

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**PARÁMETROS REPRODUCTIVOS EN CARNEROS QUE FUERON CRIADOS
ARTIFICIALMENTE O POR SUS MADRES**

POR

Santiago Patricio MACHADO BERNARDI

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

Modalidad: Ensayo Experimental

**Montevideo
Uruguay
2016**

PÁGINA DE APROBACIÓN:

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Segundo miembro (Tutor):

Dr. Juan Pablo Damián

Tercer miembro:

Cuarto miembro (Co-Tutor):

Dr. Rodolfo Ungerfeld

Quinto miembro (Co-Tutor):

Lic. Florencia Beracochea

Fecha:

Autor:

Santiago Machado Bernardi

AGRADECIMIENTOS:

Primero y principal, quiero agradecer a mi padre (también Doctor Veterinario) Danilo Machado, quien me inculcó el gusto por la carrera e incentivó a estudiar desde que comencé a hacerlo. También agradecer a mi madre Estela Bernardi y a mis hermanos Valentina Machado, Mauricio Machado y Alejandro Gil, quienes al igual que mi padre fueron, son y serán pilares muy importantes en mi vida, influyeron en la persona que soy hoy, y por lo tanto, también en este logro alcanzado. Por otro lado, también quiero agradecer a todos mis amigos (son muchos, pero cada uno de ellos sabe lo importantes que son para mi) quienes también han sido gran compañía y sostén a lo largo de la carrera y la vida y a mis compañeros de trabajo quienes fueron un respaldo cuando lo necesité. En cuanto a lo académico, primero y principal quiero agradecerle a mi Tutor Juan Pablo Damián, quién no solo fue un excelente tutor, sino también mi guía en mis primeros pasos en el campo laboral dentro del área veterinaria. A mis cotutores Florencia Beracochea quien siempre estuvo dispuesta a colaborar y fue de gran ayuda a lo largo del desarrollo de la Tesis y a Rodolfo Ungerfeld quien con su experiencia y dedicación, permitió mejorar mi rendimiento. Tampoco quiero olvidarme de los docentes y educadores que tuve en la Escuela y Liceo San Francisco de Sales, Bachillerato Juan XXIII, y Facultad de Veterinaria, quienes formaron parte de mi formación como persona y estudiante. También quiero mencionar a todas aquellas personas que formaron parte de este gran proyecto ya que sin ellas, esto no hubiera sido posible: César, Guillermo, Carol, Natalia, Laura, Conrado, a los funcionarios de la unidad de ovinos de INIA La Estanzuela y a los equipos profesionales de Facultad de Veterinaria de Fisiología Reproductiva y Bioquímica. Para finalizar, agradecer a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación quien financió el presente proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	IV
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	3
3. INTRODUCCIÓN	5
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
4.1 Vínculo madre – cría	6
4.1.1 Destete: Interrupción del vínculo madre – cría	8
4.1.2 Factores sociales que influyen en el desarrollo del cordero	8
4.1.3 Influencia de la presencia de la madre durante la lactancia sobre el desarrollo del cordero	9
4.2 Fisiología de la reproducción del carnero	10
4.2.1 Desarrollo reproductivo	10
4.2.2 Espermatogénesis	11
4.3 Semen	12
4.3.1 Colección seminal	13
4.4 Estacionalidad y estrategia reproductiva	14
5. HIPÓTESIS	16
6. OBJETIVO	16
7. MATERIALES Y MÉTODOS	16
7.1 Animales y su manejo	16
7.2 Peso corporal, circunferencia escrotal e índice gónado-somático	17
7.3 Determinación de la concentración sérica de testosterona	17
7.4 Evaluación seminal	17
7.5 Análisis estadístico	18
8. RESULTADOS	19
8.1 Estación no reproductiva	19
8.1.1 Peso, circunferencia escrotal e índice gónado-somático	19
8.1.2 Concentración sérica de testosterona	19
8.1.3 Parámetros seminales	19
8.2 Estación reproductiva	19

8.2.1	Peso, circunferencia escrotal e índice gónado-somático	19
8.2.2	Concentración sérica de testosterona	20
8.2.3	Parámetros seminales	20
9.	DISCUSIÓN	26
10.	CONCLUSIÓN	27
11.	BIBLIOGRAFÍA	28

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Páginas
Figura 1: Espermatozoide y sus regiones	13
Tabla 1. Efecto del tratamiento, tiempo e interacción tratamiento*tiempo sobre los parámetros fisiológicos y seminales de carneros criados artificialmente y por sus madres durante la estación no reproductiva y la estación reproductiva	21
Figuras 2A y 2E: Peso corporal	22
Figuras 2B y 2F: Circunferencia escrotal	22
Figuras 2C y 2G: Índice gónado-somático	22
Figuras 2D y 2H: Concentración sérica de testosterona	22
Figuras 3A y 3D: Motilidad en masa	23
Figuras 3B y 3E: Porcentaje de espermatozoides con motilidad individual	23
Figuras 3C y 3F: Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva	23
Figuras 4A y 4C: Concentración de espermatozoides	24
Figuras 4B y 4D: Total de espermatozoides por eyaculado	24
Figuras 5A y 5D: Porcentaje de espermatozoides con morfología normal	25
Figuras 5B y 5E: Porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro	25
Figuras 5C y 5F: Porcentaje de espermatozoides con membrana intacta	25

1. Resumen

La presencia y vínculo entre el cordero y su madre son fundamentales para el posterior desarrollo del cordero. El ambiente social en que se desarrollan los corderos influye sobre su desarrollo y desempeño reproductivo en la edad adulta, pero no se ha determinado la influencia del vínculo madre-cría sobre el mismo cuando son adultos. El objetivo de la tesis fue determinar si la crianza sin la presencia de la madre altera la concentración sérica de testosterona y los parámetros reproductivos en la etapa adulta. Se utilizaron 27 corderos de la raza Ideal, los que se adjudicaron a 2 grupos: corderos criados artificialmente desde las 24-36 h de edad (CA, n=14), los que fueron criados en base a leche de oveja, y corderos criados por sus madres (CM, n=13). Cuando los corderos llegaron a los 2.5 meses de vida se realizó por un lado, el desleche del grupo CA y por otro, el destete del grupo CM. A partir de los 2.5 meses se ofreció ración y fardos a todos los animales, los que fueron mantenidos a campo, con agua *ad libitum* y acceso a sombra artificial. El presente trabajo comenzó a partir de la semana 42 de vida de los corderos y concluyó en la semana 90. En dicho período se estudió a los animales en la estación no reproductiva y en la estación reproductiva. Se les extrajo sangre cada 7-15 días para evaluar las concentraciones séricas de testosterona. Cada 15-20 días fueron pesados, se midió la circunferencia escrotal y se colectó y evaluó semen. Todas las variables fueron comparadas por ANOVA para mediciones repetidas, donde se incluyó el efecto del grupo (CA vs CM), del tiempo y la interacción entre ambos. En la estación no reproductiva, no hubo efecto de grupo en ninguna de las variables. Hubo interacción entre el tratamiento y el tiempo en el peso corporal ($P = 0.02$) y el índice gónado-somático ($P = 0.05$). El peso corporal disminuyó de la semana 50 a la semana 52 ($P = 0.043$) y de la semana 62 a la 64 ($P = 0.002$) en el grupo CM, mientras que estos cambios no se observaron en el grupo CA. Los carneros CM obtuvieron mayor índice gónado-somático en la semana 47 ($P = 0.016$) y una tendencia a tener mayor índice en la semana 52 ($P = 0.08$) en comparación con los corderos CA. El tiempo afectó el peso corporal, la circunferencia escrotal, el índice gónado-somático, las concentraciones séricas de testosterona, la motilidad en masa, individual y progresiva y el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro ($P < 0.05$). La concentración de espermatozoides y el total de espermatozoides en el eyaculado tendieron a cambiar con el tiempo ($P < 0.09$) y no hubo efecto del tiempo para el porcentaje de espermatozoides con morfología normal ni con el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta. En la estación reproductiva tampoco se observó efecto de grupo en ninguna de las variables. Hubo interacción entre tratamiento y tiempo en el peso corporal. Mientras que, por un lado, el peso corporal aumentó de la semana 69 a la 72 ($P = 0.001$) y de la semana 85 a la 88 ($P = 0.004$) en el grupo CM no se observaron cambios en las mismas semanas en el grupo CA. Por otro lado, mientras que el peso corporal disminuyó de la semana 72 a la 74 ($P = 0.004$) y aumentó de la semana 74 a la 76 ($P = 0.0001$) en el grupo CA, en el grupo CM no se observaron cambios. El tiempo afectó el peso corporal, la circunferencia escrotal, el índice gónado-somático y las concentraciones séricas de testosterona ($P < 0.0001$). El grupo CA tuvo una tendencia a tener mayor

porcentaje de espermatozoides con morfología normal que el grupo CM ($61.9 \pm 2.7 \%$ vs $54.3 \pm 2.7 \%$, respectivamente, $P = 0.067$). A excepción del porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro, todos los parámetros seminales variaron con el tiempo ($P < 0.006$). En conclusión, la ausencia de la madre en la etapa de lactación no afectó la circunferencia escrotal, la concentración sérica de testosterona y los parámetros seminales en la etapa adulta de los carneros.

