

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**UTILIZACIÓN DE IMAGENOLÓGIA Y DE MEDIDAS TESTICULARES PARA
LA EVALUACIÓN DEL POTENCIAL REPRODUCTIVO EN PERROS DE RAZA
CIMARRÓN URUGUAYO**

por

Br. María Eliana FERNÁNDEZ ALICIER

**TESIS DE GRADO presentada
como uno de los requisitos para
obtener el título en Doctor en
Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria**

MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO

URUGUAY

2016

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa:

Dr. Rafael Aragunde

Segundo miembro (tutor):

Prof. Adj. Danilo Fila

Tercer miembro:

Dra. Silvia Llambí

Cuarto miembro (co-tutor):

Dr. Fernando Fumagalli

Quinto miembro (co-tutor):

Dr. Fernando Macedo

Fecha:

20 de diciembre de 2016

Autor:

Br. María Eliana Fernández Alicier

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Danilo Fila por su tutoría en este trabajo.

A los cotutores, el Dr. Fernando Fumagalli por sus aportes y al Dr. Fernando Macedo por su esencial aporte en el análisis estadístico.

A los aportes recibidos por parte del tribunal.

Al personal de Biblioteca y Hemeroteca por su amable disposición y aporte del material bibliográfico.

A los cimarrones y y sus criadores de Costa de Oro y Montevideo.

A la UdelaR y al Fondo de Solidaridad.

A Diego mi compañero de vida por su apoyo incondicional, a mi familia y amigos.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
INTRODUCCIÓN	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
Historia del Cimarrón	11
Embriología	11
Anatomía del testículo canino	12
Histología	13
Espermatogénesis	14
Espermatozoides	15
Fisiología y Endocrinología reproductiva del macho	16
Semen	17
Caracteres del eyaculado canino	18
Evaluación del semen	18
Examen andrológico	20
Comportamiento sexual	21
Mediciones testiculares	22
Ecografía testicular	24
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28

RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Representación esquemática de un corte sagital del testículo	12
Tabla 1. Resumen de los parámetros seminales publicados en perros normales	19
Tabla 2. Mediciones testiculares	31
Tabla 3. Descripción de las mediciones testiculares	31
Tabla 4. Parámetros seminales registrados	31
Tabla 5. Promedio de intensidad de pixeles del parénquima del par testicular.....	32

RESUMEN

En el presente trabajo se propuso como objetivo, la evaluación de la fertilidad de un grupo de caninos machos Cimarrones, para esto se correlacionó la fertilidad con: las características seminales de cada individuo con las mediciones testiculares (Ancho total del escroto, Índice y Volumen testicular) y la medición en píxeles de su parénquima testicular por ultrasonografía. Además se evaluó la influencia de la edad y peso corporal sobre el tamaño testicular. Para el estudio se utilizaron 36 machos sanos de diferente rango etario con un promedio de 74,2 +/- 6,2 meses y un peso promedio de 35,7 +/- 0,8kg. Todos los animales fueron pertenecientes a criaderos de dos zonas: la mitad a Montevideo y la otra mitad a la Costa de Oro. Al inicio de cada evaluación se palpó el par testicular. Luego se prosiguió con la ultrasonografía testicular. A continuación se colectó semen mediante la técnica de la mano enguantada, con la presencia de una perra en celo. Posteriormente esas extracciones de semen fueron sometidas a análisis macroscópicos; volumen, pH y aspecto, y microscópicos; motilidad y morfología. También determinamos la concentración espermática mediante la cámara de Neubauer. Por último se realizaron correlaciones de los datos obtenidos de las diferentes alternativas de medición testicular con los parámetros observados en la evaluación seminal, en particular, con el número de espermatozoides totales y la concentración espermática. Los resultados indican que no hubo correlación entre las mediciones testiculares y los parámetros seminales, así como tampoco la hubo con la intensidad de píxeles analizados de la ultrasonografía del parénquima testicular. Respecto a las mediciones testiculares y su correlación con la edad y peso corporal del respectivo animal, se reportaron diferencias significativas con la edad pero no con el peso corporal del animal. En conclusión determinamos alta correlación entre las mediciones testiculares (Ancho total del escroto, Índice, y Volumen testicular), por lo tanto cualquiera de ellas son herramientas eficaces para medir los testículos. No hubo correlación entre las mediciones físicas y los parámetros seminales. Tampoco encontramos correlación alguna entre la intensidad de píxeles a partir de la US testicular y los parámetros seminales así como tampoco con las mediciones testiculares físicas.

SUMARY

The objective of this study was to evaluate the fertility of a group of male Cimarron canines, the only local canine animal genetic resource. For this, fertility was correlated with: the seminal characteristics of each individual with testicular measurements (TSW, Index and Testicular volume) and the measurement in pixels of its testicular parenchyma by ultrasonography.

In addition, the influence of age and body weight on testicular size was evaluated. The study used 36 healthy males of different age range with an average of 79.3 +/- 6.2 months old and an average weight of 36.4 +/- 0.7 kg. All the animals belonged to breeding centers of two areas: 50% Montevideo, and 50% Costa de Oro. At the beginning of each evaluation the testicular pair was palpated. Then the testicular ultrasonography was performed. Semen was then collected using the gloved hand technique, with the presence of a bitch in heat. Subsequently, these semen extractions were subjected to macroscopic analysis; volume, pH and appearance, and microscopic; motility and morphology. We also determined the sperm concentration through the Neubauer chamber. Finally, correlations of the data obtained from the different testicular measurement alternatives were performed with the parameters observed in the seminal evaluation, in particular with the number of total spermatozoa and sperm concentration. The results indicate that there was no correlation between the testicular measurements and the seminal parameters, nor was there any correlation with the intensity of analyzed pixels of the testicular parenchyma. Regarding testicular measurements and their correlation with age and body weight of the respective animal, significant differences were reported with age but not with the animal's body weight. In conclusion, we determined a high correlation between the testicular measurements (TSW, Index, and TV). Therefore, any of them are effective tools to measure the testicles. There was no correlation between the physical measurements and the seminal parameters. Neither did we find any correlation between the intensity of pixels from the testicular US and the seminal parameters as well as physical testicular measurements.

INTRODUCCIÓN

La raza Cimarrón es el único recurso zoogenético del Uruguay. Fue creada a inicios del siglo XIX con el propósito de utilizarla para trabajo en el arreo del ganado (Llambí y col., 2012) .En la actualidad hay mucho interés en la raza ya sea para guardia o para animal de compañía. Pero tanto su conformación anatómica como su comportamiento dominante pueden dificultar las montas. Frente a esta problemática los criadores buscan optimizar los recursos para lograr mayores índices de reproducción. Una de las formas para lograr esto, es mediante la selección del semental, tarea que recae en el médico veterinario.

En los últimos años ha crecido el interés de los criadores y los propietarios de animales de compañía en el uso de la Inseminación Artificial ya que también resuelve los problemas para cruzar los animales cuando están lejos, para preservar semen de animales muertos ya sea por su valor genético o por razones sentimentales. Otro motivo es que este método ofrece la disminución de contagio de enfermedades de transmisión venérea, infecto contagiosas como por ejemplo el Tumor Venéreo Transmisible, y además por los aumentos en número de cachorros por camada y de preñez obtenidos (Linde-Forsberg, 2006). Cabe destacar que contrario a lo que se esperaría en caninos de gran porte como el cimarrón, el número de cachorros por camada promedia entre 1 a 3 cachorros (Fila, 2013).

Cuando se selecciona un canino macho para la monta o extracción para inseminación artificial (IA), debemos evaluar varios aspectos: test seronegativo a *Brucella canis*, evaluación de la calidad del semen (mediante análisis de laboratorio), libido, fertilidad, habilidad de fecundación y conformación anatómica, haciendo hincapié en la evaluación objetiva del Ap. Reproductor. La libido del macho se evalúa según el interés que demuestre y el tiempo que demore en intentar montar a la perra, la capacidad de fecundar se determina mediante el porcentaje de nacimientos de animales vivos hijos del reproductor. Y en cuanto a la determinación de la fertilidad cabe recordar algunos conceptos; fertilidad es la reproducción exitosa, Infertilidad es la pérdida temporal de la fertilidad, subfertilidad es una capacidad inferior a la media para producir descendencia y esterilidad es la pérdida irreversible de la fertilidad (Pineda, 1991).

Según Oettle y Soley (1988), la evaluación reproductiva de un perro deberá basarse siempre en la búsqueda de la fertilidad óptima (buscando el mayor número posible de cachorros), en contraste con el concepto de aptitud reproductiva potencial tradicionalmente utilizado. Para lograr este objetivo se debe comenzar por un correcto examen objetivo general descartando animales por bajo peso, patologías osteoarticulares, cegueras, entre otras, que puedan afectar la función reproductiva (Keenan, 2000). Se continúa con el examen reproductivo el cual consta de inspección y palpación de testículos, escroto, epidídimo, próstata, pene y prepucio. En testículos se evalúa simetría, tamaño (aproximado a lo esperado para la raza, y similares entre sí), movilidad dentro del escroto y consistencia que normalmente es como la de una ciruela, en escroto se busca ausencia de heridas previas o recientes, dermatitis o adherencias al testículo. El epidídimo está ubicado dorsal a los testículos, la próstata se palpa a través del recto comprobando simetría y consistencia esponjosa. El pene y prepucio se revisan al final para evitar posibles

pérdidas de semen, se exterioriza el pene y se inspecciona morfología, color del esmegma, ausencia de traumas y de adherencias al prepucio (Keenan, 2000).

Si bien el examen reproductivo es una herramienta muy valiosa, es fundamental la complementación de la información obtenida con la evaluación de la calidad del semen. El análisis del semen nos permite determinar la calidad del reproductor (Sorribas, 1999), dicho análisis se compone del registro de: volumen y color, morfología, motilidad, recuento de los espermatozoides y determinación de otras células como leucocitos, eritrocitos entre otros (Linde-Forsberg, 2006).

Aun con los datos obtenidos luego de dichos análisis, es de gran utilidad el uso de la imagenología para conocer el estado del parénquima de testículo y próstata (Keenan, 2000; Davidson, 2009). La aplicación de la ultrasonografía (US) en el aparato reproductor, comenzó a desarrollarse hace varios años en rumiantes. Se realizaron estudios que determinaron las correlaciones de las mediciones testiculares entre los valores obtenidos por calibre y ecografía testicular (Pechman y col., 1987; Bailey y col., 1998) con la finalidad de establecer los métodos más eficaces de evaluación reproductiva del semental. En los pequeños animales la US comenzó siendo utilizada como apoyo en la confirmación de diferentes patologías reproductivas (seminomas, tumores de Sertoli, patologías prostáticas, entre otras). Y en los últimos años algunos investigadores han realizado trabajos de comparación entre la medición del volumen testicular por calibre y por ultrasonografía (Pagona y col., 2008).

Partiendo de la escasez de información sobre la relación entre la calidad del semen y la fertilidad en caninos (Linde-Forsberg y Forsberg, 1989), este estudio pretende determinar la correlación entre las mediciones testiculares de los caninos por calibre y ecografía con la calidad del semen. Y además se busca obtener una herramienta más en la selección del macho con mayor potencial reproductor.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

HISTORIA DEL CIMARRON

El origen de la raza Cimarrón se remonta a la época de la conquista española, se piensa que provienen del cruzamiento entre Mastines y Lebreles. En el Agro la etapa desde el siglo XVIII y primera mitad del siglo XIX es conocida como “Estancia Cimarrona”, en esta época el Cimarrón tenía un rol fundamental en la conducción del ganado para el encierro y la faena. A mediados del siglo XIX en las luchas por la independencia, aparecen muchos bandoleros y contrabandistas, esto determina el despoblamiento y abandono por parte de los propietarios de los perros, que pasan al estado salvaje. Luego entre 1840 y 1850 cuando culminan las guerras civiles comienza la etapa de cercado de las propiedades. Y los perros salvajes pasan a ser una amenaza. Entonces y por Decreto comienza la eliminación selectiva de ejemplares. Algunos de ellos escaparon hacia Cerro Largo y Treinta y Tres. Estos animales fueron domesticados y el hombre nuevamente los utiliza para colaborar en las tareas del campo. Así comienza la recuperación de la raza. En octubre de 1988 se funda la Sociedad de Criadores de perros Cimarrones. En ese año se redacta el estándar racial y se los reconoce ante el Kennel Club Uruguayo como raza autóctona. En el año 2012 la Federación Cinológica Internacional reconoce definitivamente, al perro Cimarrón uruguayo como raza, y esto logró un creciente interés en criadores y expositores. Lo que llevo a estudios de relevamiento de la raza, que revelan su uso como animal de caza, guardia, de trabajo en el campo y como animal de compañía. También se están realizando trabajos para aumentar los niveles prolificidad, disminuir la tasa de enfermedades congénitas, entre otros (Llambí y col., 2013).

