Lincoln and Ssewanyana, 1989**). Por tanto, un incremento en las concentraciones de gonadotropinas circulantes en el eje neuroendócrino, precede al restablecimiento de la actividad testicular, ya que el potencial que tienen los testículos para responder a las variaciones estacionales, está muy relacionado con la densidad de receptores de FSH y LH, durante la involución y el restablecimiento de la actividad gonadal, y por lo tanto, con las variaciones en la concentración de testosterona (**Robinson y Karsch 1985; Lincoln et al., 1990; Malpoux et al., 1997**).

En general, los sistemas dopaminérgicos responden a los cambios estacionales del sistema de retroalimentación de los esteroides gonadales, ya que la mayor

población de receptores para dopamina, está presente durante los días largos, por lo cual el sistema dopaminérgico alcanza su máxima activación durante el anestro estacional (**Kao *et al.* 1992; Tortonese y Lincoln, 1994, 1995**).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el estado de Nuevo León, México, a mediados de la década de 1980 se crearon los ranchos cinegéticos (hoy UMA) para el aprovechamiento del venado cola blanca texano. La fama de esta especie en el estado fue reconocida por cazadores extranjeros y nacionales promoviendo un negocio lucrativo para las Unidades de Manejo y Conservación de Vida Silvestre (UMA).

Motivados por la perspectiva de un buen negocio, en la década de 1990, los ganaderos del noroeste de México se interesaron en construir encierros de venado cola blanca texano obteniendo buenos resultados. En el año 2005 en Anáhuac, Nuevo León, se da el primer esfuerzo formal en la UMA Rancho Casa Grande con la participación del Colegio de Postgraduados para la experimentación y transferencia de tecnología sobre técnicas de reproducción asistida para la mejora genética y mayor eficiencia del manejo reproductivo del venado cola.

En los últimos 10 años se han hecho investigaciones sobre reproducción del venado cola blanca, presentadas en congresos y simposios a nivel nacional, pero poca información ha sido publicada en artículos científicos. Con el propósito de contribuir en el manejo de la reproducción de esta especie para garantizar la conservación y aprovechamiento de las subespecies en México, el presente trabajo tuvo como objetivo general, determinar la época del año en que el venado produce la mejor calidad de semen tomando como base a su fisiología testicular. De lo anterior, se establecieron las siguientes hipótesis:

- Existe al menos una diferencia en la calidad de semen del venado entre los meses que comprende su ciclo reproductivo.
- Existe al menos una diferencia en la constitución celular en el desarrollo testicular del ciclo reproductivo del venado.

Objetivos Particulares

- 1) Determinar la calidad espermática a través del ciclo reproductivo.
- 2) Caracterizar el desarrollo espermático del venado mediante cortes histológicos a través del año.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización del área de estudio

Durante la fase de toma de muestras, la presente investigación se llevó a cabo de septiembre de 2014 a junio de 2015 en el Laboratorio de Reproducción Animal del Colegio de Postgraduados, Campus San Luis Potosí (SLP), ubicado en el área experimental denominada “La Huerta” con domicilio en Calle Santos Degollado No. 40, en la Ciudad de Salinas de Hidalgo, SLP. El laboratorio se encuentra registrado como Unidad de Manejo y Conservación de Vida Silvestre con clave de registro DGVS-CR-IN-1305-SLP/11 y cuenta con las autorizaciones correspondientes para llevar a cabo la presente investigación. Las coordenadas geográficas del laboratorio son 22° 34´ de latitud norte y 101° 45´ de longitud oeste, a una altura de 2090 msnm, bajo un clima Bs0Kw(e), semiárido con lluvias en verano, con una precipitación anual que oscila entre los 330 y 400 mm y una temperatura media anual entre los 12° y 18°C.

4.2 Adquisición de venados y su manejo

Para la investigación se utilizaron 24 venados machos adultos de la especie *Odocoileus virginianus* con edades de 3½, 4½ y 5½ años, con un peso promedio de 55 kg; los cuáles fueron adquiridos en la UMA “El Cimatario” localizada en el Parque Nacional El Cimatario en el estado de Querétaro, entre los límites de los municipios de Huimilpan y Querétaro. Los animales estuvieron confinados en un corral de manejo de 1800 m², el cual cuenta con sombras, comederos y bebederos. Los venados fueron alimentados con alimento peletizado comercial balanceado para venado de la marca Trophy Maker-18® con 18% de proteína cruda (Cuadro 1). Adicionalmente se les proporcionó, alfalfa fresca y agua *ad libitum*, y fueron desparasitados, con Ivermectina por vía intramuscular a razón de 100 mg por venado, 30 días antes de iniciar el muestreo.

Cuadro 1. Ingredientes de alimento comercial Trophy Maker 18.

Ingredientes	Análisis de la dieta	
Maíz molido, productos proteicos vegetales, subproductos procesados de cereales, sal común, melaza de caña, extracto de hemicelulosa, fosfato dicalcico, carbonato de calcio, cultivo de levadura, suplemento de vitamina E, sulfato de cobre, carbonato ferroso, oxido de manganeso, carbonato de cobalto, etilenodiamina dihidroiodo (EDDI), selenio de sodio, saborizantes naturales y artificiales.	Proteína cruda	18.0 % min.
	Grasa cruda	1.0 % min.
	Fibra cruda	8.0 % max.
	Extracto libre de nitrógeno	9.0 % min.
	Cenizas	9.0 % max.
	Humedad	12.0 % max.

4.3 Colecta de semen

El muestreo de semen fue realizado mensualmente en dos venados para su valoración. La colecta de semen se hizo mediante la inmovilización química de los venados por vía intramuscular con dardos de 3ml x 13mm de la marca Cap-Chur® aplicados con un rifle de CO₂ marca Dan-Inject® Modelo JM Estándar. La sustancia empleada para la inmovilización fue la mezcla de los fármacos Zoletil (4 mg/kg) combinado con Clorhidrato de Xilacina (2.2 mg/kg), de acuerdo a lo recomendado para la inmovilización de venado cola blanca por Kreeger (2002). Una vez inmovilizados los venados, se les cubrieron los ojos con una máscara específica para tal propósito y se les trasladaron al área de recolección dentro del laboratorio monitoreando sus constantes fisiológicas, como lo recomiendan Drew y Amass, (2004). Una vez obtenido el semen, este fue evaluado con el programa CASA (Computer Assisted Semen Analysis) con el Software especializado SpermVision®. Terminado el muestreo de semen y la extracción de los testículos que se llevó a cabo quirúrgicamente, se les aplicó una dosis de Tolazolina (2mg/kg) como antagonista al efecto del anestésico para la

recuperación de los animales (**Kreeger, 2002**)

Durante la extracción de semen, se utilizaron guantes desechables de nitrilo, estériles, a los venados se les cortó el pelo del prepucio y se les limpió el área aledaña. Asimismo, se retiraron las heces de la última porción del recto, mediante la inserción de los dedos medio e índice. Enseguida se procedió a la extracción del pene retrayendo a su vez el prepucio, provocando así la invaginación del glande del pene, el cuál fue sujetado de su base empleando una tira de gaza (20 cm x 2.5 cm), (**Drew y Amass, 2004**).

Una vez que el glande del pene estuvo expuesto, se procedió a insertar el electro-eyaculador lubricado en el recto del animal dirigiendo los electrodos hacia la pared ventral del mismo, lo más cercano a los testículos y glándulas accesorias y lograr así una mejor estimulación eléctrica. Antes de la primera electro estimulación, se colocó el glande del pene dentro de un tubo de colecta graduado, el cual se mantuvo a una temperatura de 35°C (**Drew y Amass, 2004**).

Insertado el electro-eyaculador, se aplicó una estimulación eléctrica durante 4 segundos seguida de 4 segundos de descanso, así hasta completar una serie de 15 estimulaciones, dando un descanso de 15 minutos entre la primera y segunda serie cuando fue necesario. Las muestras contaminadas con orina o fluido pre-eyaculatorio se desecharon. El semen una vez colectado, se mantuvo en baño maría a una temperatura de 35°C (**Drew y Amass, 2004**).

4.4 Evaluación del semen

El semen fue evaluado inmediatamente después de haber sido colectado. Durante este proceso, el semen se seleccionó verificando visualmente que las muestras no presentaran contaminantes como sangre, orina o pelo. El semen evaluado fue aquel que presentó las características de ser espeso y de color blanco nacarado o cremoso.

Las variables del semen evaluadas fueron la motilidad masal (MM), motilidad individual o progresiva (MP), concentración espermática (CON) y la viabilidad de los espermatozoides.

Para su evaluación en el CASA, se depositó una gota de semen diluido (1:5) dentro de la cámara de un portaobjetos especializado para el sistema, el cual se mantuvo en la platina del microscopio con control de temperatura.

4.5 Gonadectomía, tratamiento quirúrgico y posquirúrgico

Los machos fueron seleccionados al azar para ser gonadectomizados bilateralmente (2 venados por mes). Todos los animales fueron mantenidos en corrales de observación, en un sistema de tipo intensivo y con fotoperiodo natural, además, fueron manejados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y al manual de prácticas y procedimientos para animales experimentales del Colegio de Postgraduados (ColPos). El tipo de gonadectomía que se utilizó, fue el método quirúrgico es decir, se extrajo el testículo, realizando una incisión con un bisturí en la parte inferior del saco escrotal, extrayéndose testículo izquierdo y derecho, posteriormente se ligaron los conductos y se realizó una sutura en la zona de la incisión.

Después de la cirugía, los animales gonadectomizados, fueron puestos en un corral, totalmente limpio y desinfectado con cal durante 5 días, y se sometieron a un tratamiento farmacológico posquirúrgico que consistió en la administración de un antibiótico, un antiinflamatorio, y un analgésico, con dosis de acuerdo a la edad y al peso corporal.