2. Summary

It is already clear that the presence and bond between the lamb and its mother are essential for the subsequent development of the offspring. Despite being known that the social environment where the lambs grow up has effects on their development and reproductive performance in their adult life, it still remains to be known how the mother-lamb bond influences the reproductive development. The intention of the thesis was to determine whether the presence or not of the mother during lactation period alters the seric testosterone concentrations and the reproductive parameters of the adult rams. In this study 27 Polwarth rams were used, 14 of which were separated from their mothers at 24-36 h after birth and artificially reared with sheep milk (CA, n=14) while other 13 were raised by their dams (CM, n=13). When both groups of lambs were 2.5 months old, CA's stopped receiving milk and CM's group weaning was carried out. From then on, the two groups were handled in different paddocks, where they were given solid ration every day besides having free access to water and artificial shadow. The experiment began when lambs were 42 weeks old and concluded when they were 90 weeks old. During this period the animals were studied along the non-breeding season as well as the breeding season. Blood samples were collected every 7-15 days for serum testosterone concentrations analysis. Body weight, scrotal circumference measurement and the collection and assessment of semen samples were systematically performed every 15-20 days. All the variables were compared by ANOVA for repeated measures, which included the effects on the groups (CA vs. CM), time and the interaction between them. It has been observed that during the non-breeding season, there was no group effect on any of the variables. There was interaction between treatment and time in corporal weight ($P = 0.02$) and gonado-somatic index ($P = 0.05$). However, the corporal weight decreased from week 50 to week 52 ($P = 0.043$) and from week 62 to week 64 ($P = 0.002$) in CM's group. On the other hand, these changes were not noticed in CA's group. The CM's rams showed higher gonado-somatic index in week 47 ($P = 0.016$) and a tendency to have higher index in week 52 ($P = 0.08$) in comparison to CA's rams. Furthermore, the time affected the corporal weight, the scrotal circumference, the gonado-somatic index, the seric testosterone concentrations, the mass motility, the individual motility, the progressive motility as well as the percentage of spermatozoa with intact acrosome ($P < 0.05$). The spermatozoa concentration and the total of spermatozoa in ejaculation tended to change alongside time ($P < 0.09$) whereas there was no time effect on the percentage of spermatozoa with normal morphology nor on the percentage of spermatozoa with intact membrane. It should also be pointed out that during the breeding season there was no effect on the group regarding any of the variables. There was clear interaction between treatment and time concerning corporal weight, while the corporal weight increased from week 69 to week 72 ($P = 0.001$) and from week 85 to week 88 ($P = 0.004$) in CM's group, there were no changes observed in CA's group. On the other hand, while corporal weight decreased from week 72 to week 74 ($P = 0.004$) and increased from week 74 to week 76 ($P = 0.0001$) in CA's group, in CM's group no changes were observed. The time affected the corporal weight, the scrotal

circumference, the gonado-somatic index and the seric testosterone concentrations ($P < 0.0001$). The CA's rams showed a tendency to have higher percentage of spermatozoa with normal morphology than CM's rams ($61.9 \pm 2.7\%$ vs. $54.3 \pm 2.7\%$, respectively, $P = 0.067$). With exception in the percentage of spermatozoa with intact acrosome, all the seminal parameters changed alongside time ($P < 0.006$). In conclusion, the presence and bond between the lambs and their mother during lactation period, did not affect the scrotal circumference, the seric testosterone concentrations nor the seminal parameters in adult life.

3. Introducción

Existen factores sociales durante la cría de los corderos que afectan el desempeño reproductivo de los mismos durante la vida adulta. Dentro de los factores sociales, la presencia y el vínculo entre la madre y la cría son fundamentales para el desarrollo posterior de la cría. En ovinos los corderos desarrollan una relación fuerte y selectiva con sus madres a las pocas horas de haber nacido siendo la misma un modelo comportamental muy importante para el recién nacido (Poindron y Le Neindre, 1980). La madre provee comida, calor, refugio y protección de los depredadores, por lo que influye en la supervivencia del cordero hasta el destete. La madre también influye en el desarrollo fisiológico, sensorial y emocional de los recién nacidos (Lévy y Keller, 2008), así como en el desarrollo de las preferencias sociales y sexuales (Kendrick et al., 1998).

El vínculo con la madre puede afectar el desarrollo sexual. En roedores, aquellos machos criados por madres con mejor comportamiento maternal desarrollan mejor comportamiento sexual (Moore, 1984; 1992; Birke y Sadler, 1987). De manera contraria, la separación temporaria entre la cría de rata macho y su madre en las primeras etapas del desarrollo posnatal tiene un impacto negativo sobre el comportamiento sexual de los machos en la etapa adulta (Rhees et al., 2001).

En los rumiantes, el ambiente social en que se desarrollan los corderos influye sobre su desarrollo y desempeño reproductivo en la edad adulta (Illius, 1976a; Kendrick et al., 1998; Ungerfeld y González Pensado, 2008; Ungerfeld y Lacuesta, 2010). Sin embargo, a pesar de que tendría un impacto potencial directo en los sistemas de cría, no se conocen trabajos que hayan determinado la influencia del vínculo entre madre-cría sobre el desempeño reproductivo de los carneros adultos.

4. Revisión bibliográfica

4.1 Vínculo madre – cría

En rumiantes, las hembras paren una cría con un desarrollo completo de su sensibilidad y de sus capacidades motoras (ver revisión: Nowak et al., 2011). El mantenimiento del vínculo madre-cría se caracteriza por el contacto directo entre ambos y la habilidad del cordero de seguir a su madre tempranamente luego del parto (ver revisión: Nowak et al., 2011). Cualquiera sea la especie mamífera, las madres interactúan con su cría de manera tal de asegurar el crecimiento y supervivencia de su cría en un período en el que sería imposible sobrevivir sin leche materna (ver revisión: Nowak et al., 2011).

La oveja presenta variadas características biológicas que favorecen el desarrollo del vínculo madre-cría. Por un lado, es una especie gregaria y sus partos se encuentran sincronizados de acuerdo a la estacionalidad reproductiva. Por otro lado, pare crías precoces (capaces de realizar en forma independiente las principales funciones del adulto, poco tiempo después del nacimiento), lo que permite un mutuo reconocimiento oveja-cordero que se establece rápidamente luego del parto y se mantiene por un largo período (ver revisión: Nowak et al., 2011).

La oveja y su cordero se reconocen rápidamente luego del parto (Nowak et al., 1989; Keller et al., 2003) reconocimiento basado en estímulos olfatorios (Alexander, 1978; Alexander y Stevens, 1981; Vince y Ward, 1984), auditivos (Lindsay y Fletcher, 1968; Alexander, 1977; Searby y Jouventin, 2003) y visuales (Alexander, 1977; Alexander y Shillito 1977; Shillito Walser, 1978; Nowak, 1991). Este reconocimiento se observa claramente hasta al menos las 26 semanas posparto (Hinch et al., 1987).

Las ovejas se mantienen muy próximas a sus corderos luego del parto impulsadas por un gran instinto maternal. A su vez, el cordero también juega un importante rol en mantener la proximidad con su madre (Hinch et al., 1987). Dicho vínculo se observa cuando las ovejas brindan cuidados a sus crías y rechazan, a veces agresivamente a corderos ajenos (Poindron et al., 2007). Consecuentemente, los corderos raramente intentan mamar de ovejas que no son sus madres. Cuando los corderos son separados de sus madres, ambos manifiestan reacciones de estrés (Moberg et al., 1980; Moberg y Wood, 1981; Poindron et al., 1994; Keller et al., 2003).

Los corderos comienzan a amamantarse alrededor de 1 a 2 h luego del parto. Estos episodios le brindan al neonato la información sensorial requerida para establecer un fuerte vínculo con su madre. Los corderos pueden discriminar a su madre de otras ovejas recién paridas alrededor de 24 h luego del parto (Nowak et al., 1989). Esta habilidad se va incrementando durante los primeros 3 días: durante las primeras 24 h de vida, el cordero se mantiene a una distancia menor

de su madre debido a su incapacidad locomotora, pero a los 3 días, los mismos son capaces de identificar a su madre en áreas de mayor extensión (Nowak et al., 1989; Nowak, 1990). A medida que las interacciones entre el cordero y su madre continúan, el cordero aprende variadas posturas y comportamientos de su madre que le permiten reconocerla desde distancias de varios metros (ver revisión: Nowak et al., 2011). El desarrollo del vínculo entre la cría y su madre es dependiente del éxito obtenido en los primeros episodios de amamantamiento. Cuanto más demoran en lograr su primer amamantamiento, más demoran en discriminar a su madre de otras ovejas (ver revisión: Nowak et al., 2011). Goursaud y Nowak (1999) determinaron que los corderos alimentados con calostro de sus madres mediante una sonda nasogástrica luego tienen preferencia por ella. Esto demuestra que el vínculo se establece tanto por señales pertinentes al acto de mamar, como a señales originadas desde el sistema gastrointestinal. Esta preferencia por la madre establecida en el período neonatal es difícilmente afectada una vez que se ha formado (Nowak et al., 1997). Todo esto sugiere que existen importantes estímulos durante el amamantamiento que son percibidos por el cordero e influyen sobre el desarrollo de dicho vínculo (ver revisión: Nowak et al., 2011).

Las estimulaciones asociadas al amamantamiento desencadenan procesos neuroquímicos en el cerebro, principalmente a nivel del hipotálamo y regiones límbicas. Ellas juegan un importante rol integrando respuestas hormonales y neuronales relacionadas al comportamiento relacionado con la alimentación y al control de la digestión (Val-Laillet et al., 2004). El péptido gastrointestinal colecistokinina (CCK) cumple un rol importante en el desarrollo del vínculo madre-cría. Nowak et al. (1997) observó que los niveles plasmáticos de CCK son bajos al momento del parto, aumentan luego del amamantamiento, y solo los corderos que tienen un aumento en los niveles de CCK seleccionan e identifican rápidamente a su madre. La CCK actúa sobre receptores periféricos (Zavros y Shulkes, 1997; Zavros et al., 1998) y activa fibras sensitivas del nervio vago (Guevara-Guzman et al., 2005) que se proyectan en el cerebro. Lo mismo sucede con la activación de los mecano receptores luego de la distensión gástrica (Guevara-Guzman et al., 2005). También se ha demostrado que la ingesta de leche genera la liberación de oxitocina. El establecimiento del vínculo madre-cría se retarda al administrar antagonistas de la oxitocina a los corderos luego del parto (resultados no publicados de M. Keller citado en Nowak et al., 2011).

El interés de la madre hacia su cría es fuerte inicialmente, luego va decreciendo pero el cordero asume un mayor rol en mantener el vínculo (Lawrence, 1991). A su vez, a medida que el cordero va creciendo, disminuye el tiempo que le dedica al amamantamiento, disponiendo mayor tiempo a pastar (ver revisión: Nowak et al., 2011).

Luego del destete, cuando el cordero es separado de su madre y aunque éste ya no reciba los cuidados brindados por la misma, el cordero continúa reconociéndola por un largo período posdestete (Hinch et al., 1987; 1990). La asociación entre el

cordero y su madre puede persistir hasta el nacimiento de otro cordero al año siguiente (Hinch et al., 1990).

4.1.1 *Destete: interrupción del vínculo madre-cría*

El destete consiste en la separación de la cría de su madre interrumpiendo el vínculo (Mogi et al., 2011). Separar al cordero de su madre antes de que ocurra el destete natural, es un estresor, no solo por la ruptura del vínculo, sino también por el cambio provocado en los hábitos alimenticios (dejar de ingerir sólo leche y pasar a una dieta a base de sólidos y agua) (Damián et al., 2013). Las reacciones de estrés incluyen un aumento en la frecuencia de locomoción y de las vocalizaciones, tanto del cordero como de su madre (Alexander, 1977; Damián et al., 2013).