Algunas características: Es un perro de talla media, fuerte, musculosa, compacta y ágil, un poco más largo que alto. Es de temperamento tranquilo, sagaz y de gran coraje. En el campo se utilizan para el trabajo con bovinos y ovinos, también se usan en la caza, la defensa y vigilancia (Silveira y col., 1998).

EMBRIOLOGIA

Las gónadas sexuales masculinas se desarrollan a partir de crestas genitales, mediales a los riñones embrionarios en la región lumbar. Estas crestas no tienen una morfología diferenciada y se componen de tejido mesenquimatoso laxo, rodeado por epitelio que se desplaza hasta la parte interna del mesénquima formando los cordones sexuales primarios, además contiene células germinales primordiales, el origen de estas células primordiales es en el saco vitelino y pedúnculo alantoideo y migran a las crestas gonadales por señales quimiotácticas, para comenzar allí su proliferación (Bloom y Fawcett, 1988; Cunningham, 2003). Las gónadas sexuales determinan el desarrollo de los órganos tubulares; (cordones sexuales), los conductos mesonéfricos (de Muller en la hembra y de Wolf en el macho) y además los genitales externos. Si las gónadas son testículos, producirán testosterona. El estímulo de la testosterona provoca la regresión de los conductos de Muller. Los conductos de Wolf se convierten en el epidídimo, la uretra y vasos deferentes que tienen conexión directa con los tubos seminíferos (Cunningham, 2003). Morfológica e

histológicamente el sexo del perro no se distingue hasta los 30 días de gestación (Vargas y col., 2012).

ANATOMIA DEL TESTICULO CANINO

Durante el crecimiento del feto los testículos migran a través del gubernaculum del testículo hacia la bolsa escrotal del animal que en el caso del canino se ubica en la región inguinal. Cada testículo está formado por un conjunto de lobulillos que contienen diminutos y largos conductos seminíferos los cuales convergen en la red testicular, formando el mediastino testicular el cual se ubica centralmente. Los conductos seminíferos son tubos cuya pared contiene las células germinales y células de Sertoli, estas últimas proveen elementos nutritivos y estimulantes para la maduración de las células germinales. Rodeando los conductos se encuentran las células de Leydig, son las encargadas de la producción de hormonas muy importantes para la espermatogénesis: los andrógenos (Cervený C., König H. E., Liebich H-G., 2005).

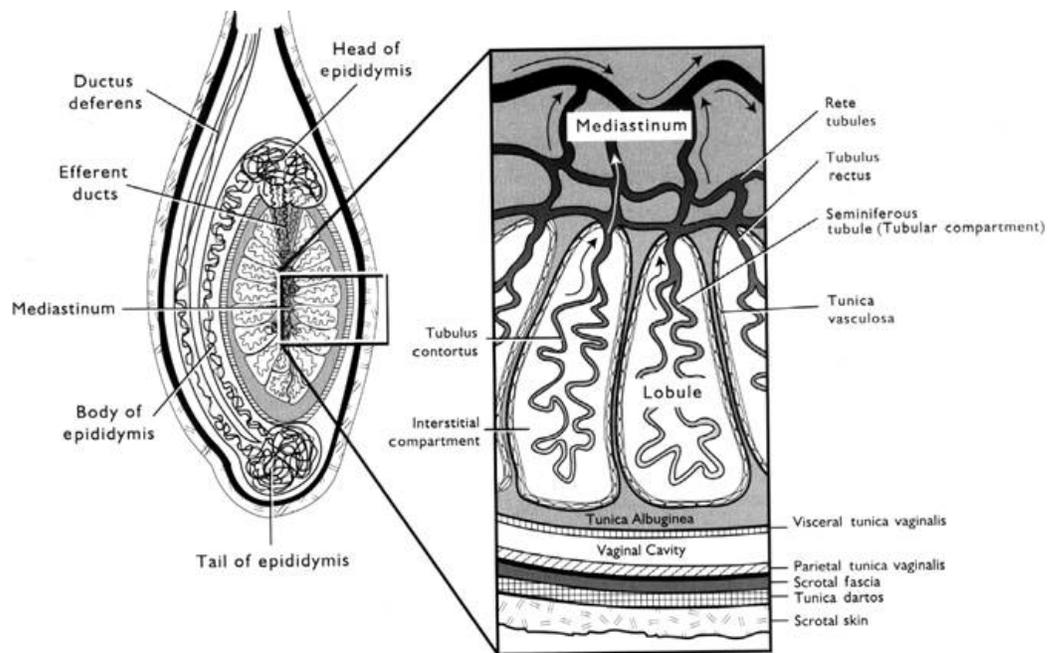


Figura 1. Eilts (2004). Representación esquemática de un corte sagital del testículo.

La masa testicular se encuentra rodeada por una capa de tejido conjuntivo (túnica albugínea) que a través de septos separa un lobulillo de otro y forma el mediastino testicular, además de proveer la irrigación sanguínea. Por fuera de esta capa se encuentra el peritoneo visceral, luego el peritoneo parietal, y por último como capa protectora del exterior, la bolsa escrotal. Dentro del escroto y unido dorsalmente al testículo se encuentra el epidídimo que es un órgano de consistencia más firme que el primero y que contiene el conducto del epidídimo, el cual deriva del conducto eferente y este de la red testicular formada por los conductos seminíferos. Su función es llevar los espermatozoides producidos en los conductos seminíferos, mientras continúan su maduración, hacia la uretra. Para el estudio de la maduración de las células espermáticas, el epidídimo se puede dividir en: cabeza (cranial al testículo), cola (caudal al testículo) y cuerpo (Cervený C., König H. E., Liebich H-G., 2005).

HISTOLOGIA

El testículo está unido al escroto a través de; la túnica vaginal visceral que se encuentra rodeada firmemente a este y la túnica parietal, más unida al escroto. La capa visceral está compuesta de mesotelio y tejido conjuntivo que se fusiona con la túnica albugínea. La túnica albugínea encapsula el testículo con una capa de tejido irregular denso que se constituye de fibras colágenas y elásticas. La túnica albugínea se continúa como septos de tejido conjuntivo que convergen hacia mediastino, el centro del testículo, que está constituido por tejido conjuntivo laxo y dividen al testículo en lobulillos. Los lobulillos contienen los túbulos seminíferos y estos se encuentran rodeados de una lámina basal seguida por una capa de fibras colágenas, los túbulos también están rodeados de capas de células peritubulares con una fuerte actividad fosfatasa alcalina. La lámina basal de animales que aún no han llegado a la pubertad está constituida por fibroblastos mientras que en las láminas de animales púberes adquieren la forma de células musculares lisas por acción de las hormonas hipofisarias, que entran en juego en esta etapa. Esta transición es muy útil pues las células peritubulares son las responsables de las contracciones de los túbulos seminíferos. En el espacio que queda entre los túbulos seminíferos, se encuentran las células intersticiales o Células de Leydig. La cantidad de células intersticiales varían con la edad del animal, son células poliédricas irregulares con un núcleo esférico, contiene ciertas cantidades de glucógeno y su retículo endoplásmico liso contiene la enzima esteroidea deshidrogenasa y además colesterol, el precursor de las hormonas esteroideas. Otra diferencia con los animales más jóvenes es el aumento de la cantidad de mitocondrias de estas células en la pubertad (Dellmann H., D., Wrober K. H., 1976).

Los túbulos seminíferos están constituidos por epitelio estratificado y dos tipos de células: las espermatogonias y las células de sostén o de Sertoli. Las células de Sertoli tienen forma piramidal y su base se encuentra pegada a la lámina basal, con núcleo oval, tienen cantidades variables de lípido y glucógeno y poseen microfilamentos y microtúbulos. Cumplen función de nutrición, protección y sostén de las espermatogonias, fagocitan los espermatozoides viejos y residuos celulares. Cuando las células espermatogonias llegan a espermatozoides los libera a la luz del túbulo. Las uniones intercelulares se ubican por encima del nivel de las espermatogonias y forman la barrera hematotesticular, generándose así el compartimento basal y el apical. La división de las espermatogonias y la renovación de las células germinales ocurren en el compartimento basal. Las células espermatogónicas se ubican en el túbulo desde la pared hacia la luz (Dellmann H., D., Wrober K. H., 1976).

ESPERMATOGENESIS:

Es un conjunto de etapas secuenciadas, en el que ocurre proliferación celular y modificaciones citológicas que comienzan con células diploides y culmina con células haploides, las células reproductoras del macho denominadas espermatozoides (Bloom Fawcett, 1988.). Para el entendimiento del proceso, las etapas se dividen en: espermatocitogenesis: es el comienzo donde la espermatogonia tipo A sufre mitosis celular duplicando así su número dando lugar a una célula hija que es el comienzo de una serie espermatogénica, la otra célula hija se transforma en una nueva célula germinal, asegurándose la continuidad de las células germinales. Le sigue la división de esta última convirtiéndolos en espermatocitos primarios (Dellmann H. D., Wrober K. H., 1976).

Meiosis: En la segunda etapa ocurre la meiosis de los espermatocitos primarios en estas dos divisiones de maduración consecutivas, se reduce el número de cromosomas de la célula y pasa a llamarse espermatida. Los espermatocitos primarios son células grandes y redondeadas. Estos inician la profase de la primera división meiótica. Durante la meiosis ocurren varias fases que se distinguen por la variación de forma de la cromatina, la recombinación genética y la variación de las relaciones que presentan los cromosomas homólogos y también por su grado de condensación. Luego ocurre una serie de etapas rápidamente: metafase, anafase y telofase. Donde los cromosomas se disponen en la placa ecuatorial y luego en polos opuestos de la célula para distribuirse en las células hijas; los espermatocitos secundarios que son células diploides. Luego de unas horas ocurre la segunda división meiótica que es muy parecida a la división mitótica, la dotación diploide se divide en dos juegos de cromosomas haploides (Dellmann H. D., Wrober K. H., 1976)

Espermiogenesis: Es la secuencia de modificaciones postmeióticas mediante las cuales las espermatidas evolucionan a espermatozoides, implicando modificaciones nucleares y citoplasmáticas. Las espermatidas son más pequeñas que los espermatozoides y se localizan en niveles superiores del epitelio. Los espermatozoides son células maduras muy complejas que se encuentran en la luz de los túbulos seminíferos prontos para comenzar su migración (Dellmann H. D., Wrober K. H., 1976).

ESPERMATOZOIDES

El espermatozoide maduro se puede dividir en dos piezas: cabeza y cola. La cabeza contiene un núcleo condensado, el cual lleva la información genética que se transmite a la descendencia y la cola es la encargada del movimiento de la célula, necesario para que se lleve a cabo la fertilización. El tamaño y la forma del espermatozoide varían en las distintas especies de mamíferos. El núcleo abarca la mayor parte de la cabeza y dos tercios de este forman el acrosoma; organelo rodeado por una membrana que hace de capuchón y contiene las enzimas específicas para degradar la zona pelúcida del ovocito en el momento preciso. La cola tiene cuatro zonas que se diferencian por las estructuras que rodean al axonema. Desde la base a la punta esas zonas son:

- **Pieza de conexión:** formada por una placa basal que se adapta a la fosa de implantación, en la superficie posterior del núcleo y por una serie de 9 columnas que se localizan caudalmente, estas columnas se continúan con nueve fibras densas externas que se disponen de forma paralela a los nueve pares del axonema.
- **Pieza media:** Este segmento se encuentra rodeado por mitocondrias (producen la energía necesaria para el movimiento del axonema), que forman un espiral alrededor del segmento, cuya longitud varía en las diferentes especies, inmediato al último giro existe una estructura anillada de material denso, que se une con firmeza, la membrana flagelar. El axonema se sitúa a lo largo de la parte central de la pieza intermedia y contiene dos microtúbulos centrales rodeado por nueve pares de microtúbulos. El axonema recorre toda la longitud de la cola.
- **Pieza principal:** Se afina gradualmente hacia la pieza terminal. En este segmento una vaina fibrosa rodea el axonema y las fibras externas. La disposición de las fibras de la vaina provoca los movimientos de inclinación de la parte proximal de la cola.
- **Pieza terminal:** Se distingue por la abrupta terminación de la vaina fibrosa. Este segmento del axonema está cubierto solo por la membrana flagelar. La forma de finalizar el axonema varía un poco en las diferentes especies (Bloom Fawcett, 1988).