4.6 Preparación del tejido testicular

Después de la castración, las gónadas, tanto izquierda como derecha, fueron

separadas del epidídimo, del sistema de conductos y del tejido conectivo, posteriormente, se procesaron los testículos completos de los animales seccionándolos en porciones más pequeñas conforme a la técnica histológica (**Montalvo, 2010**), utilizando Bouin-Duboscq como medio de fijación durante 12 horas, deshidratando con un tren de alcohol en concentraciones crecientes desde 50%, 70%, 95% y 100%. Posteriormente se aclararon con xileno (Etilbenzeno C₆H₄(CH₃)₂, J.T.Baker) y se incluyeron en parafina (Paraplast plus, Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, MA, USA), para obtener preparaciones fijas con secciones histológicas de 9µm de grosor por portaobjetos, mediante un micrótopo y se tiñeron con la técnica de tinción Hematoxilina- Eosina (H-E), utilizando Hematoxilina Hemm Hill. El procedimiento de la preparación de tejidos para análisis microhistológico fue el siguiente:

I. FIJACIÓN

Líquido fijador de Bouin

Preparación:

- Ácido pícrico humectado (1-2%)	1.125 g
- Ácido acético glacial	5 ml
- Formaldehído (35-40%)	25 ml
- Agua destilada	75 ml

- El volumen del fijador estuvo en una relación 1:20 (muestra-tejido).
- El tiempo de fijación varió de acuerdo al tipo de tejido de 12, 24 o 48 h, (se recomienda 24 h para tejido testicular).
- La temperatura de fijación fue a 4 °C

II. LAVADO E INCLUSIÓN EN PARAFINA

Los tiempos que los tejidos pasaron dentro de cada solución dependieron del

volumen de las muestras, ya que por cada milímetro de tejido equivale a una hora en cada solución.

1)	Alcohol etílico al 70 %	12 h
2)	Alcohol etílico al 70 %	12 h
3)	Alcohol etílico al 95 %	1 h
4)	Alcohol etílico al 95 %	1 h
5)	Alcohol etílico al 100 %	1 h
6)	Alcohol etílico al 100 %	1.5 h
7)	Alcohol (50%) – Xilol (50%)	1 h
8)	Xilol 100 %	1 h
9)	Xilol 100 %	1 h
10)	Primer baño de parafina	1.5 h
11)	Segundo baño de parafina	1.5 h
12)	Tercer baño de parafina	1 h

Después de este procedimiento, los tejidos se quedaron así dentro de la parafina o en bloques de la misma listos para realizar los cortes.

III. CORTE DE TEJIDOS Y ADHESIÓN AL PORTAOBJETOS

Una vez preparados los bloques de parafina con el tejido sobre una base de madera, se procedió a hacer los cortes a 9 micras. Las tiras de corte que se obtienen se adhieren al portaobjetos con un adhesivo de cromo. La temperatura del adhesivo estuvo a 40 °C.

Preparación del adhesivo:

– Grenetina	1.25 g
– Fenol	0.25 g
– Alumbre de cromo	0.25 g
– Agua destilada	575 ml

Se agitó a temperatura ambiente hasta que se mezcló perfectamente.

Cuando los tejidos ya estaban sobre el portaobjetos se eliminó el exceso de

adhesivo y los tejidos se dejaron sobre una platina a 60 °C para quitar el exceso de parafina y ayudar al procedimiento de desparafinamiento.

IV. DESPARAFINAMIENTO Y MONTAJE

Una vez que las laminillas perdieron el exceso de parafina por efecto del calor, estas entraron a un nuevo tren de xilol y alcohol a diferentes concentraciones, para quitar la parafina y teñirlos con la hematoxilina-eosina. Esto se llevó a cabo sumergiendo las laminillas con los cortes en el siguiente orden:

- Xilol 100 % 3 min
- Xilol 100 % 3 min
- Xilol 100 % 3 min
- Alcohol 100% 3 min
- Alcohol 100% 3 min
- Alcohol 85 % 3 min
- Alcohol 70% 3 min
- Alcohol 50 % 3 min
- Agua destilada 5 min
- Agua destilada 5 min
- Hematoxilina (Hem-Gill) 6 min
- Agua destilada 5 min
- Agua destilada 5 min
- Eosina (1%) 1 min
- Alcohol 70 5 min
- Alcohol 96 5 min
- Alcohol 96 3 min
- Alcohol 100 3 min
- Alcohol 100 3 min
- Xilol 100 3 min
- Xilol 100 3 min
- Xilol 100 3 min

Después del último cambio de Xilol, se cubrió el portaobjetos con resina para conservar los tejidos, sobre la resina se colocó un cubreobjetos, cuidando de no dejar burbujas. Al aplicar la resina se dejó por lo menos secar por 24 horas para que el xilol se evaporara.

Preparación de la hematoxilina hem-hill

- Agua destilada 750 ml
- Etilenglicol 250 ml
- Hematoxilina polvo 2 g
- Cristales 2.36 g
- Yodato de sodio 0.2 g
- Sulfato de aluminio 17.6 g
- Ácido acético glacial 20 ml

Los reactivos se mezclaron en orden a temperatura ambiente 1 hora y se filtraron para quitar sedimentos.

Para la preparación de la eosina al 1% se disolvió Eosina amarilla en alcohol al 70%

4.7 Procedimiento para la toma de fotografías histológicas

Se evaluaron dos preparaciones histológicas por venado. Para la toma de fotografías que se utilizaron para cuantificar las estructuras, la porción del tejido de cada preparación histológica fue dividida de manera manual con un plumón negro en cuatro cuadrantes, posteriormente, se seleccionó la distancia (1mm²) que fue la misma para todas las preparaciones histológicas de cada uno de los individuos en este estudio, de tal forma que del cuadrante hecho manualmente, se desplazó a través de los ejes X e Y de la platina del microscopio (graduada en milímetros), para encontrar la intersección de los ejes. Cuando se encontró la distancia correcta y el tejido de esa zona se encontró dañado o con estructuras que no corresponden al tejido a cuantificar, se desplazó 1 mm de distancia como máximo (Figura 4).

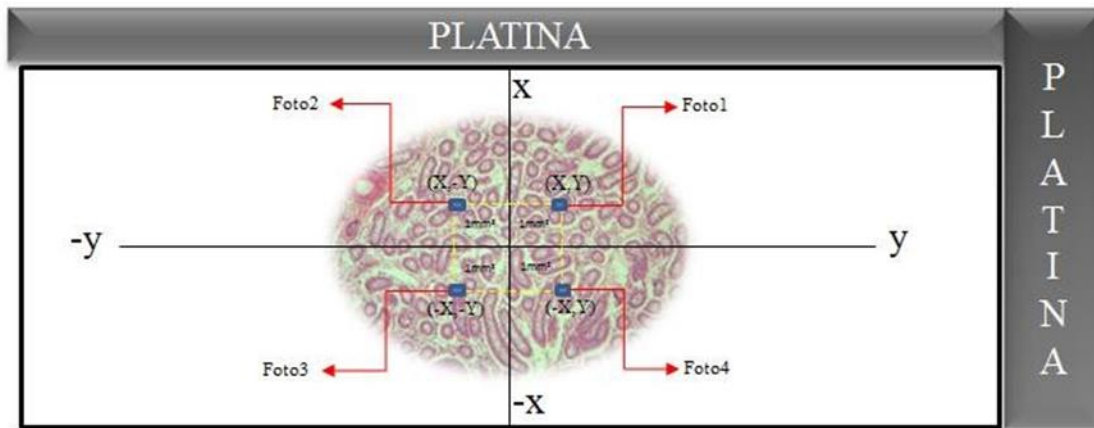


Figura 4: Diagrama de una preparación histológica, que representa las cuatro coordenadas, realizadas a través de los ejes X e Y de la platina, para la toma de las fotografías histológicas. Tomado de **Arellano-Lezama et al., 2015**

Se seleccionó un área, que tuvo una dimensión de $72112.11\mu\text{m}^2$, esta área fue la misma para todas las imágenes histológicas de todos los grupos de individuos que formaron parte de este estudio.

Además, se utilizó una aplicación del programa que tenía como función delinear el contorno de los túbulos seminíferos. Durante la caracterización de las estructuras, el programa realizó una base de datos del perímetro de los túbulos seminíferos y arrojó los datos de las siguientes variables, área, perímetro, diámetro mayor, diámetro menor y el número de túbulos medidos para cada imagen histológica evaluada. Una vez obtenidos los datos de las medidas de los túbulos seminíferos, se evaluaron también para cada imagen histológica, los túbulos con espermátidas elongadas por unidad de área.

4.8 Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de correlación de Pearson (Proc corr) para determinar la

asociación entre las variables evaluadas en el semen, además de un análisis de varianza para los periodos evaluados (invierno y primavera) y una prueba de medias (Tukey) para la separación de los periodos El modelo utilizado fue:

$$y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

En donde:

i= machos muestreados.

j= número de muestreos.

y_{ij}= presencia de espermatidas elongadas y células de Sertoli en el i-ésimo periodo del j-ésimo animal.

μ= efecto de la media.

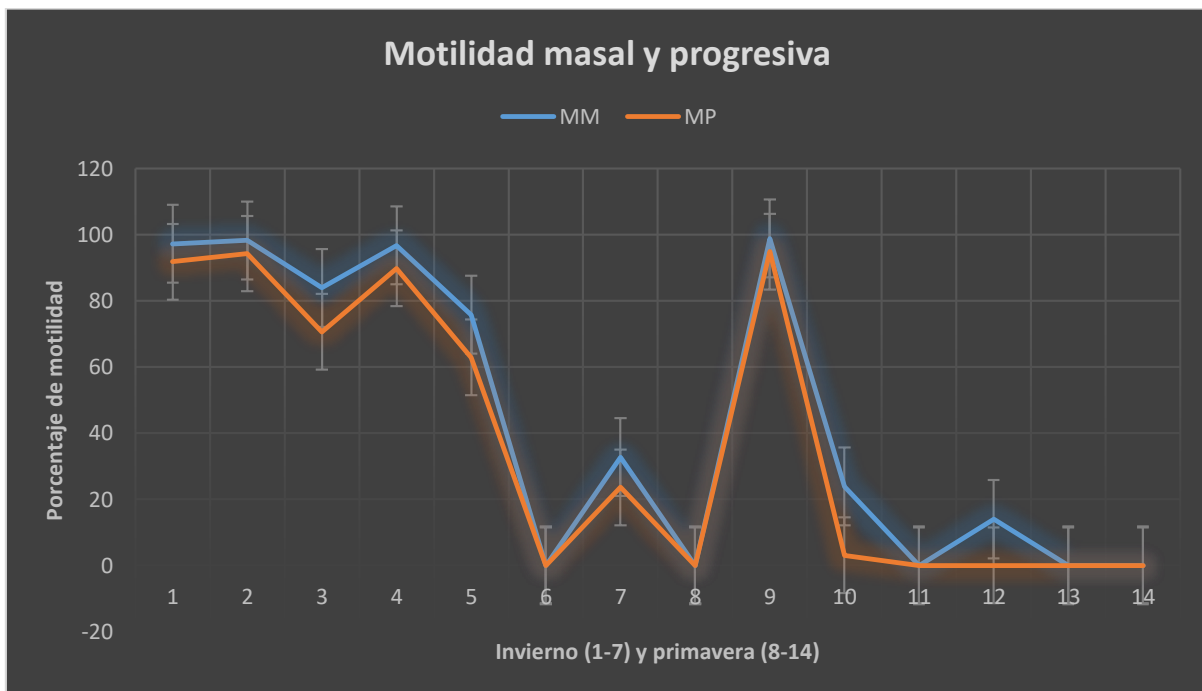
T_i= efecto del i-ésimo periodo.