En condiciones naturales, el destete ocurre en forma progresiva de forma que el cordero se va adaptando a los nuevos hábitos alimenticios (Orgeur et al., 1998; Orihuela et al., 2004; Weary et al., 2008). En la mayoría de los establecimientos ovejeros, los corderos son separados física y socialmente de sus madres antes de la edad de destete natural, la que ocurre entre los 4 y 6 meses de edad (Arnold et al., 1979).

Las repercusiones del vínculo madre-cría sobre el desarrollo de la cría han sido estudiadas en roedores. El lamido de la región ano-genital por parte de la madre hacia sus crías ha sido relacionado con un mejor comportamiento maternal y se ha observado que el mismo repercute sobre el desarrollo de la cría: Birke y Sadler (1987) observaron que aquellas crías que no fueron lamidas por la madre en la región ano-genital tuvieron mayores intervalos entre montas cuando llegaron a la etapa adulta que aquellos que sí lo fueron. Lau et al. (1996) observaron que la separación temporal de la madre durante la lactancia de las ratas determinó que los testículos fueran 8% más livianos, pero no afectó la función testicular (la producción diaria espermática) en la etapa adulta.

4.1.2 *Factores sociales que influyen en el desarrollo del cordero*

Ungerfeld y González-Pensado (2008) observaron que corderos de alto rango social maduran sexualmente antes que corderos de bajo rango. Los animales de mayor rango social aumentaron su peso corporal y su circunferencia escrotal antes que los animales de bajo rango. La producción de semen y el comportamiento sexual entre macho y hembra también se manifestó antes en los corderos de alto rango que en los de bajo rango. A su vez, se ha determinado que ese desarrollo diferencial previo a la pubertad tiene consecuencias, aunque menores, en la actividad sexual que despliegan los carneros de adultos (Ungerfeld y Lacuesta, 2010).

El contacto heterosexual con la madre y con corderas de edad similar es necesario para el desarrollo del comportamiento sexual del macho (Zenchak et al.,

1981; Casteilla et al., 1987). Por ejemplo, machos criados sin contacto con hembras son más propensos a desarrollar comportamiento homosexual, lo que puede perjudicar el comportamiento frente a hembras en celo o durante la colección de semen con vagina artificial (Casteilla et al., 1987). En el mismo sentido, se observó que la exposición temprana de corderos prepúberes a ovejas en celo es un estímulo positivo para el desarrollo del comportamiento sexual (Price et al., 1991; 1996; Stellflug y Lewis, 2007). El contacto con hembras durante la crianza adelanta la producción de semen en corderos púberes (Casteilla et al., 1987), y en la etapa adulta genera un mayor tamaño testicular, mayor concentración sérica de testosterona (Illius et al., 1976b) y mejora la capacidad de servicio (Zenchak y Anderson, 1980; Price et al., 1991; 1994; Stellflug y Lewis, 2007).

4.1.3 Influencia de la presencia de la madre durante la lactancia sobre el desarrollo del cordero

La presencia de la madre durante la lactancia del cordero influye sobre su desarrollo reproductivo. Kendrick et al. (1998) criaron corderos con cabras permitiendo el contacto social con ovejas en todo momento. En la etapa adulta los carneros prefirieron socializar y montar a cabras que a ovejas. Esta tendencia se mantuvo, inclusive después de haber convivido 3 años con animales de su misma especie, lo que demuestra que el comportamiento sexual en los ovinos está vinculado con el ambiente y la experiencia social (más concretamente, el vínculo madre-cría) que tuvieron los animales durante el período prepuberal.

Por otro lado, Al-Nakib et al. (1986) estudiaron si el método de crianza (ya sea criado por la madre o criado artificialmente) influye en el desarrollo reproductivo de corderos. Los animales criados por sus madres presentaron mayor peso corporal, tamaño testicular y concentración sérica de testosterona y por otro, mejores parámetros seminales (concentración de esp a los 6, 7 y 8 meses de edad, y motilidad en masa a los 6 meses de edad) que los criados artificialmente. Sin embargo, las diferencias registradas también pudieron ser debidas al diferente aporte alimenticio debido a que no se ajustó la alimentación recibida por el grupo criado artificialmente con respecto al recibido por los corderos criados por sus madres. Como consecuencia, hubo diferencias en la ganancia de peso corporal, retrasando tanto el desarrollo corporal como reproductivo del grupo criado artificialmente.

Damián et al. (2015) compararon el desarrollo reproductivo de estos mismos corderos hasta la etapa puberal. Los corderos CM tendieron a alcanzar antes la pubertad, tuvieron un desarrollo sexual más precoz (evidenciado por mayores valores en el índice gónado-somático y los parámetros seminales) y un mayor despliegue en el comportamiento sexual anterior que los corderos CA. El adelanto del desarrollo sexual no se reflejó en una estación reproductiva más larga que la de los criados artificialmente. Estos efectos fueron evaluados hasta la primera estación reproductiva, pero no se conoce si los mismos se mantienen en el tiempo

durante la etapa adulta de los carneros. Debido a que los parámetros reproductivos se ven fuertemente influenciados por la estación reproductiva (Pérez-Clariget et al., 1998; Ungerfeld, 2012) en la presente tesis fueron evaluados tanto en la estación no reproductiva como en la estación reproductiva.

4.2 Fisiología de la reproducción del carnero

La reproducción del macho, se encuentra regulada por variados factores genéticos y ambientales, siendo la base de la regulación hormonal el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. El hipotálamo secreta en forma pulsátil hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la que alcanza altas concentraciones a nivel de adenohipófisis, en donde estimula a las células gonadotropas a secretar dos hormonas hipofisarias hacia la circulación: hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH). Dichas hormonas, en su conjunto regulan la producción de gametos y hormonas testiculares (Hafez y Hafez, 2002).

La LH es importante para el desarrollo y funcionamiento de las células intersticiales o de Leydig, células que mediante la estimulación por parte de la LH, producen andrógenos (principalmente testosterona) (Hafez y Hafez, 2002; Neill et al., 2006). La testosterona es necesaria para una adecuada espermatogénesis. La proteína ligadora de andrógenos (ABP) la concentra en el tejido testicular (Pineda, 1989), aunque también alcanza el torrente sanguíneo, donde participa en la actividad secretoria de las glándulas accesorias, en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y de la libido (Hafez y Hafez, 2002). La regulación de la secreción tanto de LH como de la testosterona depende de un sistema de retroalimentación negativa muy sensible entre ellas. Altas concentraciones de testosterona inhiben por un lado directamente la liberación de LH y por otro, la liberación de pulsos de GnRH, inhibiendo así indirectamente la liberación de LH (Hafez y Hafez, 2002).

La célula de Sertoli, encargada del soporte estructural y metabólico de las células durante la espermatogénesis, es una célula blanco para la FSH y la testosterona. La FSH provoca un efecto trófico y un aumento en la secreción de sustancias espermatogénicas sobre las células de Sertoli. La célula de Sertoli, produce la hormona inhibina, hormona con efecto supresor de la liberación de FSH (Pineda, 1989).

4.2.1 *Desarrollo reproductivo*

La maduración sexual se sucede por una modificación en los efectos que ejercen los esteroides gonadales y los factores no esteroideos sobre la secreción de la LH y de la FSH (Senger, 2003). La secreción de gonadotropinas FSH y LH y de su factor liberador hipotalámico, GnRH, comienza durante la vida fetal (Hafez y Hafez, 2002). Esta secreción se reduce ligeramente hacia el término de la vida fetal en ovinos. En las primeras etapas de la vida, el hipotálamo es extremadamente sensible a la retroalimentación negativa que ejercen la

testosterona y el estradiol, de manera que cantidades muy bajas de estas hormonas pueden inhibir la secreción de GnRH. En la pubertad del macho, las neuronas que secretan GnRH se vuelven menos sensibles a la retroalimentación negativa que ejercen la testosterona y el estradiol. Como respuesta a esto, el hipotálamo secreta mayores cantidades de GnRH, la que estimula la secreción de LH por parte de la hipófisis (Wood y Foster, 1998). Desde un punto de vista práctico, la pubertad en los carneros se define como la edad en la que un eyaculado contiene 50 millones de espermatozoides (esp) con un mínimo de 10% mótils (Wolf y Almquist, 1965).

La mayoría de los carneros alcanzan la pubertad entre los 5 y los 9 meses de edad, dependiendo entre otros factores, de la estación, del peso corporal y la raza (Dyrmondsson, 1981; Foster, 1981). También durante la pubertad ocurre el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios debido a la secreción de testosterona (Courot, 1978). El desarrollo sexual, tal como se indica por el crecimiento de los órganos reproductivos y por la capacidad de realizar la espermatogénesis en forma completa, parece estar más estrechamente relacionado con el crecimiento del cuerpo que por la edad cronológica (Dyrmondsson, 1973; Foster y Nagatani, 1999). La adquisición de un mínimo de peso corporal es determinante del inicio de la pubertad en reproductores estacionales como ovinos y caprinos. Los pequeños rumiantes alcanzan la pubertad cuando su tamaño corporal llega al 60 – 65% de su tamaño adulto (Foster y Ryan, 1981; Bizelis et al., 1990; Santiago-Moreno et al., 2000).

4.2.2 *Espermatogénesis*

El proceso por el que se producen los esp se denomina espermatogénesis, y comprende dos etapas fundamentales. La primera, la espermatocitogénesis, es la etapa en la que ocurren múltiples divisiones celulares por mitosis y meiosis de las espermatogonias (células germinativas primitivas) hasta la formación de las espermátides (células haploides). Durante la segunda instancia, la espermiogénesis, se produce una diferenciación celular de las espermátides hasta esp. Durante dicha diferenciación ocurre la formación del acrosoma, la condensación y el alargamiento del núcleo, la formación de un flagelo y la pérdida de la mayor parte del citoplasma. El resultado final son los esp maduros que se liberan a la luz del túbulo seminífero y cumplen la función de transmitir la información genética en un eventual suceso de fecundación (Barth y Oko, 1989; Hafez y Hafez, 2002; Junqueira y Carneiro, 2006). La espermatogénesis en el carnero tiene una duración de aproximadamente 7 semanas (Schoenian, 2006; Abecia Martínez y Forcada Miranda, 2010).