Es importante manejar los tiempos en que se forman los espermatozoides. En el perro el ciclo completo es de 50 a 60 días, por lo tanto sucesos exógenos o endógenos al animal, que alteren el normal funcionamiento testicular pueden ser evidenciados en el eyaculado, desde pocos hasta 60 días después del evento (Cunningham 2003).

FISIOLOGIA Y ENDOCRINOLOGIA REPRODUCTIVA DEL MACHO.

En los mamíferos domésticos los testículos se encuentran por fuera del abdomen rodeados por el escroto, esto es, para mantener una temperatura menor pues pequeñas alteraciones de temperatura puede dejar al animal infértil incluso hasta llegar a la esterilidad. El descenso de los testículos al escroto, en caninos, normalmente ocurre entre los 2 y los 5 días luego de nacido, pero puede demorarse hasta los seis meses. Pasado este tiempo, si no descendieron uno o ambos testículos, el animal puede ser criptorquideo uni o bilateral, respectivamente. En el primer caso, el testículo no descendido producirá testosterona pero no gametos, el otro testículo funcionará normalmente y por lo tanto será capaz de preñar la perra pero no es aconsejable por ser esta falla de origen genética, heredable. En el segundo caso, el individuo es estéril (Cervený, König y Liebich, 2005).

Control hipotálamo-hipofisario de la reproducción: El hipotálamo es un órgano pequeño que se encuentra en la base del cerebro. Este tiene grupos neuronales que secretan hormonas importantes para comandar las funciones de la adenohipofisis. La hipófisis responde secretando hormonas que regulan la actividad de las gónadas: FSH y LH, que a su vez actúan sobre el testículo para que este produzca andrógenos. Este mecanismo se mantiene en equilibrio mediante autorregulación (Cunningham, 2003).

El aumento de la producción de hormonas esteroideas, por parte de las gónadas, para poder llevar a cabo la gametogénesis, ocurre a consecuencia de estímulos pulsátiles de la hormona gonadoliberina (GnRH) del hipotálamo hacia la adenohipofisis. Existen dos tipos de estímulos, los irregulares y de baja amplitud estimulan la liberación de FSH, mientras que estímulos de alta frecuencia inducen liberación de LH. La LH tiene su receptor en las células de Leydig, las cuales se encuentran en el intersticio rodeando los túbulos seminíferos y a partir del colesterol producen la testosterona. La FSH tiene su receptor en las células de Sertoli, que se encuentran en la pared dentro de los túbulos y estimula a estas células a producir proteínas que van a transportar andrógenos por sangre y linfa; también produce inhibina, activina, estrógenos y otras sustancias que contribuyen a la nutrición de las espermatogonias. Las proteínas transportadoras mantienen la concentración de andrógenos altos en los testículos lo que es necesario para el desarrollo de la espermatogénesis. El alto nivel de hormonas esteroideas (en especial testosterona) provoca los cambios físicos y de comportamiento, que determinan el inicio de la pubertad del animal, pero esto no significa que el animal sea ya maduro sexualmente. Una vez que comienza el ciclo reproductor del macho, a diferencia de lo que ocurre en la hembra, no se requiere autorregulación positiva por las hormonas esteroideas. Sucede que el macho una vez que comienza a ciclar es de manera continua; se forman gametos que van a encontrarse en la luz de los tubos seminíferos prontos para ser liberados a la red testicular y de ahí al epidídimo correspondiente a cada testículo. El epidídimo ofrece un medio que permite el transporte, la nutrición, capacitación y maduración del espermatozoide hacia el conducto deferente respectivo, que desemboca en la cola del epidídimo y constituye una fuente de almacenamiento de los espermatozoides. Luego el conducto deferente se ensancha para formar ampollas vesiculares, estas glándulas vuelcan su contenido en el deferente para formar parte del semen. El par de deferentes ingresan a abdomen por los anillos inguinales y se conectan a la uretra, por donde saldrá el semen compuesto por los espermatozoides y por contenido provenientes

del par de glándulas vesiculares y la próstata, órgano impar. Estas son las únicas glándulas accesorias reproductivas presentes en el perro (Cunningham, 2003).

El pene, desde el punto de vista reproductivo, es el órgano que lleva el semen al exterior, es de forma cilíndrica, se compone de raíz, cuerpo y glande del pene. En el canino la raíz del pene se origina en el arco isquiático, se continúa con el cuerpo y finaliza con el glande caudal a la región del ombligo en la pared abdominal ventral. Como el testículo, está rodeado de la túnica albugínea pero en el pene encierra espacios cavernosos denominado cuerpo cavernoso que a su vez rodea el cuerpo esponjoso y este la uretra (Cunningham, 2003).

La emisión del semen a la uretra pélvica ocurre como respuesta a un reflejo toracolumbar mediado por el sistema simpático que induce la contracción de las glándulas accesorias y de los músculos de los conductos deferentes. Para que se produzca la eyaculación del semen, el pene debe estar erecto. La erección es causada por un reflejo psicosomático que implica el trabajo energético en conjunto del sistema vascular, endocrino y neurológico. La contracción del músculo isquiocavernoso obstruye el retorno venoso mientras que el sistema parasimpático produce la relajación del cuerpo esponjoso y cavernoso, el cuerpo cavernoso se llena de sangre provocando que el pene aumente de tamaño y se torne turgente. La eyaculación es un fenómeno impulsado por un reflejo parasimpático sacro que provoca la contracción de los músculos: bulboesponjoso, isquicavernoso y uretral. A continuación de la eyaculación se contraen los músculos lisos del cuerpo esponjoso por un reflejo simpático sacro, aumenta la liberación de sangre, se contrae el músculo retractor del pene y retrae el pene hasta el prepucio. El número de espermatozoides es variable según la especie, la raza, el estado de salud de individuo y el tamaño testicular, en estos últimos hay una correlación positiva. En el perro este número oscila en los: $0,37 * 10^9$ spz/ml (Cunningham, 2003).

SEMEN

El semen está compuesto por dos partes: el plasma seminal secretado por las glándulas accesorias, que en canino son; la próstata y el par de ampollas vesiculares. Y por otra parte los espermatozoides originados en los testículos. El plasma seminal proporciona nutrientes y protección a los espermatozoides. La fructosa es un aporte energético muy importante para los espermatozoides y lo producen las ampollas vesiculares. La próstata aporta cerca del 30% del volumen del plasma seminal. Abundan los iones de sodio y potasio, mientras que solo hay trazas de hierro, cobre y zinc, además aporta prostaglandinas, proteínas asociadas a la fertilidad, algunas enzimas como fosfatasa, fosfolipasas, aminoácidos, péptidos, lípidos, ácido pirúvico, láctico y acético, inmunoglobulinas A, andrógenos y otras sustancias. No se conocen todas las funciones de estos compuestos pero se sabe que algunos de ellos son absorbidos por los espermatozoides y que el plasma puede ayudar tanto en la capacitación como decapitación de estos (Gil J., 2003; Cunningham, 2003).

La composición del semen varía entre e intra especies, incluso en distintas extracciones de un mismo individuo. Para hacer un correcto análisis de calidad del semen hay que considerar todas las variables, entre ellos edad, estación del año en que se realizan las extracciones, técnicas de extracción, estado de salud y nutrición del semental, etc. Por esta razón antes de hacer un análisis de calidad es necesario minimizar todas las variaciones posibles (Pineda, 1991).

El creciente interés de los criadores de animales de compañía, trabajo o deporte sobre el semen canino, es fundamentado por la importancia del optimizar el uso del animal con material genético superior. Actualmente se trabaja principalmente con los gametos del macho por ser este capaz de producir un mayor número de células germinales, esto implica que un macho puede servir varias hembras. Si un macho insemina varias hembras y es subfétil, probablemente va a alterar la preñez de todas las hembras, si el macho es fértil y una de las hembras es subfétil, (eliminando las posibilidades de contagio), solo se verá alterada la preñez de esa hembra. Por esta razón se justifica trabajar en base a la fertilidad del macho (Pineda, 1991).

CARACTERES DEL EYACULADO CANINO

La eyaculación del canino se puede dividir en tres etapas: A) Fracción pre-espermática; se observa en el cortejo, proviene de la próstata, no tiene espermatozoides y es clara. B) Fracción espermática; ocurre cuando se producen los movimientos de empuje, contiene la mayor cantidad de espermatozoides por lo que se torna opalescente. Y por último fracción pos-espermática; sucede en el abotonamiento, es la porción de mayor volumen también proviene de la próstata y es transparente (Stornelli M. A., 2003).

EVALUACION DEL SEMEN

Las principales razones para evaluar la calidad del semen son dos: para valorar la fertilidad y cuando se verifican desordenes reproductivos que pueden alterar el desempeño como reproductor. A la fecha no se ha establecido un solo método confiable de medición de la calidad seminal para predecir la fertilidad, por esta razón se toman en cuenta varios parámetros (ver tabla 1) y con los datos obtenidos en conjunto se emite una conclusión acerca de la fertilidad del individuo en estudio (Pineda, 1991).

Tabla 1. Resumen de los parámetros seminales publicados en perros normales

Parámetro	Valores normales
Primera fracción	0,5 – 5,0 ml ,transparente
Segunda fracción	1,0 – 4,0 ml opalescente
Tercera fracción	1,0 – 80,0 ml transparente
Volumen total del eyaculado	2,5 – 80,0 ml
Concentración espermática	4 – 400 x 10 ⁶ / ml
Total de espermatozoides por eyaculado	300 – 2000 x 10 ⁶
Motilidad progresiva (% del total de espermatozoides)	> 70 %
Morfología normal (% del total de espermatozoides)	> 80%
pH	6,3 – 6,7
Leucocitos por campo de mayor aumento en una muestra centrifugada	0 – 3, primera fracción 0 – 3, segunda fracción 0 – 6, eyaculado total

(Concannon y col, 2006)

Análisis macroscópico del semen:

Volumen: el volumen solo modifica la calidad del semen si el animal no eyacula la fracción espermática o si esta fracción se pierde en la recolección. Color: Se valora simplemente observándolo (inmediato a la recolección), normalmente es opalescente y opaco. La variación de color se asocia a enfermedad. Aspecto: en el canino es ligeramente turbio, disminuyendo la turbidez con relación a la disminución de la concentración espermática por unidad de volumen lo que se relaciona con el volumen de la fracción prostática y la cantidad de espermatozoides eyaculados. La fracción espermática es ligeramente turbia y las fracciones pos y pre espermáticas son translúcidas. La turbidez de la muestra se puede ver afectada en presencia de pus o sangre (Threlfall, 2005; Stornelli M. A., 2003).

Análisis microscópico del semen

Se toma en cuenta: recuento, motilidad, concentración espermática, morfología. Análisis bioquímico, citología y estudio bacteriológico del semen. Recuento: Se puede realizar en cámara cuenta glóbulos, contadores celulares o espectrofotometría. El N° de spz/ml se puede ver afectado por procesos patológicos como inflamaciones, reacciones degenerativas o alteraciones hormonales (Threlfall, 2005; Stornelli M. A., 2003).

Motilidad: se evalúa midiendo una gota de semen diluido o puro según la concentración espermática. Se establece el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, motilidad en el lugar e inmóviles. En una muestra de Semen normal se espera una motilidad anterógrada progresiva del 70 - 80 %. Es importante mantener la temperatura corporal del animal en el porta y cubreobjetos, ya que golpes de frío pueden alterar la motilidad de los espermatozoides. Concentración espermática: Se hace recuento de espermatozoides totales con el total del eyaculado (Threlfall, 2005; Stornelli M. A., 2003).

Morfología: Se realizan coloraciones especiales y luego se visualizan en microscopio óptico. Defectos espermáticos primarios y secundarios no deben ser mayores al 30 y 40 %, la presencia de la gota proximal se asocia a pérdida de la capacidad fecundante y tanto la presencia de gota distal como de gota proximal, disminuyen la resistencia espermática al congelado (Threlfall, 2005; Stornelli M. A., 2003).

Análisis bioquímicos: Se evalúa pH que normalmente varía entre 6,3 y 6,7, además los epidídimos producen fosfatasa alcalina, lo cual se usa para determinar la presencia de líquido epididimal en el eyaculado (Threlfall, 2005; Stornelli M. A., 2003).

Estudio bacteriológico del Semen: Se realiza cuando existen sospechas de enfermedades infecciosas en el tracto genital. Se colecta la segunda y la tercera fracción del eyaculado de forma separada, para tratar de localizar donde se origina el problema (Threlfall, 2005; Stornelli M. A., 2003).