Se utilizó un análisis de varianza para obtener el efecto de las épocas sobre el área de los túbulos seminíferos y la proporción de las espermatidas elongadas presentes en los túbulos.

V. RESULTADOS

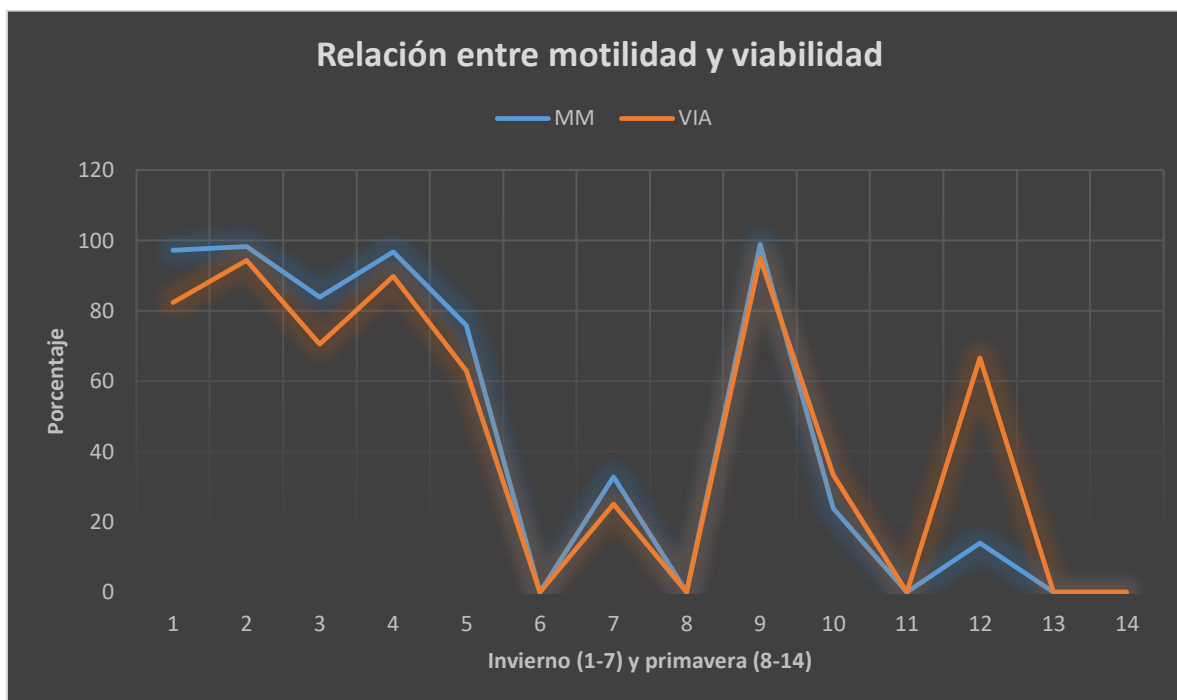
5.1 Evaluación seminal

El comportamiento de las evaluaciones del semen tanto para la Motilidad Masal (MM), como para la Motilidad Progresiva (MP) fueron semejantes como se muestra en la gráfica 1. El efecto entre los dos periodos resultó ser significativo ($P < 0.05$) tanto para la variable de respuesta MM como para la MP y la viabilidad espermática VIA.



Gráfica 1. Comportamiento del porcentaje de motilidad masal (MM) y motilidad progresiva (MP) de las muestras de semen evaluadas durante los periodos invierno y primavera.

El análisis de correlación mostró que las motilidades de los espermatozoides estuvieron fuertemente relacionadas con la viabilidad de los mismos ($MM = 0.92$, $MP = 0.89$); es decir; que al comparar las tendencias de la motilidad masal (Gráfica 1) y la viabilidad espermática (Gráfica 2) se observó que al bajar la MM, la capacidad fecundante (VIA) de los espermatozoides también disminuyó.



Grafica 2. Muestra la relación positiva entre la motilidad y viabilidad fecundante de los espermatozoides en cada periodo.

Además se corre una prueba de medias con Tukey ($P < 0.05$) donde las dos motilidades (MM y MP) existen diferencias entre los periodos; aunque no hay evidencias suficientes para afirmar lo mismo en la Viabilidad al comparar las medias de los periodos.

Cuadro 2. Prueba de medias para las variables evaluadas en el semen

Periodo	Motilidad Masal	Motilidad progresiva	Viabilidad espermática
1	69.24 ^a	61.87 ^a	60.71 ^a
2	19.54 ^b	14.00 ^b	27.84 ^a

^{a, b} diferencias de $p < 0.05$ entre periodos

5.2 Desarrollo Celular en testículo

En los cortes histológicos los resultados mostraron la presencia de espermátidas elongadas en túbulos seminíferos (1-8) durante el invierno; en una proporción

de 0 a 1 entre el número de túbulos totales y el número de túbulos con espermatidas elongadas. Además, se calculó el área de estos túbulos en conjunto siendo ésta de 69436.09 μm^2 (área total: 72112.11 μm^2). Con los cortes histológicos del testículo (136 en total) se buscó en el microscopio (40X) diferenciar los cambios en las células debido al desarrollo celular a través de las épocas de muestreo e identificar el cambio células como a continuación se ejemplifica en la imagen.

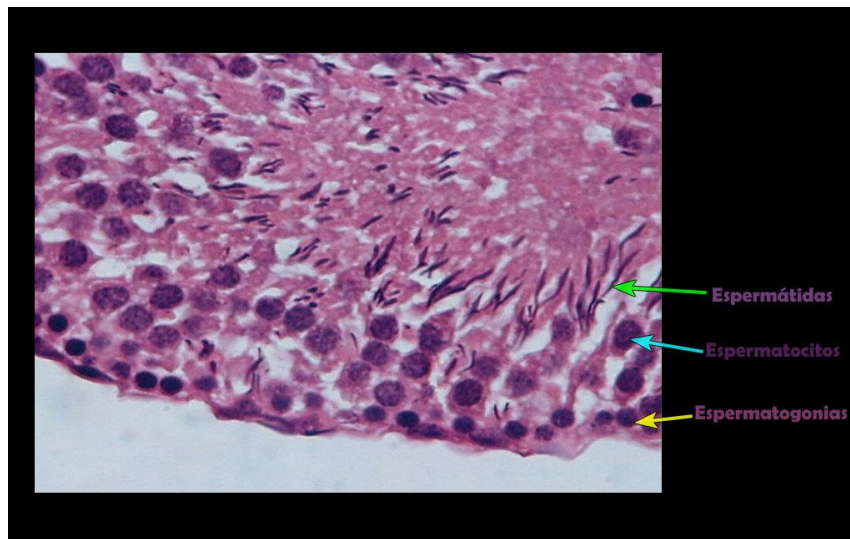


Figura 5: Ejemplo de las formaciones celulares dentro del proceso de espermatogénesis que pueden observarse dentro de los cortes histológicos del estudio.

El desarrollo celular de las gonadas no fue igual durante los periodos de muestreo ya que hubo diferencias ($P < 0.05$) en la presencia de las espermatidas elongadas en los tubulos seminiferos lo cual denota un cambio en el desarrollo celular en durante las épocas del muestreo. En la figura 6 se muestra un corte hecho durante el desarrollo celular en el invierno donde hubo más formaciones celulares, producto de la espermatogénesis. En la figura 7 muestra un túbulo seminífero a finales de la primavera que mostro escasas formaciones celulares.

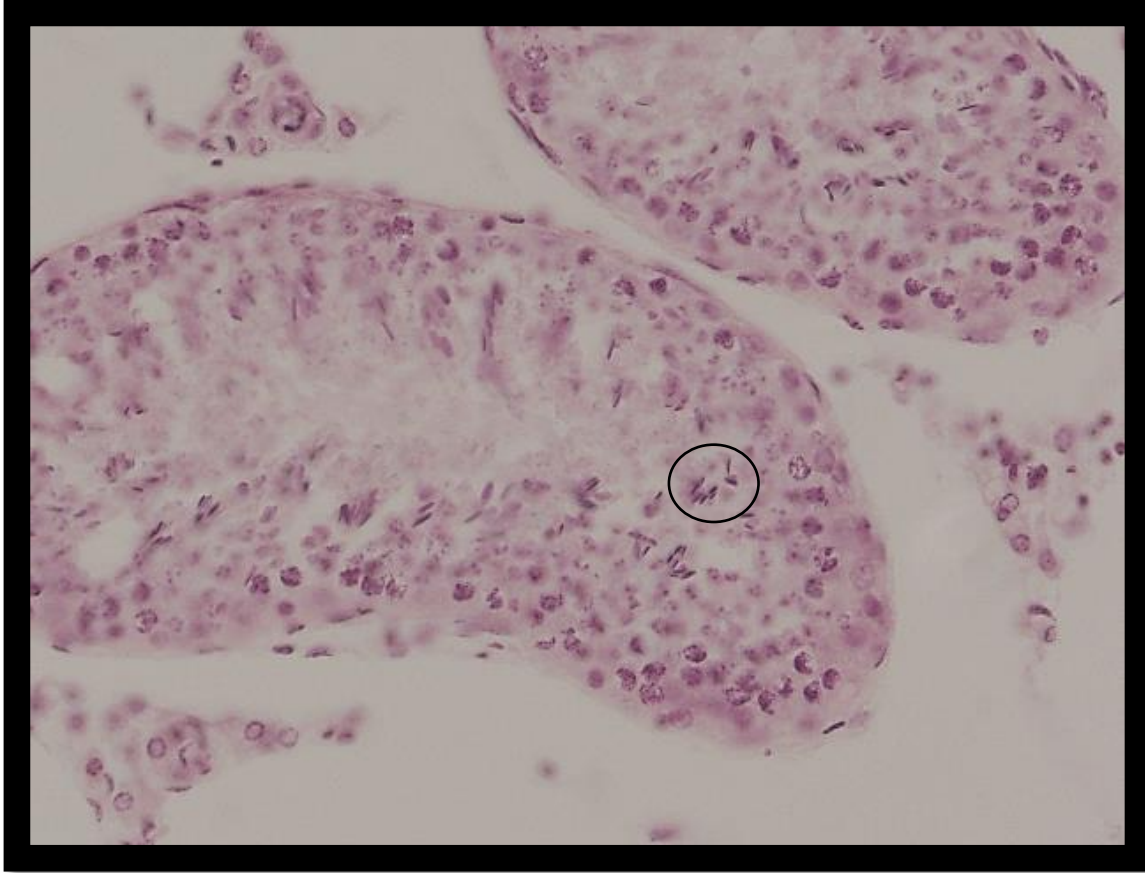


Figura 6: Túbulos en periodo reproductivo (diciembre). La imagen es el área total de muestreo ($72112.11\mu\text{m}^2$). El área de los en total fue calculada ($48025.05\mu\text{m}^2$). En los dos hay espermatidas elongadas (EE, forma de arroz obscuro) en el círculo.