El proceso por el que las células germinales formadas son liberadas al interior de los túbulos seminíferos se denomina espermiación (Barth y Oko, 1989; Hafez y Hafez, 2002). Luego de ésta, los mismos pasan a través de la rete testis y posteriormente ingresan al epidídimo a través de los vasos eferentes. Los esp permanecen en el epidídimo aproximadamente 16 días en el carnero (Barth y Oko,

1989), produciéndose aquí la maduración de los mismos, proceso que es mantenido por los andrógenos testiculares. Los conductos eferentes, la cabeza y cuerpo del epidídimo son considerados áreas de maduración espermática, mientras que a la cola del epidídimo se le asigna la función de almacenamiento previo a la eyaculación. Durante la maduración espermática ocurren varios cambios funcionales, incluyendo el desarrollo potencial para la motilidad sostenida, la pérdida de agua y la migración distal o pérdida de la gota citoplasmática (Hafez y Hafez, 2002).

4.3 Semen

El semen es un líquido orgánico formado por los esp y las secreciones de los órganos accesorios al aparato reproductor. La porción líquida del semen se conoce como plasma seminal (Salisbury et al., 1978; Hafez y Hafez, 2002). Los esp maduros son células alargadas compuestas por una cabeza aplanada portadora del núcleo, un acrosoma que rodea la porción anterior de la cabeza y una cola encargada de la motilidad celular (Fig. 1) (Hafez y Hafez, 2002).

Casi toda la cabeza, se encuentra ocupada por un núcleo aplanado, de forma oval, que contiene cromatina muy compacta. Su contenido de ADN nuclear es haploide (Fig. 1) (Hafez y Hafez, 2002). El extremo anterior del núcleo espermático está cubierto por el acrosoma, un delgado saco membranoso de doble capa ubicado sobre el núcleo. El mismo se forma durante las últimas etapas de formación del esp. Esta estructura en forma de casquete contiene acrosina, hialuronidasa y otras enzimas hidrolíticas con importante participación en el proceso de la fecundación (Fig. 1) (Hafez y Hafez, 2002). La cola semejante a un flagelo, es el organelo encargado de la locomoción de los esp. El movimiento de la cola es el responsable de la propulsión de los esp en los líquidos. Se encuentra conectada a la cabeza mediante un cuello corto, conocido como la región de implantación. La cola está diferenciada en tres regiones: segmento medio, segmento principal y segmento caudal. Existe un núcleo axial común formado por una serie de elementos contráctiles, las fibrillas. La contracción y relajación de estas fibrillas es la responsable del movimiento (Evans y Maxwell, 1990). La pieza terminal es muy corta, y con ella finalizan los microtúbulos del axonema (Fig. 1) (Eddy y O'Brien, 1994).

El testículo casi no contribuye en la formación del plasma seminal. Se trata de una mezcla de líquidos secretados por las glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales, próstata, glándulas bulbouretrales y la ampolla del deferente), los epidídimos y los conductos deferentes. El plasma seminal posee tres funciones principales: actúa como vehículo para los esp; activa los esp previamente no móviles y proporciona un medio tamponado, rico en nutrientes que colabora en mantener la supervivencia de los esp en el aparato genital de la hembra (Evans y Maxwell, 1990).

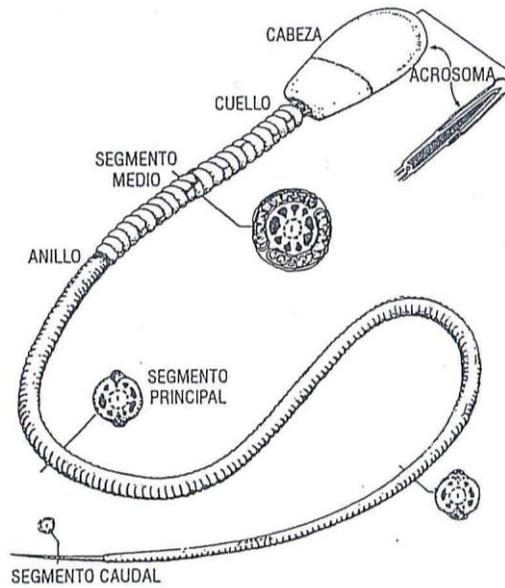


Figura 1. Espermatozoide y sus regiones (Hafez y Hafez, 2002).

4.3.1 Colección seminal

Existen varios métodos para la colección seminal, entre ellos: el de la vagina artificial, la electroeyaculación y el masaje rectal.

En los ovinos, como en la mayoría de las especies domésticas, el método de elección para la colección de semen es la vagina artificial. Este método es preferido dada su rapidez y limpieza, genera menos estrés en el macho que otros métodos y proporciona un semen de mejor calidad (Evans y Maxwell, 1990). Los machos seleccionados para la colección de semen mediante el uso de una vagina artificial deben ser dóciles y estar entrenados. El entrenamiento puede realizarse desde los 6 a 10 meses y requiere además de una hembra en celo, pautas de adaptación a la sala de recogida, a la hembra y al operario que utiliza la vagina artificial (Abecia Martínez y Forcada Miranda, 2010).

La electroeyaculación está basada en la aplicación rítmica de un estímulo eléctrico por vía transrectal estimulando el sistema nervioso autónomo y somático (nervios pélvicos), que conduce a la secreción de las glándulas accesorias y finalmente a la eyaculación (Abecia Martínez y Forcada Miranda, 2010). Este método permite la colección del material seminal en animales prepúberes o con imposibilidad de realizar una extracción mediante vagina artificial.

Otra técnica descrita es la del masaje rectal que se realiza mediante la presión de las ampollas y las vesículas seminales (Palmer et al., 2004). Esta técnica posee la ventaja de ser una técnica relativamente sencilla, que no requiere mayor

infraestructura y es una alternativa para obtener semen de rumiantes salvajes más sensibles al estrés provocado por otras técnicas (Ungerfeld et al., 2015). Por otro lado, el semen colectado mediante esta técnica es de menor calidad, observándose menor porcentaje de espermátocitos tanto móviles como vivos en comparación con las técnicas descritas anteriormente (Palmer et al., 2005; Ungerfeld et al., 2015).

4.4 Estacionalidad y estrategia reproductiva

En nuestras latitudes, la producción ovina está basada en sistemas extensivos donde los animales se alimentan de pasturas naturales (Ungerfeld, 2012). Las mismas dependen de los cambios de luz, temperatura y humedad para su crecimiento, generando en los herbívoros una marcada adaptación a dicha dinámica. Por esto, existen especies que se reproducen exclusivamente en determinados momentos del año. Dichas especies son llamadas reproductoras estacionales (Bronson, 1989). En el caso de los ovinos, la estación reproductiva se manifiesta generalmente cuando el fotoperiodo pasa de creciente a decreciente, lo que en la naturaleza correspondería al inicio del verano, continuándose con el otoño y es por ello que los ovinos son reproductores estacionales de día corto (Malpaux et al., 1988).

A diferencia de las ovejas que fuera de la estación reproductiva permanecen en anestro, los carneros permanecen fértiles a lo largo del año y no pasan por un período quiescente. Los carneros, exhiben un patrón reproductivo variable, teniendo un período de mayor actividad sexual (tanto a nivel fisiológico como comportamental), desde el final del verano, que se continúa en el otoño (ver revisión: Glover et al., 1990). Dicho período está determinado por cambios neuroendócrinos y principalmente por el tiempo que requiere la espermatogénesis, que es de aproximadamente 49 días (Clermont, 1972 citado por Kerr et al., 2006), ya que el macho debe estar disponible para copular a la primera de las hembras que comience a ciclar y también pueda hacerlo con la última que deje de hacerlo (Bronson, 1989). La duración de la estación reproductiva está fuertemente influenciada entre otros, por la raza y la latitud en la que los carneros se encuentran. En estudios realizados en nuestro país en carneros de distintas razas se observó que pese a existir ciertas diferencias en el período estacional para cada una de ellas, existe a nivel general, un período de mayor actividad (tanto comportamental como fisiológica) que se extiende aproximadamente desde fines de diciembre a junio (Gastel et al., 1995; Pérez-Clariget, 1998; Ungerfeld, 2012).

La interpretación de los cambios del fotoperiodo se realiza a través de un complejo circuito neuroendócrino. La glándula pineal secreta la hormona melatonina, que es el mediador entre la señal lumínica, el sistema nervioso central y el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (ver revisiones: Goldman, 2001; Malpaux, 2006). Esta hormona es secretada con un ritmo circadiano, con mayores concentraciones de melatonina durante las horas de oscuridad, y menores durante las horas de luz. A

diferencia de otros mamíferos, en ovinos la acción de la melatonina sobre la pars tuberalis no genera cambios en el eje neuroendócrino reproductivo (Malpaux et al., 1995; 1997), pero sí genera aumentos en la secreción de LH por parte de la hipófisis al actuar sobre el área premamilar hipotalámica, lo que es clave en el comienzo de la estación reproductiva (Malpaux et al., 1998; Lincoln, 2002a; 2002b). En los machos, el aumento de la frecuencia de pulsos de LH estimula la síntesis y secreción de testosterona por parte de las células de Leydig (O'Donnell et al., 2006). El aumento de testosterona sérica estimula cambios morfológicos y comportamentales que caracterizan a la estación reproductiva (Lincoln y Short, 1980): hiperemia inguinal, crecimiento del vellón, aumento de frecuencia de los comportamientos sexuales y agresivos (Lincoln y Davidson, 1977), aumento del tamaño testicular (Lincoln et al., 1981), del diámetro de los túbulos seminíferos y en la altura del epitelio germinal (Lincoln y Short, 1980).

5. Hipótesis

Los carneros criados con sus madres presentan mayor concentración sérica de testosterona, circunferencia escrotal, y mejor calidad seminal durante la etapa adulta que aquellos criados artificialmente.

6. Objetivo

Comparar la circunferencia escrotal, la concentración sérica de testosterona y los parámetros seminales de carneros criados artificialmente y carneros criados por sus madres.

7. Materiales y Métodos

7.1 Animales y su manejo

Los trabajos prácticos se realizaron en la Unidad de Ovinos del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), La Estanzuela, Colonia (34° 28' S / 57° 51' O), Uruguay. El presente protocolo fue aprobado por la CHEA (PI N° 25/10).