Cuando aparecen células no espermáticas en el semen, debe hacerse citología para determinar dónde puede estar la alteración ya que patologías del tracto urogenital pueden alterar la fertilidad (Threlfall, 2005; Stornelli M. A., 2003).

EXAMEN ANDROLÓGICO

El objetivo de realizar el examen andrológico en un semental es disminuir la posibilidad de un semen defectuoso o de baja calidad y aumentar la oportunidad de obtener mejores resultados (teniendo en cuenta que en el examen objetivo general ya fueron descartados aquellos animales considerados no aptos para la reproducción). De esta manera también estamos reduciendo costos en análisis de muestras de semen, ya que vamos descartando candidatos que consideremos no aptos a partir del Examen Andrológico. El Examen Reproductivo Completo (ERC) es

bastante preciso, aunque existe otro método más preciso en el que el macho elegido se aparee con varias hembras y luego seleccionamos en base a los indicadores reproductivos que obtengamos, como ejemplo tasa de preñez. Pero este método lleva más tiempo y es de mayor costo, frente al ERC que además es más práctico. En el ERC hay que tener en cuenta todo; historia de la salud de animal (sanidad, tratamientos, medicaciones, patologías traumáticas), uso (caza, obediencia, etc.), éxitos y fracasos de las montas, tamaño de las camadas que concibió. También es importante investigar sobre las enfermedades hereditarias, enfermedades agudas o crónicas que puedan afectar el desempeño del semental. En la inspección es importante la postura y caminar del animal, pues si hay alteraciones en el tren anterior o posterior esto puede dificultar la monta. Luego seguimos con los órganos reproductivos. Se inspecciona y se palpa escroto y su contenido, en escroto se busca apariencia uniforme, simétrica, ausencia de; dolor, inflamación, lesiones, tumoraciones y cicatrices que puedan generar daños permanentes en la función del testículo o epidídimo (Keenan, 2000; Threlfall, 2005; Gradil y col., 2006).

Los testículos deben haber descendido los dos, en caso que el animal tenga un solo testículo visible, se rechaza a menos que la causa de la ausencia del testículo fuera extracción quirúrgica. No deben usarse animales que transmitan estas patologías a la descendencia. A la palpación, la consistencia de los testículos normalmente es parecida a la de una ciruela. Deben tener movilidad, o sea libre de adherencias al escroto. Es necesario registrar; longitud, altura y anchura de cada testículo para realizar distintas comparaciones y detectar cualquier cambio del tamaño testicular que pueda tener a futuro, los testículos de un individuo no deben ser de tamaños muy diferentes entre sí. Los epidídimos se palpan dorsales a cada testículo, la cola de cada epidídimo es la parte más prominente y movediza, se encuentra hacia caudal. Luego se busca el cuerpo y cabeza de epidídimo que esta hacia craneal y que se encuentran más unidas a cada testículo. En el cordón espermático la estructura más firme que palpamos es el conducto deferente. El escroto debe tener un grosor parejo alrededor de todo el testículo, sin adherencias ni dermatitis, o lesiones recientes (estos procesos pueden provocar fiebre que lleva a infertilidad y en algunos casos esterilidad). La próstata rodea la uretra, su palpación se hace a través del recto, sobre la pared ventral del recto se palpa una estructura bilobulada y lisa que normalmente apenas sobresale. En perros mayores de 5 años generalmente es más fácil su hallazgo pues cursan con un proceso de hiperplasia prostática benigna. Se debe dejar para lo último pene y prepucio ya que la manipulación pueden provocar la erección del pene. Como en escroto, en prepucio no debe haber lesiones, ni nódulos. A la palpación ausencia de dolor y crepitación también se evalúa; aspecto, tamaño y forma, la visualización del pene se puede hacer cuando se saca la muestra, debe estar libre de lesiones, neoplasias, alteraciones congénitas y hay que prestar atención a la habilidad del animal para exteriorizar el pene (Keenan, 2000; Threlfall, 2005; Gradil y col., 2006).

COMPORTAMIENTO SEXUAL.

En el macho todo comienza durante el periodo neonatal precoz. El estímulo de la testosterona al hipotálamo genera la masculinización del centro sexual de éste. Los efectos de las hormonas son variables según su concentración, la interacción entre ellas y la secuencia en que cada una aumenta en sangre producen grandes cambios

del comportamiento sexual (Cunninham, 2003). La conducta sexual en los perros se manifiesta en etapas tempranas, en el macho durante las tres a cuatro primeras semanas de vida a veces se pueden observar que los cachorros montan a sus hermanos sin distinción de sexo, realizando movimientos pélvicos. Cuando el macho llega a la madurez sexual y se enfrenta a perras que se encuentran en proestro y estro, realiza lo que se denomina "cortejo"; es un juego amoroso que se realiza previo a la monta. El macho se siente atraído por las feromonas que emite la hembra en la orina y en las secreciones vaginales. Se acerca a la hembra le lame el hocico, las orejas, el cuello, la región perineal e intenta la monta persistentemente hasta que la hembra se lo permite, lo que ocurre cuando ella llega al estro (Medardo V. y Hernández R., 1995).

MEDICIONES TESTICULARES

Hoy en día la selección de sementales debe realizarse lo más pronto posible, no es práctico hacer pruebas de cruzamiento y esperar a determinar los índices de preñez, fertilidad, entre otros, pues implica pérdida de tiempo y dinero. Esta problemática llevó a la búsqueda de formas más directas para analizar la fertilidad, llegando a la conclusión de que no existe un único parámetro reproductivo, sino que para elegir un semental es necesario realizar un completo análisis reproductivo lo que involucra una reseña, un examen objetivo general, un examen objetivo reproductivo e incluso análisis complementarios (Threlfall, 2005).

La testiculometría es una herramienta más en el examen funcional del testículo siendo una maniobra sencilla y de bajo costo. En 1983, Olar aportó los primeros datos sobre correlaciones entre las mediciones testiculares en el canino. Más tarde varios autores encontraron una alta correlación ente los valores de la circunferencia del escroto, el tamaño del testículo y la producción de esperma en el perro (Subev y col., 1996). En 1976, Elmore utilizó una cinta métrica para medir la circunferencia escrotal, registrando el diámetro transversal mayor obtenido, y demostró en toros jóvenes que la circunferencia escrotal, el tamaño testicular y la producción de espermatozoides están altamente correlacionadas; mientras que en toros viejos la circunferencia escrotal y la producción de espermatozoides están correlacionados negativamente, lo que indica un declive en la producción de semen con la edad. Estos datos deberían ser tenidos en cuenta a la hora de seleccionar un semental, además que la circunferencia escrotal es una característica de alta heredabilidad. Aunque es difícil predecir la capacidad reproductiva de un macho, una evaluación sistemática y planificada podría eliminar seleccionarlos por el método de "ensayo y error", costoso en tiempo y recursos.

Thompson y Johnson (1994) plantean que las mediciones escrotales han sido recomendadas como un test clínico para evaluar la fertilidad potencial de toros jóvenes. La circunferencia escrotal se ha correlacionado positivamente con la producción diaria de espermatozoides y el peso testicular (Johnson y col., 1995). Y con el porcentaje de espermatozoides vivos, número de espermatozoides, motilidad espermática concentración de esperma y potencial de eficiencia global de cría, la calidad de semen (Gipson y col., 1985) en toros. Pero la circunferencia escrotal está pobremente correlacionada con la fertilidad en pruebas de cruzamientos ya que está especialmente influida por muchos factores que no son evaluados al determinar la circunferencia escrotal (Thompson y Johnson, 1994). Mientras varios estudios han

reportado que la circunferencia escrotal depende de la edad, raza y condición corporal (Fields y col., 1979; Lunstra y Echeternkamp, 1982; Thompson y Johnson, 1994; Batista, 2011), existen contradicciones acerca de la dependencia en relación a la estación del año en el canino. Keuerk (2013), no halló relación entre las mediciones, volumen eyaculado, concentración, motilidad espermática y la estacionalidad, y por otro lado en el trabajo de Ortega-Pacheco y col. (2006), estos mismos parámetros fueron notoriamente menores en estación húmeda y fresca. Otros investigadores han reportado correlación entre la circunferencia escrotal y el volumen de epitelio seminífero (Veeramachaneni y col., 1986).

Cortez y col. (2002), determinaron en su estudio, una baja correlación entre la concentración espermática y el perímetro escrotal en perros de raza Ovejero Alemán. Sólo un estudio (Bailey y col., 1996), ha reportado datos sobre la posible relación entre la morfología testicular (largo y ancho) y la producción de semen. El análisis de la bibliografía revela que un número amplio de autores han encontrado una alta correlación entre los valores de la circunferencia escrotal, el tamaño del testículo y la producción de semen en toros (Coulter y Foote, 1979), carneros (Lino, 1972), caballos (Kenney y col., 1988) y verracos (Cartee y col., 1986). Además, pero no menos importante, la circunferencia escrotal es altamente heredable (Latimer y col., 1982). Bailey y colaboradores (1996) plantean, en bovinos, que existen diferencias significativas entre los datos obtenidos de la producción de semen según tres tipos de formas en los testículos (ovoide normal, ovoide alargado y esferoides). Por lo anterior, el test no debería basarse solamente en la circunferencia escrotal. Entonces, plantean la utilización de una fórmula más precisa, como el cálculo de volumen y peso de un esferoide prolado (alargado en una dimensión).

Es conocido que el tamaño testicular guarda una estrecha relación con el volumen de parénquima seminal contenido en la gónada; a su vez, dicho volumen del parénquima seminal guarda estrecha relación con la capacidad de producir espermatozoides por unidad de tiempo. Olar y colaboradores (1983) plantean la existencia de una alta correlación entre el ancho total del escroto canino con el peso testicular, con la producción diaria de espermatozoides y con la eyaculación diaria de espermatozoides. Por lo tanto, estos autores establecen que el ancho total del escroto es útil como predictor de la capacidad de los perros para producir y eyacular espermatozoides. Asimismo, Subev y colaboradores (1996) plantean que aquellos perros que presentan un índice (que se calcula con el promedio del largo de ambos testículos y el epidídimo multiplicado por el ancho total del escroto) mayor a 18.00, tendrán una función de espermatogénesis comparativamente mejor que los animales que muestren valores del índice menores (Subev y col., 1996).

También, el volumen testicular ha sido previamente calculado con la fórmula de un cilindro de extremos redondeados (Hahn y col., 1969; Fields y col., 1979). Pero, teniendo en cuenta lo planteado por Bailey y colaboradores (1998) para toros, la fórmula de un esferoide prolado y su modificación provee un método rápido y altamente seguro para estimar el volumen y peso testicular a partir de las medidas de largo y ancho testicular. La ventaja de las medidas de ancho y largo testicular y su aplicación en una fórmula matemática simple son claras. Esta fórmula utiliza medidas físicas de cada testículo individual en comparación con la circunferencia escrotal, la cual utiliza una única dimensión como medida, sobre ambos testículos a la vez. Por lo anterior, las medidas físicas de largo y ancho de cada testículo ahora

podrían ser consideradas para calcular el volumen y peso testicular total, en vez de la circunferencia escrotal o el ancho total del escroto, las cuales no reflejan el volumen y peso testicular total. A partir de la fórmula mencionada se puede obtener un dato más preciso de volumen y peso testicular, dejando de lado la leve variación individual en la forma de los mismos, desapareciendo este problema potencial al comparar individuos. Es importante hacer notar que el volumen es una medida física real de los testículos, que está sujeto solamente a un error en las mediciones del largo y ancho (Bailey y col., 1998). En el trabajo de Bailey y colaboradores (1998), se demostró que esta fórmula predice con mucha exactitud el peso y el volumen testicular, ya que presenta una altísima correlación entre los datos que predice con los datos reales. También valoraron la utilización de calibres para obtener las medidas de ancho y largo en un animal vivo sin encontrar diferencias significativas con los datos obtenidos por ecografía o los datos reales de los testículos posteriores al sacrificio (Bailey y col., 1998).

El procedimiento de medición en el toro se puede realizar con cinta métrica o con calibre, se debe medir la circunferencia del escroto en el diámetro mayor, con los testículos dentro, esto nos da el ATE, Ancho Total del Escroto, (Veeramachaneni, 1986, extraído del trabajo de Hahn y Foote, 1969 y Almquist y col., 1976). Esto lo podemos trasladar al perro. Además la medida del ATE (Ancho Total del Escroto) es un importante predictor de la habilidad del perro en la producción y eyaculación de espermatozoides (Olar y col, 1983). A partir de las mediciones testiculares Bailey y colaboradores en 1998 enunciaron la fórmula de un esferoide prolado para calcular el volumen testicular, la cual fue verificada y aprobada. La fórmula es la siguiente:

$$V= 0.5236 (L) (ATE)^2$$

(L= largo total de los testículos).