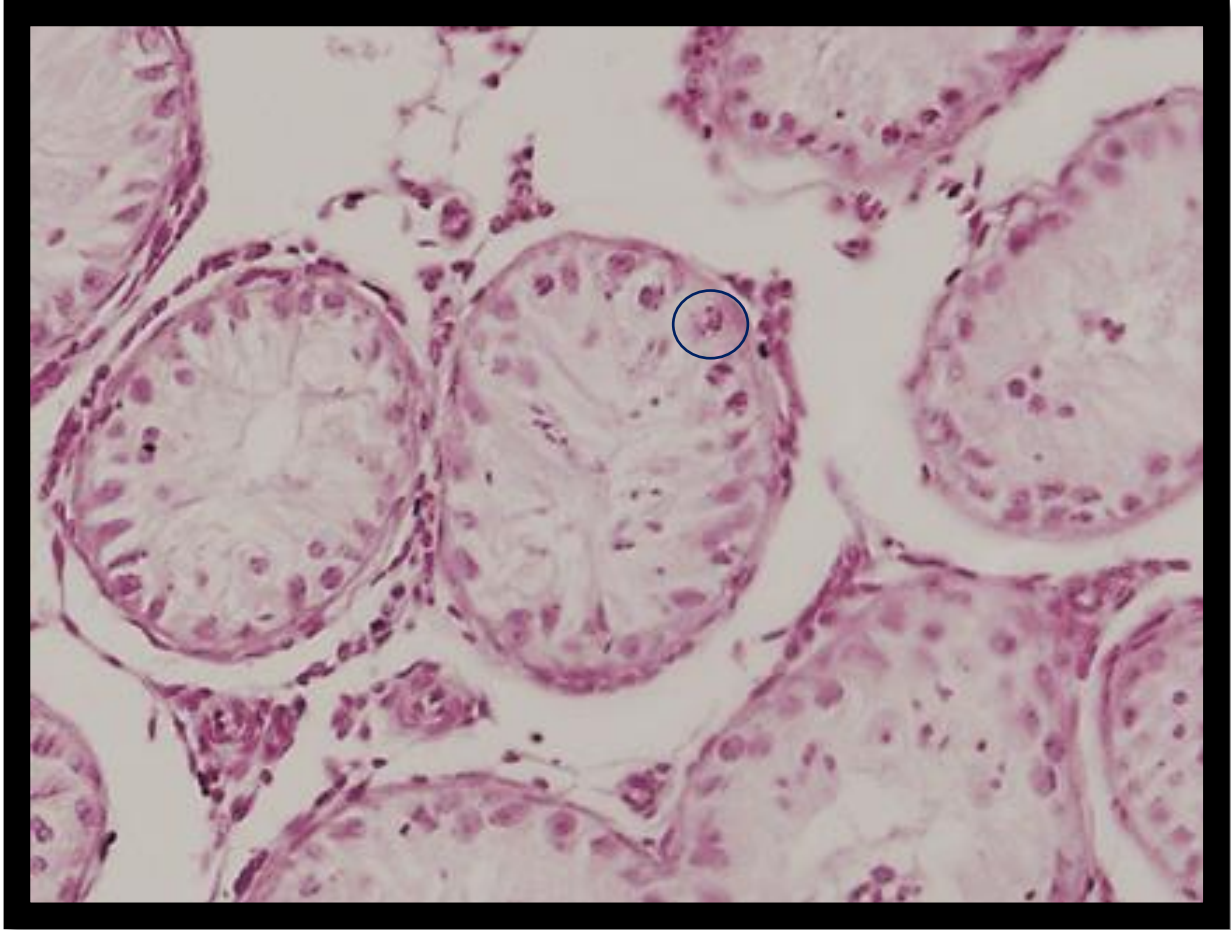
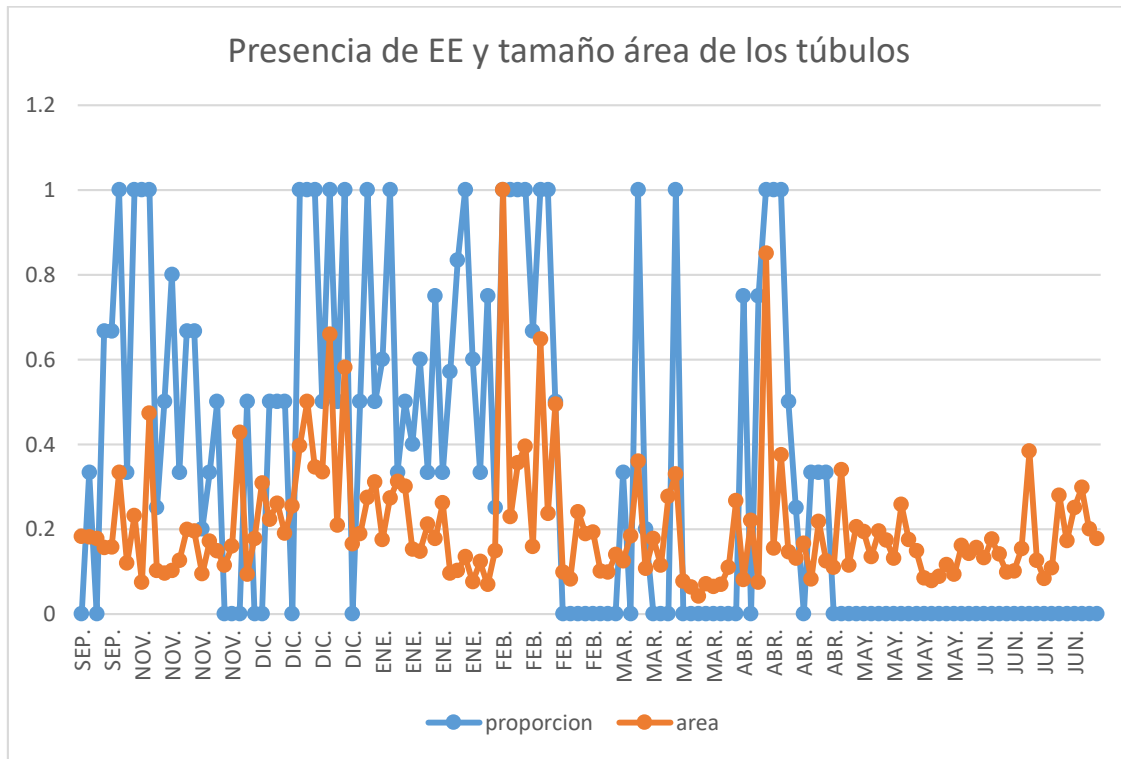


Figura 7. Túbulo en periodo no reproductivo (junio). Mismo área de muestreo. No hay presencia de EE. El tamaño de los túbulo es más pequeño, por lo tanto aumenta el número de ellos en el área muestreada. El área total calculada es $43075.38 \mu\text{m}^2$. En el círculo ejemplo de espermatogonias.

La proporción es la relación entre el número de total de túbulo observado en una muestra y el número de túbulo que tenían presencia de EE, es decir, si tenemos 3 túbulo y en 2 había EE entonces la proporción fue: 0.66. El área dentro de esta grafica es la proporción entre el área de los túbulo con respecto al área total muestreada. De esta manera se grafica para ver el comportamiento de las variables para someterlas a un análisis estadístico. El tiempo del muestreo se agrupa en dos periodos para visualizar una mejor respuesta estadística (invierno y primavera).

Acorde a los análisis estadísticos se encontró diferencias ($P < 0.05$) entre las épocas evaluadas, explicados por la proporción y el área de los túbulo

seminíferos. Hay una correlación ($P < 0.05$), entre el tamaño de los túbulos con la presencia de EE; Es decir, a mayor tamaño de túbulos =presencia de EE, y a menor tamaño =ausencia de EE gráfica 3.



Grafica 3. Relación entre la proporción de túbulos y presencia de EE, con el área de los túbulos

La prueba de medias mostró que entre los periodos (invierno y primavera) hay diferencias ($P < 0.05$) respecto a la proporción de túbulos con EE; es decir, que de septiembre a febrero hay claro proceso de espermatogénesis ya que están presentes las espermatidas elongadas y que a partir de marzo la multiplicación celular en el testículo entra en proceso de reposo. La prueba de medias no refleja cambios en el área que ocupan los túbulos seminíferos respecto al área de muestreo, pero si podemos asegurar que los túbulos observados en un área dada, aumentarían cuando el proceso de la espermatogénesis disminuya.

Dentro de los cortes histológicos se hizo el conteo de las células de Sertoli (SC) presentes en los túbulos seminíferos (64 cortes) haciendo uso del microscopio con el objetivo 100X. Dentro de este campo de visión solo se puede observar un solo túbulo o parte de él; teniendo un promedio 3.4 SC en época reproductiva (invierno) y 3.8 SC en época no reproductiva (primavera) con rangos de conteo entre 0 y 8 células por túbulo.