Previamente al desarrollo de esta tesis se criaron 27 corderos de la raza Ideal, los que se adjudicaron a 2 grupos bloqueados por fecha de nacimiento y peso corporal: corderos criados artificialmente desde las 24-36 h de edad (CA, n=14), los que fueron criados en base a leche de oveja, y corderos criados por sus madres (CM, n=13). El peso corporal de los animales de ambos grupos se registró 2 veces por semana, y de acuerdo a ello, se ajustó la cantidad de alimento recibido por los corderos CA para lograr que la ganancia de peso corporal de ambos grupos fuera similar. Durante la primera semana, se suministró leche de oveja 6 veces por día a los corderos CA, en la segunda semana durante 4 a 5 veces por día, y luego hasta que cumplieron los 2.5 meses se alimentaron 3 veces por día. Los dos grupos se manejaron en potreros diferentes y el grupo CA fue acompañado por 4 ovejas de la misma raza con corderos amamantándose para minimizar las diferencias sociales que podría tener la ausencia de ovejas adultas en este grupo en comparación con el grupo CM.

Cuando los corderos llegaron a los 2.5 meses de vida se realizó el desleche del grupo CA junto con la separación de las 4 ovejas con corderos al pie que los acompañaban, y el destete del grupo CM, evitando así, todo contacto visual o acústico de las madres con los corderos en experimentación. A partir de los 2.5 meses se ofreció ración y fardos a todos los animales, los que fueron mantenidos a campo, en diferentes potreros de 25 x 50 m cada uno, con agua *ad libitum* y acceso a sombra artificial.

A partir de las 9 semanas de vida se comenzó a colectar semen cada 15 – 20 días mediante electroeyaculación. El presente trabajo comenzó a partir de la semana 42 de vida de los corderos y concluyó en la semana 90. En la semana 45 los

animales de ambos grupos fueron esquilados. Se consideró la estación no reproductiva desde julio de 2012 (semana 42) hasta diciembre de 2012 (semana 64), y la estación reproductiva desde enero de 2013 (semana 66) hasta junio de 2013 (semana 90), basado en lo propuesto para otras razas de patrón similar en nuestro país (Gastel et al., 1995; Pérez Clariget et al., 1998; Ungerfeld, 2012). En todo este período se mantuvo a los animales en las mismas condiciones descritas anteriormente.

7.2 Peso corporal, circunferencia escrotal e índice gónado-somático

El peso corporal y la circunferencia escrotal, fueron medidos cada 15 -20 días. El peso corporal se determinó utilizando una balanza calibrada. La circunferencia escrotal se determinó mediante la técnica descrita por McGowan et al. (1995), en donde se midió la mayor circunferencia escrotal, manteniendo a los testículos firmemente uno al lado del otro en el fondo del escroto. Se calculó el índice gónado-somático realizando un cociente entre la circunferencia escrotal y el peso corporal del animal.

7.3 Determinación de la concentración sérica de testosterona

Cada 7-15 días se colectaron muestras sanguíneas por venopunción yugular. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas (2500 rpm por 15 min) para separar el suero, el que fue conservado a -20°C hasta su evaluación. Se midieron las concentraciones séricas de testosterona mediante radioinmunoanálisis (RIA) utilizando un kit comercial de fase sólida (TKPG, Count-A-Count, Siemens, Los Angeles, CA, EEUU), cuyo límite de detección fue de 0.17 nmol/L. Los coeficientes de variación tanto dentro como entre ensayos estuvieron por debajo del 8%. Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria.

7.4 Evaluación seminal

La colecta de muestras de semen se realizó cada 15-20 días. Las muestras se obtuvieron mediante el uso de un electroeyaculador (Fuhijira Industry, Tokyo, Japón) equipado con un vástago de 30 x 1.5 cm con 4 electrodos circulares de 1 cm de ancho. Para realizar la colección seminal se colocó al animal en decúbito dorsolateral en una camilla, y se aplicaron estímulos de 3-4 V durante 2-3 s realizando descansos de 2-3 s aproximadamente entre un estímulo y otro. El voltaje se incrementó progresivamente hasta los 10 V. El semen colectado fue colocado en un baño térmico a 37°C y se extrajeron muestras para medir parámetros de forma mediata e inmediata. La alícuota de las muestras fue fijada en formol-citrato para su posterior evaluación en microscopio óptico con contraste de fase (Nikon, Japón, Modelo Eclipse, E200), en el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción de la Facultad de Veterinaria.

Los parámetros medidos de forma inmediata fueron:

- Motilidad en masa (MM), porcentaje de esp con motilidad individual (MI) y porcentaje de esp con motilidad individual progresiva (MIP), de acuerdo a Evans y Maxwell (1990).
- Volumen: se registró el volumen seminal utilizando una pipeta calibrada.

Los parámetros medidos posteriormente fueron:

- Concentración de esp (esp/mL): Se determinó mediante el uso de la cámara de Neubauer (40x), de acuerdo a Evans y Maxwell (1990).
- Porcentaje de esp morfológicamente normales: se contabilizó según la técnica desarrollada por Barth y Oko (1989).
- Porcentaje de esp con integridad de acrosoma: se evaluó mediante la técnica descrita por Pursel y Johnson (1974).
- Porcentaje de esp con membrana intacta: se utilizó el test de hinchazón hipoosmótico (HOS_t) desarrollada por Jeyendran et al. (1984).

A partir de los parámetros medidos se calculó la cantidad de esp por eyaculado multiplicando la concentración de esp por el volumen del eyaculado.

En todos los casos se contabilizaron 100 esp de cada muestra.

7.5 Análisis estadístico

Los datos de cada período se analizaron en forma independiente. El peso corporal, la circunferencia escrotal, el índice gónado-somático, la concentración sérica de testosterona y los parámetros seminales fueron comparados entre grupos mediante ANOVA para mediciones repetidas. El modelo estadístico consideró como efectos principales el tratamiento (CA o CM), el tiempo (edad en semanas) y la interacción entre tratamiento y tiempo. Los resultados son expresados como la media \pm el error estándar de la media (EEM).

8. Resultados

Los efectos principales del tratamiento, tiempo y la interacción entre ambos, se presentan en la Tabla 1.

8.1 Estación no reproductiva

8.1.1 *Peso corporal, circunferencia escrotal e índice gónado-somático*

El tratamiento no afectó el peso corporal, la circunferencia escrotal ni el índice gónado-somático (Tabla 1). Hubo efecto del tiempo en estas tres variables ($P < 0.0001$) (Tabla 1). El peso corporal y la circunferencia escrotal se incrementaron con la edad (Fig. 2A y 2B respectivamente), mientras que el índice gónado-somático osciló a través del tiempo (Fig. 2C). Hubo interacción entre el tratamiento y el tiempo en el peso corporal ($P = 0.02$) y el índice gónado-somático ($P = 0.05$) (Tabla 1). El peso corporal disminuyó de la semana 50 a la semana 52 ($P = 0.043$) y de la semana 62 a la 64 ($P = 0.002$) en el grupo CM, mientras que no cambió en el CA. Los carneros CM tuvieron un mayor índice gónado-somático en la semana 47 ($P = 0.016$) y una tendencia a tener mayor índice en la semana 52 ($P = 0.08$) que los carneros CA.

8.1.2 *Concentración sérica de testosterona*

No hubo efecto del tratamiento ni tampoco interacción entre el tratamiento y el tiempo sobre la concentración de testosterona. El tiempo afectó las concentraciones séricas de testosterona ($P = 0.006$) (Tabla 1), donde se registró el mayor valor hacia la semana 54 (Fig. 2D).

8.1.3 *Parámetros seminales*

No hubo efecto de los tratamientos, ni interacción entre tratamiento y tiempo en ningún parámetro seminal (Tabla 1). La motilidad en masa ($P < 0.0001$), individual ($P < 0.0001$) y progresiva ($P = 0.0002$) variaron con el tiempo ($P < 0.0002$) (Tabla 1), donde las tres registraron sus mayores valores en la semana 58 (Fig. 3A, 3B y 3C, respectivamente). El porcentaje de esp con acrosoma íntegro cambió con el tiempo ($P = 0.04$) (Tabla 1), observándose el menor valor en la semana 50 (Fig. 5B). La concentración de esp y el total de esp en el eyaculado tendieron a cambiar con el tiempo ($P < 0.09$) (Tabla 1, Fig. 4A y 4B) y no hubo efecto del tiempo en el porcentaje de esp con morfología normal ni con membrana intacta (Tabla 1).

8.2 Estación reproductiva

8.2.1 *Peso corporal, circunferencia escrotal e índice gónado-somático*

El peso corporal, la circunferencia escrotal y el índice gónado-somático no fueron afectados por el tratamiento. Hubo interacción entre tratamiento y tiempo en el peso corporal (Tabla 1). Mientras que, por un lado, el peso corporal aumentó de la semana 69 a la 72 ($P = 0.001$) y de la semana 85 a la 88 ($P = 0.004$) en el grupo

CM, no cambió en el grupo CA. Por otro lado, mientras que el peso corporal disminuyó de la semana 72 a la 74 ($P = 0.004$) y aumentó de la semana 74 a la 76 ($P = 0.0001$) en el grupo CA, no cambió en el grupo CM (Fig. 2E). Las tres variables fueron afectadas por el tiempo ($P < 0.0001$) (Tabla 1). El peso corporal aumentó con el tiempo, registrando su mayor valor en la semana 90 (Fig. 2E). Por el contrario, la circunferencia escrotal y el índice gónado-somático disminuyeron con el tiempo, y en ambos casos, se registraron los menores valores en la semana 90 (Fig. 2F y 2G respectivamente).

8.2.2 *Concentración sérica de testosterona*

No hubo efecto de tratamiento, ni interacción entre el tratamiento y el tiempo sobre la concentración de testosterona (Tabla 1). El tiempo afectó las concentraciones séricas de testosterona ($P < 0.0001$) (Tabla 1), registrándose el mayor valor en la semana 78 (Fig. 2H).

8.2.3 *Parámetros seminales*

El tratamiento no afectó ningún parámetro seminal (Tabla 1). El grupo CA tendió a tener mayor porcentaje de esp con morfología normal que el grupo CM (61.9 ± 2.7 % vs 54.3 ± 2.7 %, respectivamente, $P = 0.07$; Fig. 5D). A excepción del porcentaje de esp con acrosoma íntegro, todos los parámetros seminales variaron con el tiempo ($P < 0.006$) (Tabla 1) (Fig. 3D-F; Fig. 4C-D; Fig. 5D-F). Los máximos valores para las variables de motilidad (Fig. 3D, 3E y 3F), concentración de esp (Fig. 4C) y total de esp en el eyaculado (Fig. 4D), fueron observados al final de la estación reproductiva, entre las semanas 80 y 90. El porcentaje de esp con membrana intacta registró su máximo valor en la semana 80 y su mínimo en la semana 88 (Fig. 5F).