(Bailey y col., 1998).

Para las mediciones testiculares también se puede usar el calibre electrónico aportado por la ultrasonografía. Y el volumen se puede calcular usando las medidas electrónicas:

$V= \pi/6.a.b.c$. Donde a= diámetro transversal, b= diámetro sagital y c= diámetro dorsal. La medición del volumen también se puede obtener midiendo el desplazamiento del agua en un frasco al colocar los testículos (England, 1991). En la actualidad la medición del largo, ancho y altura testicular por calibre testicular en el canino es de uso rutinario (Elits y col., 1993).

ECOGRAFIA TESTICULAR

La examinación clínica de los testículos es sencilla y practica para detectar deformaciones, alteración de la consistencia, dolor y calor, pero se puede complicar cuando el animal no permite la correcta palpación por ser agresivo, sentir dolor, miedo o ansiedad. Afortunadamente existe un método de análisis que nos permite obtener estos datos e ir más allá, sin causar perjuicio alguno sobre el animal.

La primer imagen ecográfica del parénquima de los testículos normales de los toros fue determinada en 1986 (Peachman y Elits). Según Cartee y colaboradores, (1989),

los testículos de toros normales con normal habilidad reproductiva son idénticos a la examinación por ecografía con el perro y el cerdo. Posteriormente en 1990, Charles. y colaboradores, establecen la US testicular normal del canino y concluyen que es muy parecida a la del humano y del cerdo. El uso del Ultrasonido en la Clínica Veterinaria es muy útil. La información obtenida confirma la anatomía normal o los signos de patología si tal es el caso (Davison y col., 2009). Puntualmente nos es útil para diferenciar la mayoría de las patologías que pueden ser tratadas clínicamente de las que necesitan resolución quirúrgica (Arger, 1981). Y en algún caso el descarte definitivo del animal como semental. La ecografía es un método eficaz y no invasivo para detectar patologías testiculares aun así cuando no sean identificables por palpación, así como para buscar testículos no descendidos, brindar información sobre la arquitectura interna, localización del órgano y posibles metástasis en cavidad abdominal (Pugh y Konde, 1991); también permite observar variaciones de tamaño, tumores, presencia de colectas peritesticulares, procesos inflamatorios y alteraciones en el epidídimo (Gobello, 2006), así como la progresión de las patologías como por ejemplo atrofia testicular (Davison y col., 2009).

Los principios de la ecografía se basan en la capacidad de los tejidos de retransmitir ondas sonoras de alta frecuencia. Una onda de presión acústica se emite desde un transductor piezoeléctrico y es transmitida a los tejidos adyacentes. La proporción de la ola que reacciona (eco) por diversas interfaces de tejidos es recibida por el transductor, convertida en energía eléctrica y se muestra como una imagen en escala de grises. La imagen en escala de grises se actualiza a gran velocidad. Estructuras líquidas (por ejemplo, los folículos ováricos) no reflejan ondas sonoras y aparecen en negro en la pantalla de visualización. Tejidos densos (por ejemplo, los huesos) reflejan la mayoría de las ondas y aparecerán en blanco. Otros tejidos (estroma ovárico, cuerpo lúteo) se ven en tonos de gris en función de su impedancia acústica. La ultrasonografía se compone de una matriz de píxeles o elementos de imagen, representada en una pantalla de video. Miles de píxeles en conjunto forman la imagen. Cada píxel representa un discreto reflector de tejido lo que se refiere a la reflexión de los rayos de ultrasonido y está representado por uno de 256 tonos de gris que van del negro al blanco. Las características del tejido o intensidad de tejido determinada por ecografía se puede observar, pero no se cuantifican fácilmente por el ojo humano. Adicionalmente, cada individuo percibe los datos en escala de grises de manera diferente, lo que lleva a los extremos de la variabilidad en la interpretación de la imagen (Pierson y Adams, 1995).

Para comprender estos datos, se miden utilizando algoritmos de computadora de desarrollo propio para utilizar en ultrasonido (Chandolia y col., 1996). En 2001 Kastelic y colaboradores también usaron la escala de grises de 256 niveles con resolución de 640 x 480 píxeles y luego la ecotextura testicular fue analizada con un programa específico, la ecotextura fue definida en término de valores promedio de píxeles usando valores del 0 (negro) al 255 (blanco) (Pierson y Adams, 1995).

Los testículos del canino y felino se visualizan dentro del escroto y el estudio de estos se hace comparando las imágenes de ambos testículos. En el testículo normal se observa una estructura uniforme con una ecogenidad similar a la del bazo. El mediastino testicular es una delgada línea muy hipoecoica ubicada en el centro del testículo. Los epidídimos tanto cabeza, cola como cuerpo son menos ecogénicos que los testículos. Los conductos deferentes son de difícil visualización. El cordón espermático es de un diámetro fino y tortuoso y se localiza adyacente a la cabeza de

los epidídimos (Davidson, 2009). Entorno a la información aportada por las mediciones testiculares, algunos autores desarrollaron líneas de investigación, incorporando al análisis reproductivo la Ultrasonografía. En 1986, Cartee y colaboradores, en su trabajo comenzaron a comparar los datos obtenidos por medición testicular del cerdo con la ecografía testicular, pero no obtuvieron éxito ya que no hubo correlación. Más tarde, se demostró en toros que la ecotextura testicular está altamente correlacionada con la zona de los túbulos seminíferos por lo tanto la ecografía testicular puede ser una evaluación potencial para la función testicular (Gabor y colaboradores, 1998). En 2001 Kastelic y colaboradores, relacionan las características escrotales, testiculares, la producción espermatozoides y la calidad del semen, determinando regresión negativa entre la circunferencia escrotal y la producción diaria de espermatozoides. Luego Arteaga y colaboradores, (2004) concluyeron en alteraciones agudas como las provocadas por el aislamiento escrotal en toros, que los datos aportados por la ecografía en cuanto a intensidad de píxeles y número de píxeles, no se correlacionan con la morfología, producción y motilidad de espermatozoides en el mismo tiempo, es decir que las alteraciones vistas en ecografía no se reflejan inmediatamente en la calidad del semen.

Coulter y Bailey (1988) determinaron que US testicular en toros, con 5MHz y durante 3 minutos, no provoca alteraciones apreciables en la calidad del semen. En cambio la radiología tiene efectos secundarios y además no permite la diferenciación de tejidos blandos. Entonces ante el planteamiento de hacer o no ecografía, habría que plantearse los riesgos frente a las ventajas usando este método.

HIPOTESIS

La Ultrasonografía es un buen predictor de la calidad del semen.

- Los tres métodos de medición testicular (Ancho Total del Escroto, Índice y Fórmula Matemática) son herramientas muy útiles para determinar el volumen testicular.
- Existe alta correlación entre las mediciones testiculares (Ancho Total del Escroto, Índice y Fórmula Matemática), el número total de espermatozoides (spz) y la concentración del eyaculado muestreado.

El tamaño testicular está influenciado por la edad y el peso corporal del individuo.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estimar la utilidad de tres diferentes métodos para determinar el volumen testicular (Ancho Total del Escroto, Índice y Fórmula Matemática) en relación al número total de espermatozoides y la concentración del eyaculado muestreado, así como la utilidad del uso de la ecografía para predecir la calidad del semen en la evaluación del potencial reproductivo del canino Cimarrón.

Objetivos específicos:

Determinar la relación entre mediciones testiculares, el número total de espermatozoides y concentración del eyaculado evaluado de perros de raza Cimarrón.

Determinar la relación entre la intensidad de píxeles de las imágenes ecográficas de los testículos con los parámetros seminales.

Establecer la existencia o no de correlación entre el tamaño testicular, el origen, la edad y el peso corporal del animal.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron perros Cimarrones pertenecientes a diferentes criadores y fueron elegidos como raza de estudio debido a la característica, de ser la única raza nacional, aprobada por la FCI en 2005. Las características de selección para los animales fueron de 2 a 8 años de edad, dos testículos descendidos y sin ninguna observación al examen clínico. Los machos con asimetría superior al 25% entre ambos testículos al examen testicular, no fueron considerados. Como requisito deberían haber estado en abstinencia sexual mínimo de 30 días (Rota y col., 1998), no logramos establecer un límite de abstinencia máximo ya que los criadores no pudieron brindarnos esta información. Al momento del estudio no se conocía si todos los reproductores tenían descendencia. Todos los machos fueron pesados previa evaluación. Los muestreos fueron realizados en el periodo noviembre-diciembre en ambas zonas, con éxito en todas las colecciones. Se utilizaron 38 animales en total, 18 machos provenientes de Montevideo, 18 machos de Costa de Oro y dos perras en celo, una para cada mes (noviembre- diciembre). Se eligieron aquellos con un peso promedio de 35,7 +/- 0,8 kg (desde 26 kg hasta 39 kg inclusive), con un promedio de edad de 74,2 ± 6,2 y meses, (incluyendo animales desde los 18 hasta los 109 meses).

Examen testicular

La medición de los testículos fue realizada con un calibre. Por intermedio de este, se midió el ancho total del escroto (ATE), el largo total de ambos testículos juntos, y el largo y ancho de ambos testículos por separado, incluyendo los epidídimos. La misma persona examinó a todos los perros (Dahlbom y col., 1995).

En base a los datos de estas medidas se establecieron tres alternativas de calificar a los machos:

- 1) El ATE (Olar y col., 1983).
- 2) Un índice (I) que caracteriza el desarrollo testicular mediante la fórmula: $I = (L_d + L_i/2) * ATE$ (L_d y L_i = largo del testículo derecho más epidídimo y largo del testículo izquierdo más epidídimo) (Subev y col., 1996).
- 3) Una fórmula que predice el volumen de los testículos. $V = 0.5236 (L) (ATE)^2$, como un esferoide prolado (L = largo total de los testículos) (Bailey y col., 1998).

Evaluación por Ultrasonografía de los testículos

Se utilizó un ecógrafo portátil modelo Wed 9618V (Welld, China) con un transductor lineal de 7,5 MHz. Sobre la superficie del escroto de cada testículo se colocó gel ecográfico. Se realizaron orientaciones transversales y longitudinales del transductor. La observación transversal se realizó perpendicular al eje mayor del testículo en el tercio craneal, medio y caudal. La observación longitudinal se realizó

paralelo al eje mayor de los mismos en la parte media y una imagen a cada lado del eje mayor (Pugh y col., 1990). El seteo del equipo se realizó igual en todas las observaciones previas a las sesiones de ecografía (Chandolia y col., 1996).

Análisis de Imágenes

Las imágenes digitalizadas fueron procesadas por intermedio de un software denominado Image Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics, USA) a una resolución de 640 x 480 píxeles y de forma estandarizada para todas las mismas según la metodología descrita por Pierson y Adams (1995) y Chandolia y col (1997). Cada imagen consiste en elementos denominados píxeles (Aravindakshan y col., 2000). La escala numérica en píxeles de valores de los grises de cada imagen individual está en un rango entre 0 y 255, donde el 0 corresponde al negro y el 255 corresponde al blanco. La escala de grises de los tejidos está en función de la microanatomía y del contenido líquido del mismo (los huesos de color blanco y una cavidad llena de líquido de color negro). La unidad de píxeles media fue determinada de cinco círculos, tomados al azar en cada una de las imágenes del parénquima del testículo (Aravindakshan y col., 2000). Estas mediciones se realizaron con la finalidad de determinar la intensidad de píxeles en las imágenes ecográficas digitalizadas (Chandolia y col., 1997). Por último se relacionó la intensidad de píxeles de las imágenes captadas para cada animal, con los parámetros de la calidad seminal seleccionados: motilidad y anomalías espermáticas del eyaculado evaluado.

Colección del semen

Se tomó un total de 72 muestras, dos por animal. El semen fue colectado por manipulación digital en presencia de una perra en celo y siempre por la misma persona. Se colectó dentro de un vaso colector de vidrio precalentado. La persona que realizó la colección, estuvo de pie detrás del perro, el cual estuvo reducido en sus movimientos. Se colocó una mano enguantada entre los miembros posteriores y se estimuló la porción del bulbo del glande, por masaje manual a través del prepucio. Cuando se logró una semierección se desplazó hacia caudal el prepucio, dejando libre el bulbo del glande. Posteriormente se dobló el pene de manera semejante a lo que ocurre cuando el mismo está abotonado (Forsberg, 1991). La primera fracción del semen proveniente de la próstata fue descartada, para conservar y evaluar la segunda porción, rica en espermatozoides (0.5- 3ml). Ésta se colocó por completo junto con una pequeña parte de la tercera porción para tener la seguridad de colectarla en forma completa, ya que la transición de estas dos últimas porciones no es fácil de determinar (Dahbom, 1995).