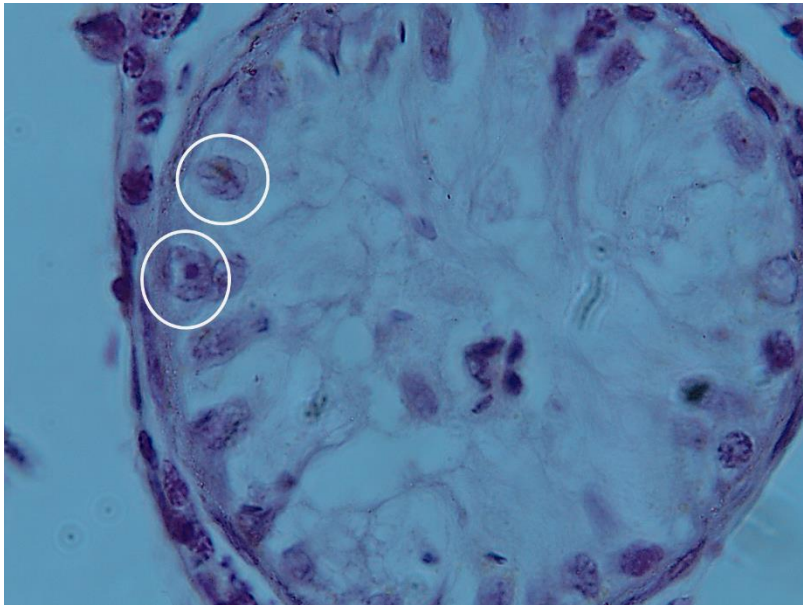


Figura 8. En los círculos se muestran las células de Sertoli en periodo no reproductivo (100x)

VI. DISCUSIÓN

La estacionalidad reproductiva está presente en muchos de los mamíferos alrededor del mundo y el venado cola blanca está dentro de ese gran grupo. En esta investigación en base a la evaluación seminal notamos que el cola-blanca tiene épocas de apareamiento marcadas en los meses de noviembre a inicios de febrero lo que coincide con lo reportado por Arenas *et al.* (2011). Estos mismos autores mencionan que la producción de semen está bien definida de octubre a enero, coincidiendo con varios autores (**Robinson et al, 1965; Lambiase et al, 1972; Mirarchi et al, 1977; Scanlon et al, 1983; Jacobson et al, 1989; Asher et al, 2000; Umaphy et al, 2007**) en que la producción de espermatozoides del venado cola blanca es estacional y no durante todo el año. Arenas *et al.* (2011) menciona haber encontrado un líquido ámbar junto con el semen que provocaba la muerte de los espermatozoides a mediados de febrero; este suceso coincidió durante el desarrollo de esta investigación en uno de las muestras. Este fue un único evento por lo que no se pudo identificar el origen de este líquido, pero que nos hace suponer que es producto de una o varias de las glándulas accesorias.

Uno de los cuestionamientos fue si había coincidencia en el desarrollo celular del testículo con la calidad del semen. Acorde a los resultados de la caracterización de las estructuras celulares presentes en los túbulos seminíferos durante el ciclo anual de reproducción, podemos decir que los comportamientos son similares, es decir, cuando el semen presentó una calidad buena (Arenas *et al.*, 2011) había presencia de espermátidas elongadas, producto de una alta actividad de la espermatogénesis. Además en los meses de mayo y junio cuando no se obtuvo muestras seminales a pesar de una buena estimulación, los cortes histológicos mostraron poco desarrollo celular, estando presentes solo un número reducido de espermatogonias.

Blottner *et al.* (1996) mencionan que la masa de testículos de ciervos adultos

alcanzó un máximo durante el apareamiento desde mediados de julio hasta mediados de agosto (temporadas invertidas respecto a esta investigación). El tamaño gonadal correspondía a un número de espermatozoides alto en la fase de diferenciación. En el período de apareamiento, los espermatozoides epididimales fueron de la más alta competencia morfológica y funcional. Lo cual coincide en el presente trabajo sobre la viabilidad alta durante el apareamiento.

Así mismo encontramos que hay cambios notorios sobre el tamaño de los túbulos seminíferos acordes al desarrollo celular, resultado de la espermatogénesis. Al respecto Blottner *et al.* (1996) mencionan que la proliferación y la apoptosis celular en el testículo, revelaron un patrón opuesto durante el ciclo anual; la apoptosis más intensa ocurrió durante el tiempo de la involución del testículo. Este evento lo asocian a la producción de testosterona que mostró un patrón bifásico; debido a que se redujo rápidamente desde el valor más alto en el pico de la reproducción a concentraciones muy bajas a partir de entonces. Esto mismo coincide con lo reportado por Bubenik y Schams (1986), demostrando que los niveles altos de testosterona se presentan durante el apareamiento y los más bajos cuando el testículo tiene su menor tamaño en el ciclo anual.

Las afirmaciones anteriores también se muestran en otras especies de mamíferos por ejemplo en el visón americano (*Mustela vison*) en el trabajo de Blottner *et al.* (1999) donde mencionan que la masa de testículo es significativamente más alta durante el período de apareamiento, coincidiendo a su vez con un mayor número de espermatozoides por gramo de masa testicular y el pico de la concentración de testosterona en comparación con los períodos no reproductivos.

Klonisch *et al.*, (2006) mencionan que los ciclos circanuales de crecimiento testicular e involución implican cambios significativos en la estructura y función tanto del compartimento testicular tubular como intersticial.

En esta investigación no hubo diferencias en el número de células de Sertoli

presentes en el ciclo anual. Al respecto Klonisch *et al.*, (2006) mencionan que las células germinales y las células de Sertoli de los túbulos seminíferos y las células intersticiales de Leydig presentan alteraciones morfológicas y fisiológicas significativas durante los cambios estacionales. En contraste, el grupo de células germinales, las células de Sertoli y Leydig persisten como una población de células numéricamente constante en el testículo de ciervo.

VII. CONCLUSIONES

Durante los muestreos de semen se observó que la calidad es variable a través del ciclo reproductivo del venado. Además, los meses de noviembre, diciembre y enero; son aquellos que presenta las más altas evaluaciones de calidad y que corresponden al periodo de apareamiento de la especie. Los meses de marzo a julio la calidad baja hasta el punto de no obtener semen.

El desarrollo celular en los testículos del venado cola blanca es variable (anexos) y relacionado con la producción de semen; ya que el desarrollo celular completo de la espermatogénesis estuvo en los meses de noviembre-enero. En el mes de junio solo se observaron las espermetogonias, detectando una fase de dormancia o letargo en el proceso de la espermatogénesis.

Existe un número constante de Células de Sertoli en el ciclo anual en contraste con las células germinales donde se lleva a cabo la espermatogénesis. Este trabajo enfatiza la intrincada relación entre la diferenciación celular estacional, las redes de factores de crecimiento intratesticulares y su impacto en la dinámica funcional durante los cambios estacionales en el testículo del venado.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aguirre V., Orihuela A. and Vázquez R. 2007. Effect of semen collection frequency on seasonal variation in sexual behavior, testosterone, testicular size and semen characteristics of tropical hair rams (*Ovis aries*). *Trop. Anim. Health Prod.* 39:271-277.
- Albrecht U. 2012. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron.* 74: 246-260.
- Álvarez R. J. y Medellín R. A. 2005. *Odocoileus virginianus*. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto U020. México. D.F.
- Aoki A. and Fawcett DW. 1978. Is there a local feedback from the seminiferous tubules affecting the activity of the Leydig cells?. *Biology of Reproduction.* 19: 144 -158.
- Arambepola N. K., Bunick D., Cooke PS. 1998a. Thyroid hormone effects on androgen receptor messenger RNA expression in rat Sertoli and peritubular cells *Journal of Endocrinology* 156: 43-50.
- Arambepola N. K., Bunick D., Cooke PS. 1998b. Thyroid hormone and follicle stimulating hormone regulate Mullerian-inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in cultured neonatal rat Sertoli cells. *Endocrinology* 139: 4489-4495.
- Arellano-Lezama T., Gallegos-Sánchez J., Pro-Martínez A., Gómez-Merino F., Cortes-Romero C., Valencia-Méndez J. 2015. La nutrición y su efecto en las células testiculares del carnero. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados.
- Arenas B. P. 2011. El fotoperíodo y su relación con la reproducción del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus miquihuanensis*) en el altiplano potosino. [master's thesis]. Montecillo (Estado de México): Colegio de Postgraduados.
- Asher, G. W., Berg, D. K., Evans, G. 2000. Storage of semen and artificial insemination in deer. *Journal Animal Reproduction Science.* 62: 195-211. (2000).
- Aurich C., Burgmann F. and Hoppe H. 1996. Opioid regulation of LH and prolactin release in the horse identical or independent endocrine pathways? *Animal Reproduction Science.* 44: 127-134.

- Aurich C., Schlote S., Hoppe H. and Schlote S. 1994. Involvement of endogenous opioids in the regulation of LH and testosterone release in the male horse. *Journal of Reproduction and Fertility*. 102: 327-336.
- Aurich J. E., Kühne A., Hoppe H. and Aurich C. 1996b. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*. 46:791-797.
- Bass J. and Takahashi J.S. 2010. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science*. 330: 1349-1354.
- Berndtson W. E., Pickett B. W. and Nett T. M. 1974. Reproductive physiology of the stallion: IV. Seasonal changes in the testosterone concentration of peripheral plasma. *Journal of Reproduction and Fertility*. 39: 115-121.
- Blottner S. L., Hingst O., Meyer H. H. 1996. Seasonal spermatogenesis and testosterone production in roe deer (*Capreolus capreolus*). *J. Reprod Fertil*. 108(2):299-305.
- Bronson F. H. 1989. *Mammalian reproductive biology*. The University of Chicago Press. Chicago, EEUU. pp 325.
- Bubenik G. A. 2006. Seasonal regulation of deer reproduction as related to the antler cycle- a review. *Veterinarski Arhiv* 76: 275-285.
- Bubenik G. A. and Schams D. 1986. Relationship of age to seasonal levels of lh, fsh, prolactin and testosterone in male, white-tailed deer. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 83A, No. 1, pp. 179-183, 1986
- Bubenik G. A., Bubenik A. B. 1985. Seasonal variations in hair pigmentation of white-tailed deer and their relationship to sexual activity and plasma testosterone. *Journal of Experimental Zoology* 235: 387-395.
- Chandonnet I., Roberts K. D., Chapdelaine A. and Manjunath P. 1990. Identification of heparin- binding proteins in bovine seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development*. 26:313- 318.
- Chimineau P., Malpoux B., Brillard JP. and Fostier A. 2007. Seasonality of reproduction and production in farm fishes, birds and mammals. *Animal*. 1:419-432.
- Clutton-Brock T., Guinness F. E., Albon S.D. 1982. *Red deer: Behavior and ecology of two sexes*. University of Chicago. Chicago. EEUU. pp 378.
- Cochran R. C., Judy J. K., Parker, C.F. and Hallford, D. M. 1985. Prefreezing and post-thaw semen characteristics of five ram breeds collected by electroejaculation. *Theriogenology*, 23, 431-440.
- Cox J. E., Redhead PH. and Jawad NMA. 1988. The effect of artificial photoperiod at the end of the breeding season on plasma testosterone concentrations in stallions. *Australian Veterinary Journal*. 65: 239-241.