Tabla 1. Efecto del tratamiento, tiempo e interacción tratamiento*tiempo (T*T) sobre los parámetros fisiológicos y seminales de carneros criados artificialmente y por sus madres durante la estación no reproductiva y la estación reproductiva

Parámetros	Estación no reproductiva			Estación reproductiva		
	Tratamiento	Tiempo	T*T	Tratamiento	Tiempo	T*T
Circunferencia escrotal	ns	<0.0001	ns	ns	<0.0001	ns
Índice gónado-somático	ns	<0.0001	0.05	ns	<0.0001	ns
Testosterona	ns	0.006	ns	ns	<0.0001	ns
Motilidad en masa	ns	<0.0001	ns	ns	<0.0001	ns
Esp con motilidad individual	ns	<0.0001	ns	ns	0.006	ns
Esp con motilidad progresiva	ns	0.0002	ns	ns	0.005	ns
Concentración de esp	ns	0.09	ns	ns	<0.0001	ns
Total de esp/eyaculado	ns	0.08	ns	ns	0.04	ns
Esp con morfología normal	ns	ns	ns	0.07	<0.0001	ns
Esp con acrosoma íntegro	ns	0.04	ns	ns	ns	ns
Esp con membrana intacta	ns	ns	ns	ns	<0.0001	ns

(ns: no significativo).

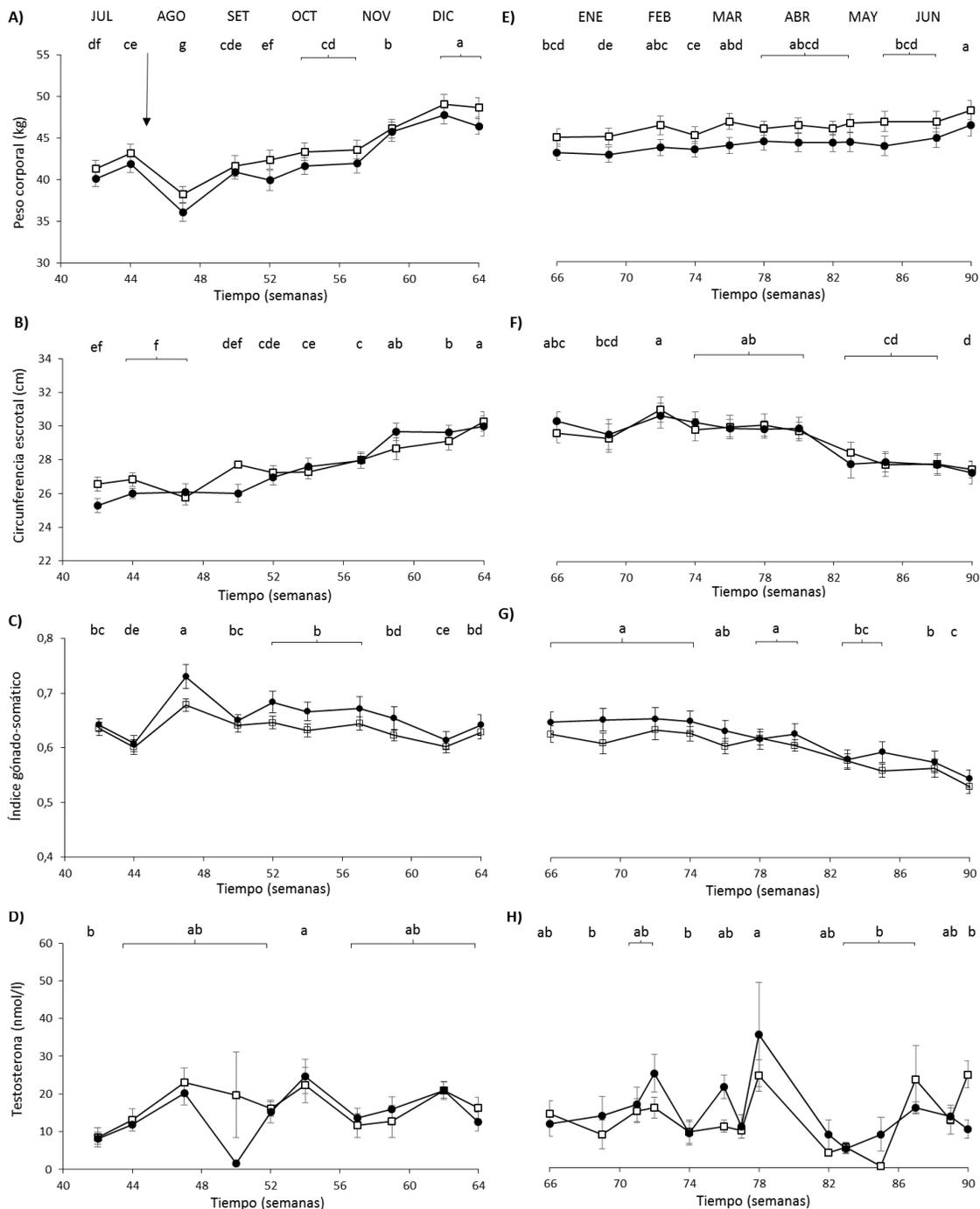


Figura 2. Peso corporal, circunferencia escrotal, índice gónado-somático y concentración sérica de testosterona en carneros criados artificialmente (CA: -□-) y criados con sus madres (CM: -●-), durante la estación no reproductiva (A, B, C y D respectivamente) y en la estación reproductiva (E, F, G y H respectivamente). La flecha indica la fecha en que los animales fueron esquilados. Diferentes letras entre semanas difieren $P < 0.05$.

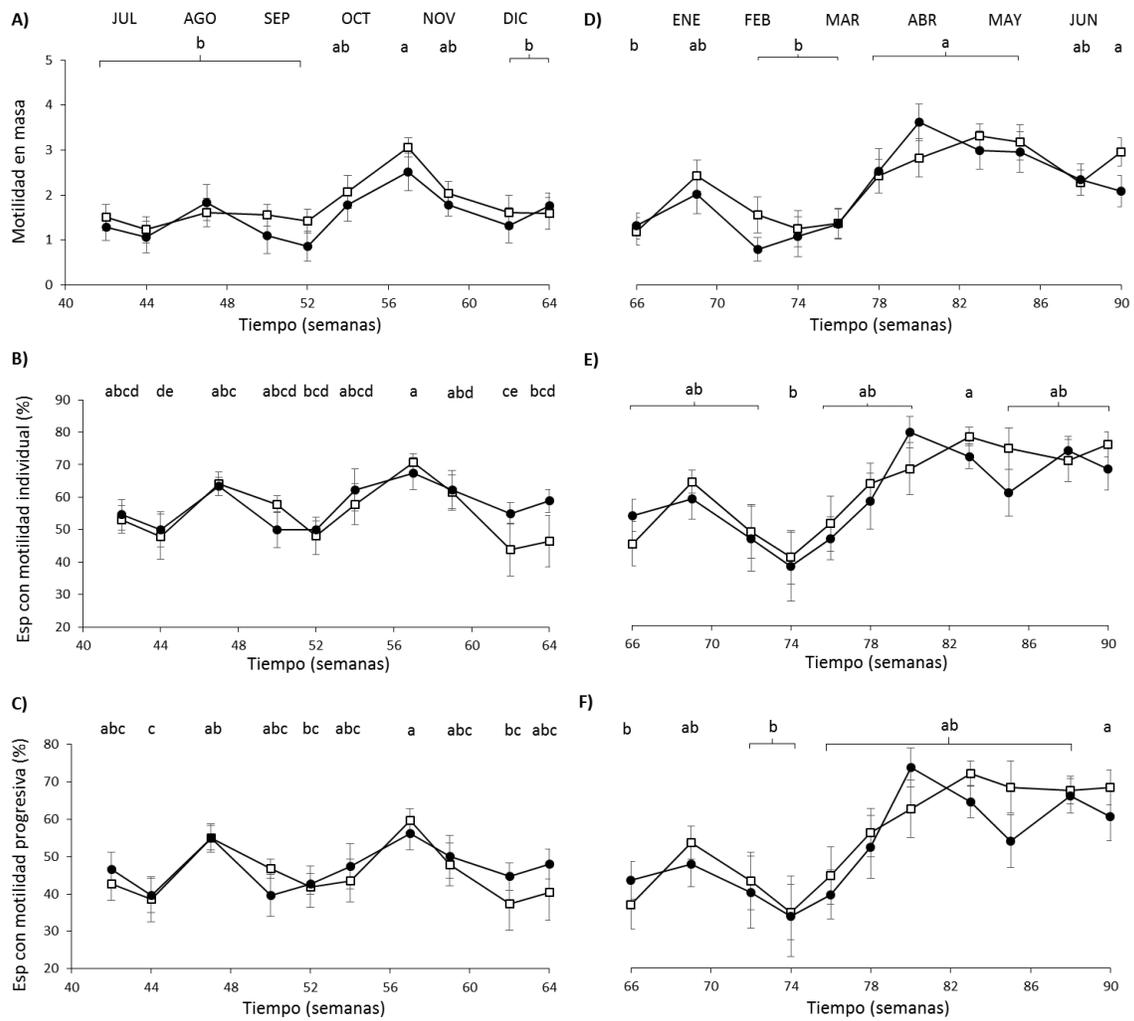


Figura 3. Motilidad en masa, porcentaje de esp con motilidad individual y con motilidad progresiva en carneros criados artificialmente (CA: -□-) y criados con sus madres (CM: -●-), durante la estación no reproductiva (A, B y C respectivamente) y en la estación reproductiva (D, E y F respectivamente). Diferentes letras entre semanas difieren $P < 0.05$.