Evaluación del semen

Se registró volumen, pH y aspecto macroscópico de las distintas fracciones del eyaculado. La motilidad espermática (con un score de quintos) y el vigor (con un score de 0 a 5, de nada a máximo de vigor) fue evaluada inmediatamente en un microscopio de contraste Nikon Labophot, a 200x de magnificación y a 37°C.

La motilidad progresiva rectilínea a través del campo fue evaluada a 400x de la misma manera, diluyendo la muestra en suero fisiológico o diluyente isosmótico. La concentración espermática fue establecida, utilizando una cámara de Neubauer. También se utilizó la cámara de Neubauer para determinar el número de espermatozoides totales por eyaculado mediante el recuento de espermatozoides presentes en cada mililitro del total de cada muestra (Silva y col., 2003). Una alícuota fue diluida con formol bufferado para el examen de la morfología celular. Las anomalías espermáticas fueron evaluadas según Bane (1983). El semen fue preservado en formol salino bufferado. El porcentaje de vivos y muertos fue determinado usando una coloración de eosina-nigrosina, técnica de tinción basada en que la membrana de células dañadas o muertas pueden tomar esos colorantes. Los espermatozoides viables no muestran tinción y se visualizan brillantes sobre el fondo oscuro, mientras que los espermatozoides muertos tenían la cabeza teñida de rojo de forma parcial o total (método descrito por Bloom, mencionado por Blane, 1983). También se evaluó la funcionalidad de la membrana citoplasmática con la técnica de endosmosis (*Hypoosmotic Swelling Test*, HOST), donde a 100 microl de semen se le agregó 900 microl de una solución de fructosa hiposmótica (60mOsm), lo que causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo. Se incubó durante 45 minutos a 37°C (Rota y col., 2005). Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. La entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Las células con la membrana dañada no experimentarían cambios en la forma del flagelo.

Métodos Estadísticos

Para el análisis de los datos se usó el software estadístico R (R Core Team, 2016). Se estableció la estadística descriptiva de las variables consideradas: ATE, Índice, Volumen testicular, intensidad de píxeles y parámetro seminales).

Se realizó correlación de Pearson entre las características relevantes (ATE, I, Volumen testicular, n° total de espermatozoides y concentración espermática por mililitro, intensidad de píxeles).

Y para las características: peso corporal, edad del animal y origen se realizó análisis de varianza (ANOVA) y El ANOVA se basó en el siguiente modelo:

$$y_{ijk} = \text{Origen}_i + \text{Edad}_j + \text{Peso}_k + e_{ijk}$$

Donde:

y_{ijk} = a la observación del origen i , edad j y peso k

Origen_i = al origen de la observación (Montevideo, Costa de Oro)

Edad_j = la edad del individuo como covariable

Peso_k = peso del individuo como covariable

e_{ijk} = residuo asociado a la observación de origen i , edad j y peso k

RESULTADOS

Estadística descriptiva

Se obtuvieron 72 muestras de semen en total de los 36 Cimarrones que pertenecen a criaderos de dos zonas: la mitad a Montevideo y la otra mitad a la Costa de Oro. En la Tabla n° 2 se exponen datos descriptivos obtenidos por la medición con calibre del largo y perímetro de los testículos.

TABLA n° 2. Mediciones testiculares.

	Largo testículo izquierdo del	Largo testículo derecho del	ATE
M	4,3 ± 0,2	4,3± 0,2	5,1 ± 0,2
C	4,4 ± 0,1	4,4 ± 0,2	5,0 ± 0,1

Los datos se expresan en Promedio ± Error Estándar del muestreo de Montevideo (M) y Costa de Oro (C). ATE: Ancho Total del Escroto. La Unidad de medida es en cm.

Los datos obtenidos de las formulas aplicadas a la medición testicular del total de la muestra se comparan en la Tabla n° 3 donde se pueden observar el ATE, Índice y Volumen testicular.

TABLA n° 3. Descripción de las mediciones testiculares.

	ATE	Índice	Volumen Testicular
M	5,1±0,2	22,0± 1,3	60,1±5,3
C	5,0±0,1	22,6±1,1	60,8±4,5
Total	5,1±0,1	22,3±1,2	60,4±4,9

Los datos se expresan en Promedio ± Error Estándar de Montevideo (M) y Costa de Oro (C). Fórmulas: Ancho Total del Escroto (ATE), Índice y Volumen testicular (cm³). Volumen testicular (ml).

Los valores promedios de los parámetros macroscópicos (Volumen seminal y pH), los parámetros microscópicos (Morfología, % de Motilidad Individual, N° total de spz, Concentración, % Vivos / Muertos) y sus Errores Estándar se presentan en la Tabla n° 4.

TABLA n° 4: Parámetros seminales registrados.

	V (ml)	pH	Morfología a (%)	Motilidad individual (%)	N° Total	[] (N° spz/ml)	V/M (%)
M	3,0±0,3	6,5±0,1	24,7± 4,5	66,7±5,0	1489,5± 190,2	504,8±44,3	60,4±5,5
C	3,0±0,3	6,8±0,1	25,4 ±3,9	61,7± 4,9	1438,7± 177,4	481,4±36,6	58,3±5,0
P	3,0±0,3	6,6±0,1	25,1± 4,2	64,2± 4,9	1464,1± 183,8	493.1±40,5	59,4±5,2

Los datos se expresan en Promedio ± Error Estándar de Montevideo (M), Costa de Oro (C) y Promedio (P). V: volumen, V/M: % de espermatozoides de vivos y

muerdos, N° Total: Cantidad de espermatozoides (spz) por el volumen del semen, []: Concentración.

En la Tabla n° 5 se detallan los valores promedios de la intensidad de pixeles del parénquima testicular izquierdo y derecho con sus respectivos Errores Estándar determinados por el software sobre las imágenes ecográficas.

TABLA n° 5. Promedio de intensidad de pixeles del parénquima del par testicular.

	Testículo izquierdo	Testículo derecho	Promedio
M	150,3±3,3	133,4±2,3	141,9±1,9
C	160,7±2,5	141,8±1,9	151,3±1,7
P	155,5±2,9	137,6±2,1	146,6±1,8

Los datos se expresan en Promedio ± Error Estándar de Montevideo (M), Costa de Oro (C) y Promedio (P).

Estadística analítica.

Se realizó el estudio de la relación entre las mediciones testiculares que se observan en la Tabla n° 3. Se hallaron las siguientes correlaciones: 0,86 entre el ATE y el I, 0,92 entre el ATE y el VT y 0,99 entre el I y VT. Podemos decir entonces que encontramos alta correlación entre las mediciones testiculares.

También se analizó la correlación entre las mediciones testiculares y los parámetros seminales presentados en la Tabla n° 4; ATE y Concentración 0,08, I y Concentración 0,04, VT y Concentración 0,03. Por lo tanto podemos afirmar que ATE, I y VT se correlacionan pobremente con la concentración y número total e espermatozoides (menor a 0).

En este estudio también se planteó el análisis de la asociación entre la intensidad de pixeles tanto con las mediciones testiculares (ATE, I, VT), como con ciertos parámetros seminales. En el caso del ATE, I y VT, la correlación fue de -0,29, -0,12 y -0,21, respectivamente. Cuando analizamos los parámetros seminales, la correlación con la intensidad de pixeles fue de -0,31 para el caso del N° total de spz, -0,32 para la concentración, -0,36 para la morfología y de -0,4 para el caso de la motilidad individual; nuevamente encontramos baja correlación entre los parámetros analizados.

Para evaluar la influencia del origen, edad y peso corporal del individuo en el tamaño del testículo, se realizó el método estadístico "ANOVA". En las tres variables de respuesta (ATE, I, VT) se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para el efecto peso del individuo. Mientras que no se hallaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) para la edad y origen. Por lo tanto para nuestra muestra de 36 animales podemos decir que el tamaño testicular no se vio modificado al menos significativamente por la edad ni origen. Pero si se vio en cierta parte, afectado por el peso corporal.

DISCUSIÓN

En este trabajo encontramos que en cada par de testículos los valores fueron variables e independientes entre sí. Lamentablemente no existe literatura de las mismas herramientas de medición en la especie canina para comparar los datos. Pero existe similitud con otros autores (Chandolia y col., 1996) quienes determinaron en carneros que el diámetro testicular izquierdo y derecho tanto en plano transverso como longitudinal, no difieren. Un año después estos mismos autores determinaron que el diámetro del testículo izquierdo y derecho, en el novillo, no difieren siguiendo la misma metodología. Pugh y colaboradores (1990), realizaron estas mediciones en caninos pero con US, ellos hallaron mínimas diferencias por medición en el largo de los testículos izquierdos y derechos. También England (1991), realizó estas mediciones en caninos con US, nuevamente no se detectaron diferencias entre el par de testículos.

En el presente estudio se analizó la capacidad del ATE, Índice y de la fórmula matemática del esferoide prolado para determinar el volumen testicular. En la Tabla n° 3 se observa que estas tres medidas, se correlacionan altamente entre sí. De acuerdo con Love y colaboradores, (1991) que en su trabajo en equinos no hallaron diferencias significativas en los valores testiculares entre su medición física con calibre del largo, ancho y altura y la medición de largo, ancho y altura por ultrasonografía (US). Asimismo Gabor y colaboradores, (1998), encontraron alta correlación entre la circunferencia escrotal (CE) medida por calibre y el largo, ancho y altura medida por US y volumen testicular medido por el desplazamiento de agua. De la misma manera Hahn y Foote (1969) hallaron alta correlación entre la CE y el volumen testicular en toros de razas lecheras.

Siguiendo con la comparación de las mediciones testiculares y su relación con los parámetros seminales descritos en las Tablas n° 3 y n°4, hallamos que existe alta correlación entre las mediciones físicas, pero no observamos correlación con los parámetros seminales estudiados. En similitud, Cartee y colaboradores, (1989) hallaron alta correlación en toros, entre diámetro testicular (DT) medido por US y la circunferencia, el peso y el volumen testicular, que fue medido por el desplazamiento del agua. Ellos no encontraron correlación directa entre el DT y el análisis del semen. Pero un año más tarde Cartee y col. descubrieron en el cerdo alta correlación entre las mediciones físicas de la circunferencia escrotal (CE), circunferencia testicular (CT), diámetro testicular, peso testicular, volumen testicular y motilidad del semen. Previo a estos trabajos el autor Lino (1971) halló en carnero significativa correlación entre la CE y el peso testicular y con las reservas de espermatozoides en el epidídimo.

En las ecografías realizadas determinamos que no hubo correlación entre la intensidad de pixeles del parénquima testicular y las mediciones testiculares así como tampoco la hubo con los parámetros seminales. En contrapartida con el trabajo de Elits y colaboradores, (1993), quienes concluyeron que la medición testicular por US es un buen predictor del peso testicular, aunque el ATE sin US también es buen predictor del peso testicular.

Sin embargo Cartee y colaboradores, (1989) en toros hallaron alta correlación entre DT medido por US con la medición física de la circunferencia, el peso y el volumen

testicular (pero no con la medición de la circunferencia escrotal medida por US). Más tarde Cartee y colaboradores, (1990) realizaron un trabajo semejante en carneros pero encontraron que no hay correlación entre la medida física del Diámetro y Circunferencia testicular y la medida del Diámetro y Circunferencia testicular obtenido por US a través del escroto. El investigador England (1991) en su trabajo con caninos encontró alta correlación en el área del corte transversal del epidídimo por US y la medición física del volumen testicular.

También existen trabajos previos que asocian la US con los parámetros seminales; Elmore y colaboradores, (1976) hablaban de una eficacia relativa en la estimación de la habilidad para producir esperma de buena calidad a partir de la medición de la circunferencia escrotal con US. Más tarde Gipson y colaboradores, (1985) confirmaron asociación positiva entre la circunferencia escrotal medida por US y el número de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides vivos, motilidad y concentración de espermatozoide. Similar relación ya había sido reportada por Hahn y Foote (1969).

Otros autores (Cartee y col., 1986, 1989 y 1990) compararon tanto en cerdos como en toros y carneros, respectivamente, la US testicular con los parámetros seminales, sin encontrar correlación alguna. En adhesión England (1991) encontró baja correlación entre el área del corte transversal del epidídimo y los parámetros seminales.

Sin embargo Kastelic y colaboradores, (2001) hallaron regresión lineal positiva entre la ecotextura testicular y la producción diaria de espermatozoide. Así como también hallaron correlación positiva entre el porcentaje de morfología normal de espermatozoide, la producción diaria de espermatozoide y la ecotextura testicular, en su investigación realizada en toros.