- Dacheaux J., Gatti J. L. and Dacheaux F. 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microscopy Research and Technique*. 61:7-17.
- Daza A. A. 1997. Reproducción y sistemas de explotación del ganado ovino. Mundi Prensa, Madrid. 250 pp.
- Demarais S., Millar K. V. and Jacobson H. A. 2000. Chapter 29: White-tailed deer pp. 601-628 in Demarais, S and Krausman, P. R. 2000. *Ecology and Management of Large Mammals of North America*. Prentice-Hall, Inc. New Jersey USA.
- Desnoyers L. and Manjunath P. 1992. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *Journal of Biological Chemistry*. 267:10149-10155.
- Dorrington J. H. and Armstrong DT. 1975. Follicle-stimulating hormone stimulates estradiol-17 β synthesis in cultured Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 72(7):2677-81.
- Drew M. y Amass K. 2004. Semen production and artificial insemination of white-tailed deer. Safe-Capture International, INC. Mt. Horeb, Wisconsin.
- Durán-Ramírez F., Hernández-Gómez HA. and Latorre-Neme DF. 2008. Fisiología de la reproducción en carneros. En: *Manual de explotación y reproducción en ovejas y borregos*. Grupo Latino Ltda (Eds). Colombia. 244-288 pp.
- Ebling F. J. 1972. The response of the cutaneous glands to steroids. *General and Comparative Endocrinology Supplement 3*: 228-237.
- El Omari B., Lacroix A. and Saboureau M. 1989. Daily and seasonal variations in plasma LH and testosterone concentrations in the adult male hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 86: 145-155.
- El-Hajj Ghaoui R., Gillian L., Thomson PC., Evans G. and Maxwell WMC. 2007. Effect of seminal plasma fractions from entire and vasectomized rams on the motility characteristics, membrane status, and in vitro fertility of ram spermatozoa. *Journal of Andrology*. 28:109-122.
- Evans G. & Maxwell W. M. C. 1990. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Buterworths, Pty, Limited, Sydney, Australia.
- Fowler PA. 1988. Seasonal endocrine cycles in the European hedgehog. *Erinaceus europaeus*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 84: 259-272.
- Fuentes V., Sánchez V., González H., Fuentes P., García A. y Rosiles R. 1997. La función endocrina del testículo en el carnero criollo mexicano durante las diferentes épocas del año y su control opioadrenérgico durante el anestro. *J. Vet. Med.* 44:259-263.

- Galindo-Leal C. y Weber M. 1998. El venado de la Sierra Madre Occidental. Ecología, manejo y conservación. EDICUSA-CONABIO. Primera edición. 272pp.
- Gallegos-Sánchez J., Delaleu B., Caraty A., Malpaux B. and Thiéry JC. 1997 Estradiol acts locally within the retrochiasmatic area to inhibit pulsatile luteinizing-hormone release in the female sheep during anestrus. *Biology of Reproduction*. 56: 1544-1549.
- Gaspar-López E., Landete-Castillejos T., Estevez J. A., Ceacero F., Gallego L., García A. J. 2010. Biometrics, testosterone, cortisol and antler growth cycle in Iberian red deer stags (*Cervus elaphus hispanicus*). *Reproduction in Domestic Animals* 45: 243-249.
- Geist, V. 1994. Origin of the species. En *The Wildlife Series: Deer*. (Gerlach, D., Atwater, S. and Schnell J. Editors). Stackpole Books. Pennsylvania. USA. 2-13 pp.
- González G. Risbrigder G., and de Krester D. 1988. In vitro synthesis and release of inhibin in response to FSH stimulation by isolated segments of seminiferous tubules from normal adult male rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 59: 179-185.
- González P. G. y Briones S. M. 2000. Venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en comunidades indígenas de Oaxaca. *Investigación Hoy*. 94:20-27.
- Grosse J., Maywood ES., Ebling FJP. and Hastings MH. 1993. Testicular regression in pinealectomized Syrian hamsters following infusions of melatonin delivered on non-circadian schedules. *Biology of Reproduction*. 49: 666-674.
- Hafez. E. S. E. 1984. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 4^a Edición Edit. Interamericana. México.
- Haigh J. C. 1984. Artificial insemination of two white-tailed deer. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185:1446-1447 pp.
- Haigh J. C., Cates W.F., Glover G. J., Rawlingst N.C. 1984. Relationships between seasonal changes in serum testosterone concentrations, scrotal circumference and sperm morphology of male wapití (*Cervus elaphus*). *Journal of Reproduction and Fertility* 70: 413-418.
- Hall RE., Birrell S. N., Tilley WD. and Sutherland R. L. 1994. MDA-MB-453, an androgen-responsive human breast carcinoma cell line with high level androgen receptor expression. *European Journal of Cancer*. 30A: (4):484-90.
- Halls L. K. (ED). 1984. White-tailed deer: Ecology and Management. Stackpole Books, Harrisburg, Pennsylvania. 870 p.
- Henricks D. M., Kouba A. J., Lackey BR., Boone W. R. and Gray SL. 1998. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and

- its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. *Biology of Reproduction*. 59:330-337.
- Herrera-Alarcón J., Villagómez-Amezcuca E., González-Padilla E., Jiménez-Severiano H. 2007. Stereological Study of postnatal testicular development in Blackbelly sheep. *Theriogenology*. 68: 582-591.
- Huhtaniemi L. T., Bergh A., Nikula H. and Damber JE. 1984. Differences in the regulation of steroidogenesis and tropic hormone receptors between the scrotal and abdominal testes of unilaterally cryptorchid adult rats. *Endocrinology*. 115: 550-555.
- Hyttel P. 2010. Gametogenesis In: *Essentials of Domestic Animal Embriology*. Eds. Edwards R, J Rodenhuis. Saunders Elsevier. 47-55 pp.
- Jacobson H. A., Bearden, H.J. 1989. Artificial Insemination Trials White-Tailed Deer. *Journal of Wildlife Management*. 53 (1): 224-227.
- Jannini E. A., Crescenzi A., Rucci N., Screponi E., Carosa E., de Matteis A., Macchia E., d'Amati G., D'Armiento M. 2000. Ontogenetic pattern of thyroid hormone receptor expression in the human testis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 85: 3453-3457.
- Jannini E. A., Ulisse S., D'Armiento M. 1995. Thyroid hormone and male gonadal function *Endocrine Reviews*. 16: 443-459.
- Johnston D. S., Russell LD., Friel P. J. and Griswold MD. 2001. Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation. *Endocrinology*. 142:2405-8.
- Josso N., di Clemente N., Gouedard L. 2001. Anti-Mullerian hormone and its receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 179: 25-32.
- Kao C., Schaeffer D. J. and Jackson G. L. 1992. Different neuroendocrine systems modulate pulsatile luteinizing hormone secretion in photosuppressed and photorefractory ewes. *Biology of Reproduction*. 46: 425-434.
- Karsch F. J., Dahl GE., Evans NP., Manning JM., Mayfield KP., Moenter SM. and Foster DL. 1993. Seasonal changes in gonadotrophin-releasing hormone secretion in the ewe: alterations in response to the negative feedback action of estradiol. *Biology of Reproduction*. 49: 1377-1383.
- Kerr J. B. and Donachie K. 1986. Regeneration of Leydig cells in unilaterally cryptorchid rats: evidence for stimulation by local testicular factors. *Cell and Tissue Research*. 245: 649-655.
- Kerr J. B. and Sharpe RM. 1985. Stimulatory effect of follicle-stimulating hormone on rat Leydig cells. A morphometric and ultrastructural study. *Cell and Tissue Research*. 239 (2): 405-15.

- Killian G. J., Chapman DA. and Rogowski LA. 1993. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*. 49:1202–1207.
- Klonisch T., Schön J., Hombach-Klonisch S. and Blottner S. 2006. The roe deer as a model for studying seasonal regulation of testis function. *Int J Androl*. 29(1):122-8.
- Knobil E., Plant TM., Wildt L., Belchetz PE. and Marshall G. 1980. Control of the rhesus monkey menstrual cycle: permissive role of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*. 21; 207 (4437):1371-3.
- Kreeger T. J. 2002. *Handbook of wildlife chemical immobilization*. Published by Wildlife Pharmaceuticals, Inc., Fort Collins, Colorado, USA.
- Krester D. M., Loveland KL., Meinhardt A., Simorangkir D. and Wreford N. 1998. Spermatogenesis. *Human Reproduction*. 13 (1): 1-8.
- Krester DM. and Kerr JB. 1994. The cytology of the testis. In Knobil. E. and Neill, J.D. (eds), *Physiology & Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 1177-1290.
- Lambiase, J. T., Amann, R. P., Lindzey, J. S. 1972. Aspects of reproductive physiology of male White-tailed deer. *Journal of Wildlife Management*. 36: 868-875 (1972).
- Lerchl A., Sotiriadou S., Behre HM., Pierce J., Weinbauer GF., Kliesch S. and Nieschlag E. 1993. Restoration of spermatogenesis by follicle-stimulating hormone despite low intratesticular testosterone in photoinhibited hypogonadotropic Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Biology of Reproduction*. 49: 1108-1116.
- Lesson S. T., Leeson CR. and Paparo AA. 1990. Capítulo 16: Aparato reproductor masculino. En: *Texto Atlas de Histología*. Interamericana-McGraw-Hill. México, D.F. 635-667 pp.
- Lincoln G. A. 1971. The seasonal reproductive changes in the red deer stag (*Cervus elaphus*). *Journal of Zoology London* 163: 105-123.
- Lincoln G. A. 1994. Effects of placing micro-implants of melatonin in the pars tuberalis, pars distalis and the lateral septum of the forebrain the secretion of FSH and prolactin and testicular size in rams. *J. Endocr.* 142:267-276.
- Lincoln G. A. and Clarke I. J. 1997. Refractoriness to a static melatonin signal develops in the pituitary gland for the control of prolactin secretion in the ram. *Biology Reproduction* 57:460-467.
- Lincoln G. A., Guinness F., Short R. V. 1972. The way in which Testosterone controls the social and sexual behavior of the red deer stag (*Cervus elaphus*). *Hormones and Behavior* 3: 375- 396.
- Lincoln G. A. 1984. Central effects of photoperiod on reproduction in the ram revealed by the use of a testosterone clamp. *Journal of Endocrinology*. 103: 233-241.