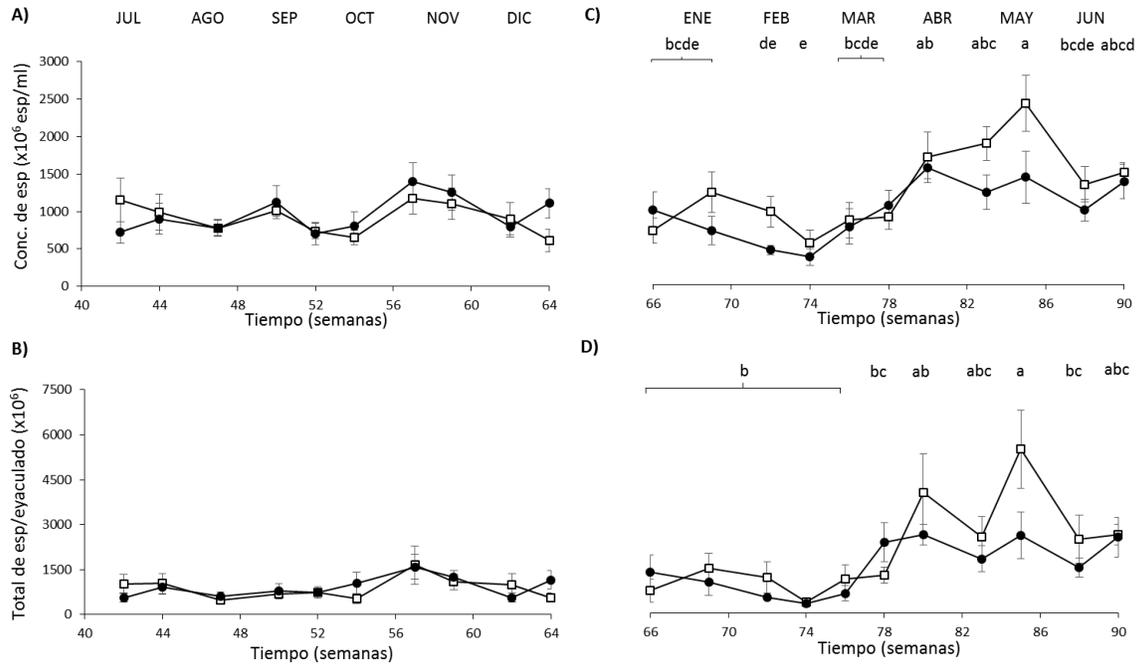


Figura 4. Concentración de esp y total de esp por eyaculado en carneros criados artificialmente (CA: -□-) y criados con sus madres (CM: -●-), durante la estación no reproductiva (A y B respectivamente) y en la estación reproductiva (C y D respectivamente).

Diferentes letras entre semanas difieren $P < 0.05$.

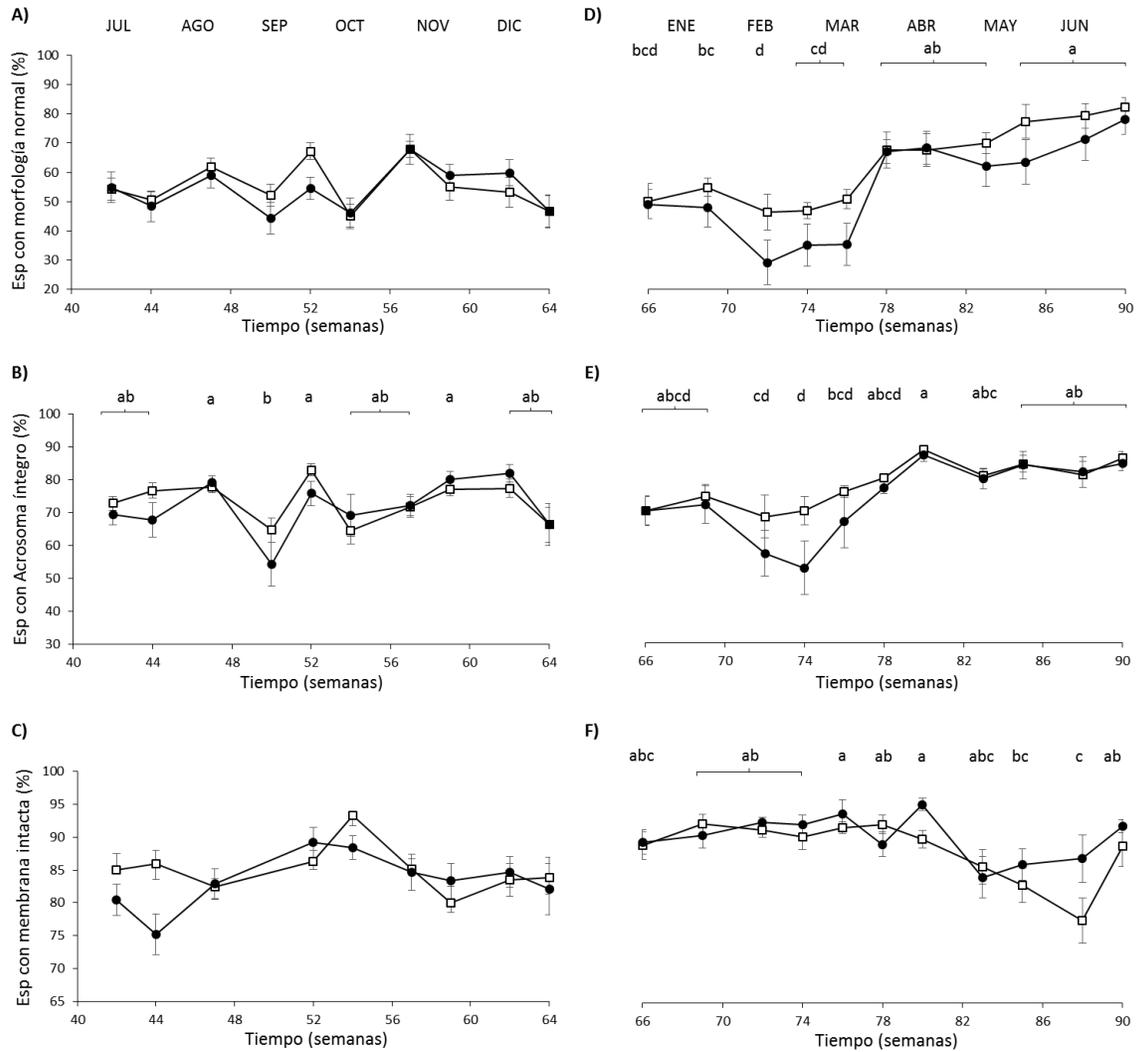


Figura 5. Porcentaje de esp con morfología normal, con acrosoma íntegro y con membrana intacta en carneros criados artificialmente (CA: -□-) y criados con sus madres (CM: -●-), durante la estación no reproductiva (A, B y C respectivamente) y en la estación reproductiva (D, E y F respectivamente). Diferentes letras entre semanas difieren $P < 0.05$.

9. Discusión

A diferencia de la hipótesis planteada, en esta tesis no se observaron efectos provocados por la crianza artificial durante la lactancia en los parámetros reproductivos (circunferencia escrotal, concentración sérica testosterona y parámetros seminales) de carneros adultos. En un estudio previo realizado por Damián et al. (2015) con estos mismos animales se observó que los corderos CM fueron más precoces que los CA. No obstante, estas diferencias en los parámetros reproductivos se observaron solo en la precocidad sin producir efectos de larga duración, ya que dichos autores no registraron diferencias luego de comenzada la pubertad, al igual que en el presente estudio en la etapa adulta. Probablemente esto se deba, al mayor período de tiempo transcurrido desde el final del tratamiento. En el estudio realizado por Damián et al. (2015) se observó que los corderos CM exhibieron mayores frecuencias en algunos comportamientos sexuales (acercamientos laterales, intentos de monta y montas) hacia ovejas en celo en comparación a los corderos CA. Otros estudios realizados en ovinos en los que se evaluó el desarrollo reproductivo reportaron que diferentes ambientes sociales durante la etapa de cría afectan principalmente el comportamiento sexual más que los parámetros fisiológicos reproductivos tanto en la etapa puberal (Zenchak y Anderson, 1980) como en la etapa adulta (Perkins et al., 1992; Ungerfeld y Lacuesta, 2010). Pese a no haber hallado diferencias en los parámetros fisiológicos, es probable que de haber evaluado el comportamiento sexual hubiéramos hallado diferencias en el mismo ya que el factor social impuesto en la etapa de cría (la ausencia de la madre), podría haber actuado como una condicionante comportamental.

En otros trabajos en que se estudió el vínculo entre el ambiente social de los corderos y la testosterona tampoco se encontró ninguna relación. Illius et al. (1976a) reportaron que el patrón de testosterona sérica en corderos machos hasta los 21 meses de edad es similar en corderos que fueron criados aislados, en grupos monosexuales o en grupos heterosexuales. Kridli y Al-Yacoub (2006) tampoco observaron diferencias entre carneros criados con o sin contacto con ovejas. De la misma manera, tampoco hubo diferencias en carneros que durante su crianza diferían en su comportamiento sexual frente a hembras en celo (Perkins y Fitzgerald, 1994; Ungerfeld y González-Pensado, 2008). En cuanto a los parámetros seminales, tampoco hubo diferencias en estudios en que se comparó carneros con diferente capacidad de respuesta sexual frente a hembras en celo (Hulet et al., 1964). En el mismo sentido, se observó que la privación materna de ratas durante el período predestete no tiene efectos en la producción seminal en la etapa adulta (Lau et al., 1996).

Nuestro estudio complementa información con respecto al trabajo realizado por Al-Nakib et al. (1986) quienes al igual que nosotros, compararon los parámetros reproductivos en corderos criados por sus madres (CM) y corderos criados artificialmente (CA). Dichos autores estudiaron a los corderos hasta las primeras instancias de la etapa puberal (8 meses), donde observaron que los animales del

grupo CM presentaron mayor tamaño testicular, mayor concentración sérica de testosterona y semen con mayor concentración de esp en comparación al grupo CA. De todas maneras, en el presente estudio, la cantidad de alimento ofrecida al grupo CA, no fue ajustada con respecto a la ofrecida al grupo CM, lo que se reflejó en diferencias en el peso corporal a favor del grupo CM y consecuentemente en el desarrollo reproductivo ya que el mismo se ve fuertemente influenciado por el peso corporal (Dyrmundsson y Lees, 1972; Brown, 1994). En nuestro estudio, los corderos fueron criados en similares condiciones, con similares tasas de crecimiento y se los evaluó hasta la etapa adulta, observándose que los distintos métodos de crianza no generan un efecto sobre los parámetros reproductivos de los carneros adultos.