En semejanza con la investigación de Elits y colaboradores, (1988), y Arteaga y colaboradores, (2004) encontraron que cuando comparaban en toros los valores de la intensidad de pixeles, obtenidos de la US testicular, con los parámetros seminales obtenidos en la misma semana de la realización de la US no había correlación significativa. En cambio en el mismo trabajo encontraron correlación significativa cuando compararon la US con muestras seminales extraídas una a tres semanas después del US, en similitud con el trabajo de Brito y colaboradores, (2003). Esto último concuerda con lo publicado por Elits y col., (1988), quienes concluyeron que la US no es buen predictor de la performance reproductiva, ya que la imagen es una foto del semen que será eyaculado 40 a 60 días después.

En el análisis de datos descubrimos alta correlación entre ATE, I, VT. Otros autores también encontraron correlación positiva entre el ATE o la SC (Amann y Almquist, 1976; Amann, 1981; Olar, Amann y Pickett, 1983; Subev, 1996) con el tamaño testicular, al mismo tiempo que el ATE es un buen predictor de la producción diaria de spz. Gipson y colaboradores, en 1985 en toros jóvenes hallaron asociación positiva entre la CE, porcentaje de spz vivos, número de spz y motilidad espermática. Sumado a esto Cartee y colaboradores, (1990) en su trabajo en carneros, sugieren que la CE puede ser asociada positivamente con la motilidad espermática y negativamente con el porcentaje de anomalías primarias. Asimismo, Kastelic y colaboradores, (2001), determinaron en toros, regresión lineal

positiva entre la CE y la motilidad espermática y regresión linear negativa con anomalías espermáticas primarias y regresión linear positiva con reservas epididimarias de esperma.

Para lograr el análisis referente al VT en este trabajo, aplicamos con éxito, la fórmula del esferoide prolado establecida en 1997 por Bailey y colaboradores. En cambio otros autores han utilizado el modelo de dos elipsoides para determinar el VT (Love y col, 1991), obteniendo también valores altamente correlacionados con el VT real (estimado por desplazamiento del agua). Pagona y colaboradores, (2008) usaron dos fórmulas, la de Lambert obtenida con valores aportados por la US "in vivo" obteniendo alta correlación, y la del elipsoide calculado a partir de su medición por calibre en el animal que también presentó alta correlación, aunque por US obtuvo la menor diferencia con el valor del volumen real del testículo; al mismo tiempo, concluye que la medición por US es más confiable que la medición por calibre, especialmente para el largo testicular.

No se encontró correlación entre el VT y los parámetros seminales analizados, en concordancia con el trabajo de Cartee y colaboradores (1986) en cerdos, quienes determinaron que los valores de la medición testicular por US no pueden relacionarse a los valores del análisis del semen, ni con el área del epitelio seminífero.

Siguiendo con la comparación de mediciones testiculares con los parámetros seminales, England (1991) en caninos, determinó que el volumen testicular calculado a través de la medición por US usando la fórmula del cálculo del volumen de un elipsoide, presenta significativa correlación con el VT obtenido por desplazamiento del agua, pero pobre correlación entre el volumen testicular y los parámetros seminales.

Tampoco obtuvimos correlación alguna entre el ATE y los parámetros seminales, en contradicción con algunos autores, como Olar y colaboradores, (1983) quienes hallaron correlación entre el ATE del canino con el peso testicular, y alta correlación con la producción diaria de spz y la expulsión diaria de spz. Gipson y colaboradores, (1985) en novillos, hallaron asociación positiva entre la circunferencia escrotal y porcentaje de spz vivos, número de spz, motilidad espermática y concentración espermática. Otros autores (Johnson y col., 1994) determinaron alta correlación entre la CE y el peso testicular, pero moderada correlación con la producción diaria de espermatozoides.

En relación a nuestro trabajo en cuanto al peso corporal y la edad del individuo y el tamaño testicular encontramos diferencias con el estudio de Hahn y Foote (1969), quienes hallaron en toros de razas lecheras, alta correlación entre la CE y la edad del individuo hasta los 6 años de edad, luego esa correlación declina. Y también diferimos con Chandolia y colaboradores, (1997) pues hallaron alta correlación entre el diámetro testicular y la edad del toro ($p < 0,05$). Sin embargo Elmore y colaboradores, (1976) midieron la circunferencia escrotal en toros jóvenes y hallaron que no había correlación a la edad y peso corporal de los individuos. Y en similitud con nuestro trabajo; Dahlbom y colaboradores, (1997) determinaron en el Irish Wolfhound, que la edad del individuo no influyó en la calidad del semen o el tamaño testicular.

CONCLUSIONES

Determinamos alta correlación entre las mediciones testiculares (ATE, Índice, y VT) en similitud con el trabajo de Love y colaboradores y con otros autores. Por lo tanto cualquiera de ellas son herramientas eficaces para medir los testículos. En cuanto a la posible correlación entre las mediciones físicas y los parámetros seminales, concluimos que no existe correlación, en este punto nos encontramos con varios autores en acuerdo y otros con conclusiones arbitrarias a nuestro trabajo. Tampoco encontramos correlación alguna entre la intensidad de píxeles a partir de la US testicular y los parámetros seminales así como tampoco con las mediciones testiculares físicas. En contrapartida con Hahn y colaboradores y Gipson y colaboradores. En cuanto a la relación de tamaño y forma de cada par de testículos podemos decir que no difieren uno del otro en similitud con la mayoría de los autores analizados en el presente trabajo. Respecto a las mediciones testiculares y su correlación con la edad y peso corporal del respectivo animal, se reportaron diferencias significativas con la edad pero no con el peso corporal del animal.

Evaluando posibles factores por los cuales no obtuvimos altas correlaciones como en el reporte de varios autores, pensamos que tal vez nuestro tamaño de muestra fue pequeño y quizás en próximos trabajos deberíamos considerar mejorar este punto. Otro factor que nos parece muy importante a tener en cuenta es que la imagen obtenida por US, no es reflejo del semen extraído en el mismo día. Lo que se ve del parénquima testicular es el material que será eyaculado cuarenta a sesenta días después. Por lo tanto la medición de la ecotextura testicular en base a la intensidad de píxeles en animales sanos, no es útil para estimar la calidad de los parámetros seminales considerados en nuestras condiciones experimentales. Para contrarrestar esta diferencia, proponemos en futuros trabajos, aumentar el tamaño de la muestra y realizar extracción de las muestras de semen en determinados intervalos de tiempo (teniendo en cuenta el período de la espermatogénesis) posteriores a la ecografía.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmad N, Noakes D. E., Middleton D. J. (1993). Use of ultrasound to diagnose testicular degeneration in a goat. *The Veterinary Record* 132(1): 436-439.
2. Allen W. E., (1992) Anatomía del Aparato reproductor del perro. En: Allen W. E. Fertilidad y obstetricia canina. Zaragoza, Acribia. pp 33-67.
3. Almquist J. O. Branas R. J., Barber K. A. (1976). Postpuberal Changes in Semen Production of Charolais Bulls Ejaculated at High Frequency and the Relation between Testicular Measurements and Sperm Output. *American Society of Animal Science* 42 (3): 670-676.
4. Amann R. P. y Almquist J. O. (1976). Bull management to maximize sperm output. *Proceedings of Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*.
5. Amann R. P., (1981). A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *Journal of Andrology*, 2(1): 37-58.
6. Aravindakshan J. P. , Honoramooz A, Bartlewski P. M., Beard A. P., Pierson R. P., Rawlings N. C. (2000). "Gonadotrophin secretion in prepubertal bull calves born in spring and autumn". *Journal of Reproduction and Fertility* 120: 159-167.
7. Arger P. H., Mulhern C. B., Coleman B.G., Pollack H. M., Wein A., Koss J., Arenson R., Banner M. (1981). Prospective Analysis of the Value of Scrotal Ultrasound. *Radiology* 141: 763-766.
8. Arteaga A. A., Barth A. D., Brito L. F. C. (2005). Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. *Theriogenology* (64): 408-415.
9. Bane A. (1983) Morphological evaluation on semen. *Proceeding XV FAO Postgraduate Course on Animal Reproduction, Sweden*.18 p.
10. Bailey T. L., Monke D. R., Hudson R. S., Wolfe D. F., Carson R. L., Riddell G. (1996). Testicular shape and its relationship to sperm production in mature Holstein bulls. *Theriogenology* 46: 881- 887.
11. Bailey T. L., Hudson R. S., Powe T. A., Riddell M. G., Wolfe D. F., Carson R. L. (1998). Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining volume and weight in vivo “, *Theriogenology* 49: 581-594.
12. Batista J. R., (2011). Relación y correlación existente entre circunferencia escrotal, peso corporal y edad, en toros Brahman de 18 a 60 meses de edad en la provincia de Chiriquí. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*. Chiriquí 12 (1): p 1 – 9. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010111.html> . Fecha de consulta abril 2015.
13. Bloom W., Fawcett D. W. (1988). Sistema reproductor masculino. En: *Tratado de Histología*. Madrid, 12ª edición. Ed Interamericana Mcgraw- Hill. Pp 833-883.

14. Brady J. K., Goss S. A., Johnston R. L., o'Brien W. D., Dunn F. (1976). Ultrasonic propagation properties of mammalian testis. *J. Acoust. Soc. Am.* 60: 1407-1409.
15. Brito L. F. C., Silva A. E. D. F., Barbosa R. T., Unanian M. M., Kastelic J. P. (2003). Effects of scrotal insulation on sperm production semen quality, and testicular echotexture in *Bos Indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls. *Animal Reproduction Science* 79: 1-15.
16. Cartee R. E., Powe T. A., Gray B. W., Hudson R. S., y Kuhlers D. L. (1986). Ultrasonographic evaluation of normal boar testicles". *American Journal of Veterinary Research* 47: 2543-2548.
17. Cartee R.E., Powe T. A., Gray B. W., Hudson R.S., Whitesides J. (1989) Preliminary implications of B mode ultrasonography of testicles of beef bulls with normal breeding soundness examinations. *Theriogenology* 31: 1149 - 1157.
18. Cartee R. E., Rumph P. F., Abuzaid S., Carson R. (1990). Ultrasonographic examination and measurement of the ram testicles. *Theriogenology* 33: 867-875.
19. Cervený C., König H. E., Liebich H-G., (2005). Órganos genitales masculinos. En: Cervený C., König H. E., Liebich H-G. *Anatomía de los animales domésticos*. Bs As, Médica panamericana, V. 2, p 119-134.
20. Chandolia R. K., Bartlewski P. M., Omeke B. C., Beard A. P., Rawlings N. C., Pierson R. A., (1996). Ultrasonography of the developing reproductive tract in ram lambs: effects of a GnRH agonist. *Theriogenology* 48: 99 -117.
21. Chandolia R. K., Honaramooz A., Omeke B. C., Pierson R., Beard A. P., Rawlings N. C., (1997). Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. *Theriogenology* 48: 119 – 132.
22. Concannon P. W., Batista M. (1989). Canine semen freezing and artificial insemination. En: John D. B., David C. T. Kirck's *Current Veterinary Therapy in Small Animals*. San Luis, Elsevier Saunders pp 1247-1258.
23. Cortez A.A, Aquino-Cortez A, Silva A.R, Cardoso R.C.S, Silva L.D.M (2002). Relação entre perímetro escrotal e concentração espermática em cães, clinicamente normais, da raça Pastor Alemão. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 54(5): 549-550.
24. Coulter G. H., Foote R. H. (1979). Bovine Testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to reprod. *Theriogenology* 11: 279-311.
25. Coulter G. H., Bailey D. R. C. (1988). Effects of Ultrasonography on the bovine testis and semen quality. *Theriogenology* 30: 743-749.
26. Cunningham J. G., Bradley G. K. (2003). Reproducción y lactación. En: Cunningham J. G., Bradley G. K. *Fisiología Veterinaria*. 3a ed. Barcelona, Elsevier: pp 373- 420.