- Lincoln G. A. 1994. Effects of placing micro-implants of melatonin in the pars tuberalis, pars distalis and the lateral septum of the forebrain on the secretion of FSH and prolactin, and testicular size in rams. *Journal of Endocrinology*. 142: 267-276.
- Lincoln G. A. and Maeda KI. 1992. Effects of placing micro-implants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area in rams. *Journal of Endocrinology*. 132: 201-215.
- Lincoln G. A. and Short RV. 1980. Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Recent Progress in Hormone Research*. 36: 1-52.
- Lincoln G. A. and Ssewanyana E. 1989. Opioid peptides and seasonal reproduction In: *Brain Opioid Systems in Reproduction*. Eds. Dyer RG and Bicknell RJ. Oxford Univ. Press, Oxford. 53-69 pp.
- Lincoln G. A., Lincoln CE. and Mc Neilly AS. 1990. Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*. 88: 623-633.
- Lindsay D. R. 1991. Reproduction in the sheep and goat. In *Reproduction in domestic animals*. Ed. Cupps PT. 4th edition. Academic Press, San Diego. USA. 491-515 pp.
- Lyon M. F., Glenister PH. and Lamoreux ML. 1975. Normal spermatozoa from androgen- spermatogenesis. *Nature*. 258:620-2.
- Mackay S. 2000. Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. *International Review of Cytology*. 200: 47-99.
- Mali P., Virtanen L. and Parvinen M. 1987. Expression of vimentin in rat Sertoli and spermatogenic cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 513:310-311.
- Mali P., Welsh MJ., Toppari J., Vihko KK. and Parvinen M. 1985. Cell interactions in the rat seminiferous epithelium with special reference to the cellular distribution of calmodulin. *Medicine and Biology*. 63:237-244.
- Malpoux B., Viguié C., Skinner DC., Thiéry JC. and Chemineau P. 1997. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Research Bulletin*.44: 431-438.
- Mandiki S. N. M., Derycke G., Bister J. L. and Paguay R. 1998. Influence of season and age on sexual maturation parameters in Texel, Suffolk and Ille-de-France rams. *Small Rumin Research*. 28:81.88.
- Márquez-Orozco M.C. 1997. Aparato reproductor masculino: Espermatogenesis. En: *Biología del desarrollo*. Ed. Márquez Orozco A. Edit. UNAM. P. 55.
- Marshall FH. 2008. The role of GABA (B) receptors in the regulation of excitatory neurotransmission. *Results and Problems in Cell Differentiation*.44:87-98.

- Martin G. B., Blache D., Miller DW. and Vercoe PE. 2010. Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant. *Animal*. 4:7, 214–1226.
- Martin GB., Hötzel MJ., Blache D., Walkden-Brown SW., Blackberry MA., Boukliq R., Fisher JA and Miller DW. 2002. Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of response to photoperiod by annual cycle of food supply. *Reproduction, Fertility and Development*. 14: 165–175.
- Means AR. and Vaitukaitis J. 1972. Peptide hormone "receptors": specific binding of 3 H-FSH to testis. *Endocrinology*. 90 (1):39-46.
- Medina, G. G. 1990. Taxonomía, distribución y datos bioecológicos de los cérvidos con especial atención al venado cola blanca. Curso de capacitación para Profesionales en Manejo de Fauna Silvestre. Memorias. Pp. 9-33.
- Meites J., Huang HH. and Steger RW. 1981. Differences in negative and positive feedback of gonadal steroids on release of gonadotropins and prolactin in young and old rats. *Experimental Brain Research Supplement*. 3:151-7.
- Minnerman, KP. and Wurtman RJ. 1975. Effects of pineal compounds on mammals. *Life Science*. 17: 1189-1200.
- Mirarchi, Ralph E., Scanlon, Patrick F., Kirkpatrick, Roy L. 1977. Annual changes in spermatozoan production and associated organs of white-tailed deer. *Journal of Wildlife Management* 41: 92-99 (1977).
- Montalvo A. C. E. 2010. Manual de la Técnica Histológica. Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Montiel O. S., Arias R. y Dickinson F. 2000. La cacería tradicional en el norte de Yucatán: una práctica comunitaria. *Revista de Geografía Agrícola*. 29:43-51.
- Naranjo J. E., Guerra M. M., Bodmer R. E. y Bolaños J. E. 2004. Subsistence hunting by three ethnic groups of the Lacandon Forest, México. *Journal of Ethnobiology*. 24:233-253.
- Neria V. J. y Solar P. A. J., 1984. Comparación entre la motilidad y morfología de los espermatozoides de carnero antes y después de la congelación de muestras obtenidas con vagina artificial y electroeyaculado. Tesis de Licenciatura. FESC, UNAM, México.
- O'Shaughnessy P.J. 2014. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 29: 55-65.
- Olivera M., Ruiz T., Tarazona A. and Giraldo C. 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. Vol. 19:4.

- Ortega S. J. A., Mandujano S., Villarreal J., Di Mare M. I., López A. H., Correa M. y Molina M. 2011. White tailed deer in Latin America. En D. Hewitt, editor. *Biology and management of white-tailed deer* (pp.565-597). CRC Press, Boca Raton, Florida, EUA.
- Palazuelos P., Tellez, R. 1986. Analgesia disociativa remota en el venado. I simposio sobre el venado en México. *Memorias. FMVZ. UNAM. AZARM. México.*
- Parvinen M. 1982. Regulation of the seminiferous tubules. *Endocrine Reviews.* 3: 404-417.
- Parvinen M., Vihko KK. and Toppari J. 1986. Cell interactions during the seminiferous epithelial cycle. *International Review of Cytology.* 104: 115-147.
- Pelletier J. and Almeida G. 1987. Short light cycles induce persistent reproductive activity in Ile-de-France rams. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 34:215-226.
- Pérez-Pé R., Cebrián-Pérez J.A. and Muio-Blanco T. 2001. Semen plasma proteins prevent cold – shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology.* 56:425-434.
- Podesta EJ., Dufau ML., Solano AR. and Catt KJ. 1978. Hormonal activation of protein kinase in isolated Leydig cells. Electrophoretic analysis of cyclic AMP receptors. *Journal of Biological Chemistry.* 253: 8994-9001.
- Refsal K. R. 1986. Collection and evaluation of caprin semen. In Morrow D.A. *Current Therapy in Theriogenology.* W.B. Saunders, Philadelphia, 619-621.
- Rey RA., Musse M., Venara M. and Chemes HE. 2009. Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. *Microscopy Research Technique.* 72: 787-95.
- Reyes E., Bubenik G.A., Schams D., Lobos A. and Enriquez R. 1997. Seasonal changes of testicular parameters in southern pudu *Pudu pudu* in relationship to circannual variation of its reproductive hormones. *Acta Theriologica* 42: 25-35.
- Ritzen EM., Hansson V. and French FS. 1981. The Sertoli cell. In: *The Testis.* Eds. Burger H and D.M. de Krester. Raven Press, New York. 171-194 pp.
- Roa, R.M. 1986. El venado Cola Blanca como animal de zoológico. I Simposio sobre venado en México. *Memorias FMVZ. UNAM. AZARM. México.*
- Robinson JE. and Karsch FJ. 1984. Refractoriness to inductive day lengths terminates the breeding season of the Suffolk ewe. *Biology of Reproduction.* 31:656–663.

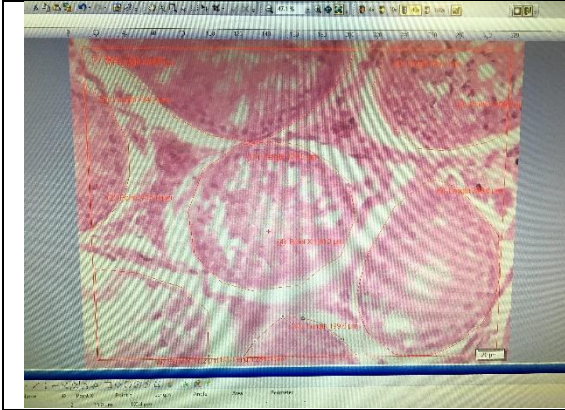
- Robinson, R. M., Thomas, J. W. and Marburger, R. G. 1965. The reproductive cycle of male white-tailed deer in central Texas. *Journal of Wildlife Management*. 29: 53-59 (1965).
- Russell LD. 1980. Sertoli-germ interrelations: a review. *Gamete Research*. 3: 179-202.
- Samour H. J. 1977. Inseminación artificial en Venado Cola Blanca (*Odocoileus virginianus*) Memoria del 1er Congreso Nacional de Zoología. ENA Chapingo, Méx.
- Sánchez-Luengo S., Aumüller G., Albrecht M., Sen PC., Röhm K. and Wilhelm B. 2004. Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca²⁺ATPase. *Journal of Andrology*. 25:234-244.
- Scanlon, Patrick F. and Lenker, David K. 1983. Male reproductive characteristics of white-tailed deer during November and December. *Theriogenology*. 19: 855-867 (1983).
- Schanbacher BD. and Lunstra DD. 1977. Acute and chronic effects of gonadotropin releasing hormone on reproductive characteristics of rams during the nonbreeding season. *Journal of Animal Science*. 44: 650-655.
- Setchell BP. 1978. Naturally occurring and induced dysfunctions of the testis,. In *The mammalian testis*. Eds. Setchell B. and P Eleck. Cornell University Press. Ithaca, New York. 359-342 pp.
- Sharpe RM. 1986. Paracrine control of the testis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 15: 185-207.
- Sharpe RM. 1994. Regulation of spermatogenesis. In *The Physiology of Reproduction* 2nd Edn. pp 1363-1434 Eds E Knobil and JD Neill. Raven Press, New York.
- Sharpe RM. 1999. Fetal/neonatal hormones and reproductive function of the male in adulthood. In *Fetal Programming: Influences on Development and Disease in Later Life* pp 187-194 Eds PMS O'Brien, T Wheeler and DJP Barker. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists Press, London.
- Sharpe RM., Mc Kinnell C., Kivlin C., Fisher JS. 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 126(6): 769-84.
- Silverman AJ. and Witkin JW. 1994. Biosynthesis of gonadotropin-releasing hormone during the rat estrous cycle: a cellular analysis. *Neuroendocrinology*. 59 (6): 545-51.
- Skinner MK. and Fritz IB. 1986. Identification of a non-mitogenic paracrine factor involved in mesenchymal-epithelial cell interactions between testicular peritubular cells and Sertoli cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 44: 85-97.

- Skinner MK. and Griswold MD. 1980. Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein. *Journal of Biology Chemistry*. 255 (20): 9523-9525.
- Smith LB., Walker WH. and O'Donnell L. 2014. Hormonal Regulation of Spermatogenesis through Sertoli cells by Androgens and Estrogens. In: *Sertoli Cell Biology*,. Ed. Griswold M. Elsevier Press. 488 pp.
- Smith, W. P. 1991. Mammalian Species: *Odocoileus virginianus*. *The American Society of Mammalogists*. No. 388. 1-13 pp.
- Sylvester S.R. and Griswold MD. 1993. Molecular biology of iron transport in the testis. In: *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. Ed. De Kresten D. Academic Press. San Diego, 311-23 pp.
- Tähkä KM. and Rajaniemi H. 1985. Photoperiodic modulation of testicular LH receptors in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*, S.). *Journal of Reproduction and Fertility*. 75: 513-519.
- Tähkä KM. 1989. Local control mechanisms in the testis. *The International Journal of Developmental Biology*. 33: 141-148.
- Thérién I., Bousquet D. and Manjunath P. 2001. Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. *Biology of Reproduction*. 65:41-51.
- Thompson DL., Johnson L., St. George RL. and Garza F. 1986. Concentrations of prolactin, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in pituitary and serum of horses: effect of sex, season and reproductive state. *Journal of Animal Science*. 63: 854-860.
- Tortonese DJ. and Lincoln GA. 1994. Photoperiodic modulation of the dopaminergic control of pulsatile LH secretion in sheep. *Journal of Endocrinology*. 143: 25-32.
- Tortonese DJ. and Lincoln GA. 1995. Effects of melatonin in the mediobasal hypothalamus on the secretion of gonadotrophins in sheep: role of dopaminergic pathways. *Journal of Endocrinology*. 146: 543-552.
- Tsai MY., Yeh SD., Wang RS., Yeh S., Zhang C. and Lin HY. 2006. Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells. *Proceedings of the National Academy Science of USA*. 103:18975-80.
- Tsubota T., Howell-Skalla I., Nitta H., Osawa Y., Mason JI., Meiers PG. and Nelson RA. 1997. Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in the male black bear *Ursus americanus*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 109: 21-27.
- Umapathy, G., Sontakke, S. D., Reddy, A., Shivaji, S. 2007. Seasonal in semen characteristics, semen cryopreservation, estrus synchronization, and

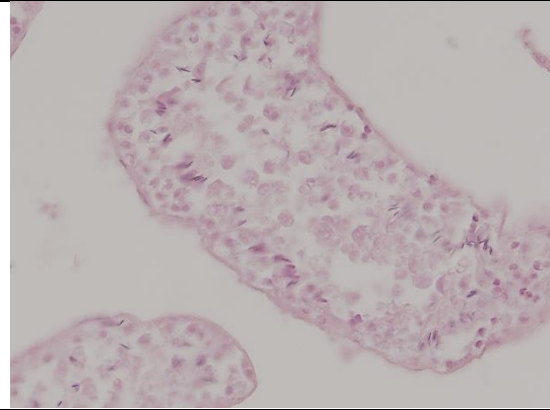
- successful artificial insemination in the spotted deer (*Axis axis*). *Theriogenology*. 67: 1371-1378 (2007).
- Ungerfeld R., González-Pensado s., Bielli A., Villagrán M., Olazabal D., and Pérez W. 2008. Reproductive biology of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*): a review. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 50:16. DOI: 10.1186/1751-0147-50-16
- Vanecek J. 1998. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiological Reviews*. 78 (3): 687-721.
- Veldhuis JD., Sotos JF. and Sherman BM. 1991. Decreased metabolic clearance of endogenous growth hormone and specific alterations in the pulsatile mode of growth hormone secretion occur in prepubertal girls with Turner's syndrome. Genentech Collaborative Group. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 73 (5): 1073-80.
- Verhoeven G., Hoeben E. and De Gendt K. 2000. Peritubular cell-Sertoli interactions: factors involved in PmodS activity. *Andrología* 32, 41-45.
- Villa-Ramírez, B. y F. A. Cervantes, 2003. Los mamíferos de México. Grupo Editorial Iberoamérica, S. A. de C. V. México, D. F. pp. 39-43, 45-52.
- Villarreal J. 1999. Venado cola blanca: manejo y aprovechamiento cinegético. Unión ganadera regional de Nuevo León, Monterrey, México.
- Waites GMH. and Gladwell RT. 1982. Physiological significance of fluid secretion in the testis and blood-testis barrier. *Physiological Reviews*. 62: 624-671.
- Wang RS., Yeh S., Tzeng CR. and Chang C. 2009. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*. 30:119-32.
- Willian, L. 1986. Taxonomía y ubicación del Venado Cola Blanca dentro del grupo de los mamíferos. I Simposio sobre el venado en México. Memorias FMVZ, UNAM, AZARM. México.
- Wilson CM., Griffin JE., Wilson JD., Marcelli M., Zoppi S. and McPhaul MJ. 1992. Immunoreactive androgen receptor expression in subjects with androgen resistance. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 75(6):1474-8.
- Wray S., Grant P. and Gainer H. 1989. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proceedings of the National Academy Science of USA*. 86 (20): 8132-6.
- Yanagimachi R. 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*. 2:371-382.

IX. ANEXOS

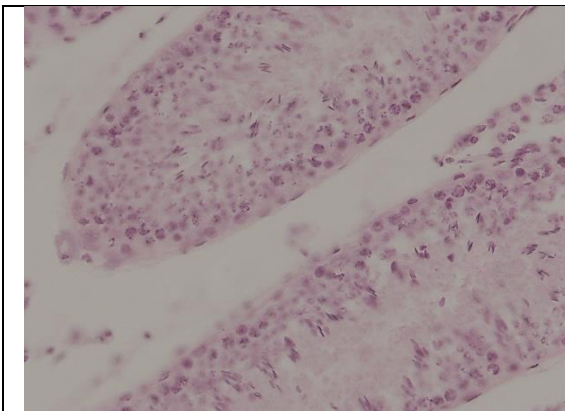
	
1) Limpieza de animales para extracción de semen y gonadectomía	2) Exposición del pene para coleccionar el semen.
	
3) Medicamentos aplicados después de la gonadectomía	4) Retiro del epididimo, tejido conectivo, etc. Para procesar los testiculos
	
5) Cortando los testiculos en secciones más pequeñas para procesarlos	6) Tejidos del testiculo incluidos en parafina previo al corte en microtomo



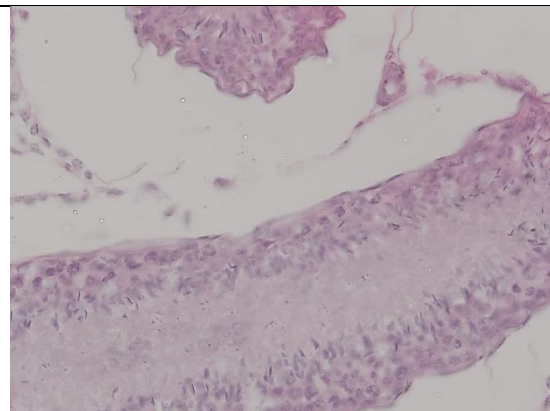
7) Caracterizando los túbulos en el microscopio y el software



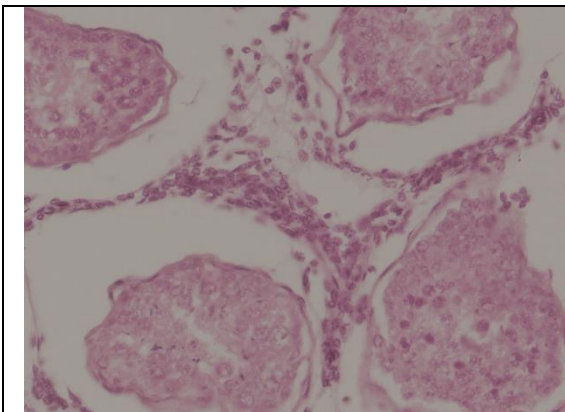
8) Túbulos en el mes de septiembre



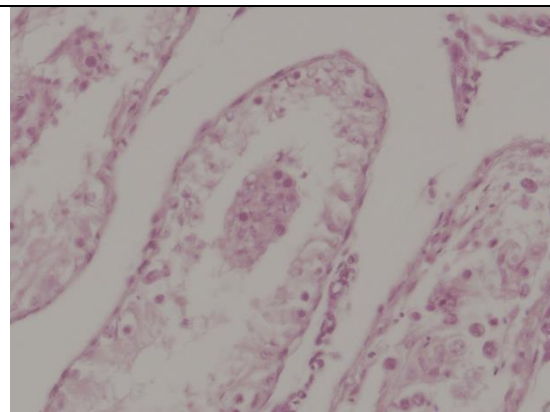
9) Túbulos en el mes de diciembre



10) Túbulos en el mes de febrero



11) Túbulos en el mes de abril



12) Túbulos en el mes de junio