27. Dahlbom M., Andersson M., Huszenicza G., Alanko M. (1995). Poor semen quality in Irish wolfhounds: a clinical, hormonal and spermatological study. *Journal of Small Animal Practice* 36: 547-552.
28. Dahlbom M., Andersson M. Juga J., Alanko M. (1997). Fertility parameters in male Irish wolfhound: a two year follow-up study. *Journal of Small Animal Practice* 38: 547-550.
29. Davidson A., P (2009). Reproductive Ultrasound of the Dog and Tom. *Topics in Companion Animal Medicine* 24 (2): 64 -70.
30. Dellmann H. D., Wrobel K. H., (1976). Sistema reproductor masculino. En: Dellmann H. D. *Histología Veterinaria*. Zaragoza, Acribia: p 313 – 339.
31. Elits B. E., Pechman R. D. (1988). B- Mode ultrasound observations of bull testes during breeding soundness examinations. *Theriogenology* 30: 1169-1176.
32. Elits B. E., Williams D. B., Moser E. B. (1993). Ultrasonic measurement of canine testes. *Theriogenology* 40: 819-828.
33. Eilts B. E. (2004). Disponible en: http://www.vetmed.lsu.edu/eiltslotus/theriogenology-5361/male%20reprod_2.htm. Fecha de consulta: 14 de marzo de 2016.
34. Elmore R. G., Bierschwal C. J., Youngquist R. S. (1976). Scrotal circumference measurements in 764 beef bulls. *Theriogenology* 6 (5): 485-494.
35. England G. C. W., Allen W. E. (1989). Seminal characteristics and fertility in dogs. *Veterinary Record* 125: 399.
36. England G. C. W. (1991). Relationship between ultrasonographic appearance, testicular size, spermatozoal output and testicular lesions in the dog. *Journal of Small Animal Practice* 32: 306-311.
37. Fields M. J., Burns W. C., Warnick A. C. (1979). Age, season and breed effects on testicular volume and semen traits in young beef bulls. *Journal of Animal Science* 48: 1229-1334.
38. Fila D., Berglavaz A., Elhordoy D. (2001). Comparación de tres técnicas citológicas para la realización de Colpocitología en la perra. VII Congreso Nacional de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. CD- ROM, biblioteca de Facultad de Veterinaria.
39. Fila D (2013). Estacionalidad y características reproductivas en perras cimarronas. En: Llambí S. D., Gagliardi R. B. *Conociendo al perro cimarrón uruguayo*. Montevideo. Ediciones Universitarias. 102 p.
40. Gil J., (2003). El espermatozoide, desde la espermiación hasta la fecundación. En: Ungerfield R. *Reproducción en los animales domésticos tomo 1*. Montevideo, Melibea 1: 93 – 111.
41. Gabor G., Sasser R. G., Kastelic J. P., Mezes M., Falkay G. Y., Bozo S., Volgyi Csik J., Barany I., Hidas A., Szasz Jr. F., Boros G. (1998). Computer analysis of video and ultrasonographic images for evaluation of bull's testes. *Theriogenology* 50: 223-228.

42. Gipson T. A., Vogt D. W., Massey J. W., Ellersieck M. R. (1985). Associations of scrotal circumference with semen traits in young beef bulls. *Theriogenology* 24: 217-225.
43. Gradil C. M., Yeager A., Concannon P. W. (2006). Evaluación de los problemas reproductivos del macho canino. *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Ithaca, U.S.A. 14 p. Disponible en: http://www.ivis.org/advances/Concannon/gradil_es/chapter.asp?LA=2
Fecha de consulta: 14 de marzo del 2016.
44. Hahn J. R., Foote R. H., Seidel G. E. (1969) Testicular growth and related sperm output in dairy bulls. *Journal of Animal Science* 29: 41.
45. Hahn J. R., Foote R. H. (1969). Ultrasonic treatment of rabbit testes. *Journal of Animal Science* 28: 230-232.
46. Hricak H., Lue T., Filly R. A., Alpers C.E., Zeineh S.J., Tanagho E.A. (1983). Experimental study of the sonographic diagnosis of testicular torsion. *Journal of Ultrasound in Medicine* 2: pp 349-356.
47. Johnson W. T., Thompson J. A., Kumi-Diaka J., Wilton J. W. y Mandell I.B. (1995). The determination and correlation of reproductive parameters of performance tested Hereford and Simmental bulls. *Theriogenology* 44: 973-982.
48. Kastelic J. P., Cook R. B., Pierson R. A., Coulter G. H. (2001). Relationship among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 65: 111-115.
49. Kawakami E., Tsutsui T., Yamada Y., Yamauchi M. (1984). "Cryptorchidism in the dog: occurrence of cryptorchidism and semen quality in cryptorchid dogs. *Japanese Journal of Veterinary Science* 46: 303-308.
50. Keenan L. R. J. (2000). Infertilidad en el macho. En Simpson G. M., England G. C. W., Harvey M. J. *Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales*. Barcelona. Ediciones S, pp 109-165.
51. Kenney R. M., Hurtgen J., Pierson R., Witherspoon D., Simons J. (1983). *Theriogenology and the equine*. Part II. The stallion Hastings, Society for Theriogenology, 100 p. Disponible en: <http://research.vet.upenn.edu/Portals/49/TherioBooklet.pdf> Fecha de consulta: 27 de octubre de 2016.
52. Keuerk M. E., (2013). Utilización de mediciones testiculares y evaluación seminal estacional en perros Ovejero Alemán. Tesis. Facultad de Veterinaria. UdelaR. 42 p.
53. Latimer F. G., Wilson L. L., Caine M. F., Stricklin W. R. (1982). Scrotal measurements in beef bulls: heritability estimates, breed and test station effects. *Journal of Animal Science* 54: 473-479.
54. Lenz S., Thompsen J. K., Giwercman A., Hertel N. T., Hertz J., Skakkebaek N. E. (1994). Ultrasonic texture and volume of testes in infertile men. *Human Reproduction* 9: 878-881.
55. Linde Forsberg C., Forsberg M. (1989). Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl* .39: 299-310.

56. Linde Forsberg C. (1991). Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice* 21: 467-485.
57. Linde-Forsberg C. (2006). Inseminación artificial. En: Wanke M, Gobello C. *Reproducción en caninos y felinos domésticos*. Buenos Aires: Inter-Médica. p 175-194.
58. Linford E., Glover F. A., Bishop C., Stewart D. L. (1976). The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *Journal of Reproduction and Fertility* 47: 283-291.
59. Lino B. F. (1972). The output of spermatozoa in rams. II Relationship to scrotal circumference, testis weight and the number of spermatozoa in different parts of urogenital tract. *Australian Journal of Biology Science* 25: 359-366.
60. Llambí S. D., Gagliardi R. B. (2013). *Conociendo al perro cimarrón uruguayo*. Montevideo. Ediciones Universitarias. 102 p.
61. Love C. C., Garcia M. C., Riera F. R., Kenney R. M. (1991). Evaluation of measures taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 44: 99-105.
62. Lunstra D. D., Echterkamp S. E. (1982). Puberty in beef bulls: acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. *Journal of Animal Science* 55: 638-648.
63. Miskin M., Bain J. (1974). B-mode ultrasonography examination of the testes. *Journal of Clinical Ultrasound* 2: 307-311.
64. Oettle E. E., Soley J. T. (1988). Anomalías de los espermatozoides en el perro: estudio de imágenes obtenidas al microscopio óptico y electrónico. *Noticias Medico Veterinarias* 59: 28- 70.
65. Olar T. T., Amann R. P., Picket B. W. (1983). Relationship among testicular size, daily production and output of spermatozoa, and extragonadal reserve of the dog. *Biology of Reproduction* 29: 1114-1120.
66. Olson P. N., Behrendt M. D., Weiss D. E. (1987). Reproductive problems in the bitch: finding answers through vaginal cytology. *Veterinary Medicine* 82: 344-351.
67. Ortega-Pacheco A., Segura-Correa J.C., Bolio-Gonzalez M.E., Jiménez-Coello M., Linde Forsberg C. (2006). Reproductive patterns of stray male dogs in the tropics. *Theriogenology* 66 (9): 2084-2090.
68. Pagona G. G., Apostolos D. G., Leonidas S. L. (2008). Comparison between ultrasonographic and caliper measurements of testicular volumen in the dog. *Animal Reproduction Science* 108: (1-2): 1-12.
69. Pechman R. D., Eilts B. E. (1987). B-mode ultrasonography of the bull testicle. *Theriogenology* 27: 431-441.
70. Pierson R. A., Adams G. P. (1995). Computer-assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bedfellows. *Theriogenology* 43: 105-112.
71. Pineda M. H. (1991). Sistema reproductor de la hembra. En: McDonald L. E., Pineda M. H. *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. 4ª ed. México, Ed Interamericana –McGraw-Hill p: 294-344.

72. Plummer J. M., Watson P. F., Allen W. E. (1987). A spermatozoal midpiece abnormality associated with infertility in a Lhasa Apso dog. *Journal of Small Animal Practice* 28: 743-751.
73. Pugh C. R., Konde L. J. (1991). Sonographic evaluation of canine testicular and scrotal abnormalities: a review of 26 case histories. *Veterinary Radiology* 32 (5): 243-250.
74. Pugh C. R., Konde L. J., Prak R. D. (1990). Testicular ultrasound in the normal dog. *Veterinary Radiology* 31(4): 195-199.
75. Renton J. P., Harvey M. J., Harker S. (1986). A spermatozoal abnormality in dogs related to infertility. *Veterinary Record* 118(15): 429-430.
76. Rocha A., Carpenter B. B., Hawkins H. E., Sprou L. R., Forrest D. W. (1994). Correlation of in vivo testicle and seminal vesicles size with postmortem dimensions in bulls. *Theriogenology* 42: 1171-1175.
77. Rota A., Linde-Forsberg C., Vannozzi J., Romagnoli S., Rodriguez-Martinez H. (1998). Criosurvival of dog spermatozoa at different glicerol concentrations and freezing/thawing rates. *Reproduction in Domestic Animals* 33: 355-361.
78. Rota A., Rota A., Martini M., Milani C., Romagnoli S. (2005). Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reproduction and Nutrition Development* 45: 29-37.
79. Medardo V. Hernández R., (1995). En: Sacristán A. G., Montijano F. C., Palomino L. F., Gallego J. C., Silanes M. L., Ruiz G. S. *Fisiología Veterinaria*. Madrid. McGraw-Hill · Interamericana: p 969 – 986.
80. Sidibe M., Franco L. A., Fredriksson G., Madej A., Malmgren L. (1992). Effects of testosterone, LH and cortisol concentrations, and on testicular ultrasonographic appearance of induced testicular degeneration in bulls. *Acta Veterinaria Scandinavica* 33(3): 192-196.
81. Silva A. R., Cardozo R. C. S., Uchoa D. C., Silva L. D. M. (2003). Quality of canine semen submitted to single or fractionate glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology* 59: 821-829.
82. Silveira C., Fernández G., Barba C. C. (1998). El perro Cimarrón, la raza canina autóctona del Uruguay. *Archivos de Zootecnia*, 47(178): 533-536.
83. Sorribas C. E. (1999). *Reproducción en los animales pequeños*, 2ª ed. Buenos Aires, Inter-Médica, 200 p.
84. Stornelli M. A. (2003). Evaluación de semen en caninos. Interpretación de los resultados obtenidos. En: Ungerfeld R., *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea, V.2: 419-427.
85. Subev M., Ivanova-Kicheva M. G., Somlev B. (1996). Testes size and sperm production in dogs. *Macedonian Journal of Reproduction* 2(1): 99-103.
86. Threlfall W. R., (2005). Recolección y evaluación del semen. En: Root M. K. *Manual de reproducción del perro y del gato*. Barcelona. Multimedia ediciones veterinarias. 280 p.
87. Thompson H. A., Johnson W. H. (1994). Scrotal size of yearlings sires and early calving in beef herds: epidemiological investigation of possible causal pathways. *Theriogenology* 43: 1279-1287.
88. Vargas, C. V.; Bode, F. F.; Flores Quintana, C. I. (2012). "Morfogénesis del sistema reproductor del perro". *Revista Veterinaria* 23 (2): 90-94. Disponible

en: www.scielo.org.ar/pdf/revet/v23n2/v23n2a03.pdf Fecha de consulta: 05 de enero, 2016.

89. Veeramachaneni D. N. R., Ott R. S., Heath E. H., McEntee K., Bolt D. J., Hixon J. E. (1986). Pathophysiology of small testes in beef bulls; relationship between scrotal circumference, histopathology features of testes and epididymis, seminal characteristics and endocrine profiles. *American Journal of Veterinary Research* 47(9): 1988-1999.
90. Weber J. A., Woods G. L. (1993). Ultrasonographic measurement of stallion accessory sex glands and excurrent ducts during seminal emission and ejaculation. *Biology of Reproduction* 49: 267-273.
91. Zeo G. B., Molina E. M. (2006). Uso de la ultrasonografía en el aparato reproductor. En: Wonke M. M., Gobello C. *Reproducción en caninos y felinos domésticos*. Buenos Aires. Intermedica p 172-173.