De acuerdo a nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que describe el desarrollo reproductivo en carneros de la raza Ideal. Los carneros Ideal presentaron un patrón estacional claro, registrándose los mayores valores de circunferencia escrotal entre diciembre y abril, y de semen entre abril y junio. Como fue descrito por Lincoln et al. (1990), la circunferencia escrotal comenzó a aumentar en primavera 1 a 2 meses antes del inicio del verano, observándose luego los máximos valores en verano y otoño, lo que coincide con lo descrito ya para otras razas y bajo otras condiciones (Islam y Land, 1977; Mickelsen et al., 1981; 1982; Tulley y Burfening, 1983; Lincoln et al., 1990). En cuanto a los niveles séricos de testosterona, se registró el mayor pico un mes después que los testículos llegaron a su mayor volumen, al igual que lo reportado en otras razas de ovinos (Lincoln et al., 1990; Pérez Clariget et al., 1997). En el mismo sentido, considerando por un lado que la espermatogénesis en el carnero tiene una duración de 7 semanas (Schoenian, 2006; Abecia Martínez y Forcada Miranda, 2010), y por otro, que existe una relación positiva entre el tamaño testicular y la cantidad de esp producidos por día (Knight, 1973), nuestros resultados son coincidentes ya que se registraron los mayores valores de circunferencia escrotal entre las semanas 72 y 80, y los mayores valores de casi todos los parámetros seminales entre las semanas 80 y 88. Finalmente, en cuanto a los carneros de la raza Ideal se observó que, exhibieron una estacionalidad reproductiva que en términos generales coincide con la estacionalidad descrita en otras razas de ovinos en nuestro país (Fernández Abella et al., 1994; Gastel et al., 1995; Pérez Clariget et al., 1997; 1998; Ungerfeld, 2012).

10. Conclusión

La ausencia de la madre en la etapa de lactación no afectó la circunferencia escrotal, la concentración sérica de testosterona y los parámetros seminales en la etapa adulta de los carneros.

11. Bibliografía

- 1) Abecia Martínez A, Forcada Miranda F. (2010). Manejo reproductivo en ganado ovino. Zaragoza, Servet, 216p.
- 2) Alexander G. (1978). Odour, and the recognition of lambs by Merino ewes. *Appl Anim Ethol*; 4: 153–158.
- 3) Alexander G. (1977). Role of auditory and visual cues in mutual recognition between ewes and lambs in Merino sheep. *Appl Anim Ethol*; 3: 65–81.
- 4) Alexander G, Shillito EE. (1977). Importance of visual clues from various body regions in maternal recognition of the young in Merino sheep (*Ovis aries*). *Appl Anim Ethol*; 3: 137–143.
- 5) Alexander G, Stevens D. (1981). Recognition of washed lambs by Merino ewes. *Appl Anim Ethol*; 7: 77–86.
- 6) Al-Nakib FMS, Lodge GA, Owen JB. (1986). A study of sexual development of ram lambs. *Anim Prod*; 43: 459-468.
- 7) Arnold GW, Wallace SR, Maller RA. (1979). Some factors involved in natural weaning processes in sheep. *Appl Anim Ethol*; 5(1): 43-50.
- 8) Barth AD, Oko RJ. (1989). Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa, Iowa State University Press, 285p.
- 9) Birke L, Sadler D. (1987). Differences in maternal behavior of rats and the sociosexual development of the offspring. *Dev Psychobiol*; 20: 85-99.
- 10) Bizelis JA, Deligeorgis SG, Rogdakis E. (1990). Puberty attainment and fertility characteristics in ewe lambs of Chios and Karagouniki breed raised on two planes of nutrition. *Anim Reprod Sci*; 23: 197–212.
- 11) Bronson FH. (1989). Mammalian reproductive biology. Chicago, The University of Chicago Press, 325p.
- 12) Brown BW. (1994). A review of nutritional influences on reproduction in boars, bulls and rams. *Reprod Nutr Dev*; 34(2): 89-114.
- 13) Casteilla L, Orgeur P, Signoret JP. (1987). Effects of rearing conditions on sexual performance in the ram: practical use. *Appl Anim Behav Sci*; 19(1): 111-118.
- 14) Courot M. (1978). Prepubertal development and puberty: comparative aspects. *Int J Androl*; 1(s1): 11-20.
- 15) Damián JP, Beracochea F, Hötzel MJ, Banchemo G, Ungerfeld R. (2015). Reproductive and sexual behavior development of dam or artificially reared male lambs. *Physiol Behav*; 147: 47-53.

- 16) Damián JP, Hötzel MJ, Banchemo G, Ungerfeld R. (2013). Behavioral response of grazing lambs to changes associated with feeding and separation from their mothers at weaning. *Res Vet Sci*; 95: 913–918.
- 17) Dyrmondsson OR. (1981). Natural factors affecting puberty and reproductive performance in ewes lambs; a review. *Liv Prod Sci*; 8: 55-65.
- 18) Dyrmondsson OR. (1973). Puberty and early reproductive performance in sheep rams lambs. *Animal Breed Abstr*; 41(9): 419-430.
- 19) Dyrmondsson OR, Lees JL. (1972). Puberal development of Clun Forest ram lambs in relation to time of birth. *J Agric Sci*; 79: 83–89.
- 20) Eddy EM, O'Brien DA. (1994). The Spermatozoa. En: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. NY, Ed. Raven Press Ltd., p. 70-91.
- 21) Evans G, Maxwell WMC. (1990). Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza, Acribia, 192p.
- 22) Fernandez Abella D, Saldanha S, Surraco L, Villegas N, Hernández Russo Z, Rodríguez Palma R. (1994). *Boletín Técnico de Ciencias Biológicas*. Uruguay; 4:19-43.
- 23) Foster DL. (1981). Mechanism for delay of first ovulation in lambs born in the wrong season (fall). *Biol Reprod*; 25: 85-92.
- 24) Foster DL, Nagatani S. (1999). Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. *Biol Reprod*; 60: 205–215.
- 25) Foster DL, Ryan KD. (1981). Endocrine mechanisms governing transition into adulthood in female sheep. *J Reprod Fertil Suppl*; 30: 75–90.
- 26) Gastel T, Bielli A, Pérez R, López A, Castrillejo A, Tagle R, Franco J, Laborde D, Forsberg M, Rodríguez-Martínez H. (1995). Seasonal variations in testicular morphology in Uruguayan Corriedale rams. *Anim Rep Sci*; 40: 59-75.
- 27) Glover TD, D'Occhio MJ, Millar RP. (1990). Male life cycle and seasonality. En: *Marshall's Physiology of Reproduction. Reproduction in the male*, 4a ed. Lamming GE. London, Churchill-Livingstone; 2: 213-378.
- 28) Goldman BD. (2001). Mammalian photoperiodic system: Formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms*; 16: 283-301.
- 29) Goursaud AP, Nowak R. (1999). Colostrum mediates the development of mother preference by newborn lambs. *Physiol Behav*; 67: 49–56.
- 30) Guevara-Guzman R, Lévy F, Jean A, Nowak R. (2005). Electrophysiological responses of nucleus tractus solitarius neurons to CCK and gastric distension

in newborn lambs. *Cell Mol Neurosci*; 25: 393–406.

- 31) Hafez ESE, Hafez E. (2002). *Reproducción e inseminación artificial*. 7a ed. México, McGraw-Hill, 519p.
- 32) Hinch GN, Lecrivain E, Lynch JJ, Elwin RL. (1987). Changes in maternal-young associations with increasing age of lambs. *Appl Anim Behav Sci*; 17: 305–318.
- 33) Hinch GN, Lynch JJ, Elwin RL, Green GC. (1990). Long-term associations between Merino ewes and their offspring. *Appl Anim Behav Sci*; 2: 93–103.
- 34) Hulet CV, Blackwell RL, Ercanbrack SK. (1964). Observations on sexually inhibited rams. *J Anita Sci*; 23:1095.
- 35) Illius AW, Hayes NB, Lamming GE. (1976b). Effects of ewe proximity on peripheral plasma testosterone levels and behavior in the ram. *J Reprod Fertil*; 48: 25-32.
- 36) Illius AW, Haynes, NB, Purvis, K, Lamming GE. (1976a). Plasma concentrations of testosterone in the developing ram in different social environments. *J Reprod Fertil*; 48: 17-24.
- 37) Islam ABMM, Land RB. (1977). Seasonal variation in testis diameter and sperm output of rams of breeds of different prolificacy. *Anim Sci*; 25:311-317.
- 38) Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*; 70: 219–228.
- 39) Junqueira LC, Carneiro J. (2006). *Histología básica*. 6a ed. Barcelona, Masson, 488p.
- 40) Keller M, Meurisse M, Poindron P, Nowak R, Ferreira G, Shayit M, Levy F. (2003). Maternal experience influences the establishment of visual/auditory, but not olfactory recognition of the newborn lamb by ewes at parturition. *Dev Psychobiol*; 43: 167–176.
- 41) Kendrick KM, Hinton MR, Atkins K. (1998). Mothers determine sexual preferences. *Nature*; 395: 229-230.
- 42) Kerr JB, Loveland KL, O'Bryan MK, de Kretser DM. (2006). Cytology of the testis and intrinsic testis control mechanisms. En: *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*, 3a ed. St. Louis, Academic, p. 827-920.
- 43) Knight TW. (1973). The effect of the Androgen status of rams on sexual activity and fructose concentration in the semen. *Austr J of Agric Res*; 24: 573-578.

- 44) Kridli RT, Al-Yacoub AN. (2006). Sexual performance of Awassi ram lambs reared in different sex composition groups. *Appl Anim Behav Sci*; 96: 261–267.
- 45) Lau C, Klinefelter G, Cameron AM. (1996). Reproductive development and functions in the rat after repeated maternal deprivation stress. *Fundam Appl Toxicol*; 30(2): 298-301.
- 46) Lawrence AB. (1991). Mother–daughter bonds in sheep. *Anim Behav*; 42: 683–685.
- 47) Lévy F, Keller M. (2008). Neurobiology of Maternal Behavior in Sheep. *Advances in the Study of Behavior*; 38: 399-437.
- 48) Lincoln GA. (2002b). Melatonin modulation of prolactin and gonadotrophin secretion. *Adv Exp Med Biol*; 460: 137-153.
- 49) Lincoln GA. (2002a). Neuroendocrine regulation of seasonal gonadotrophin and prolactin rhythms: lessons from the Soay ram model. *Reprod (Suppl.)*; 59: 131-147.
- 50) Lincoln GA, Almeida OFX, Arendt J. (1981). Role of melatonin and circadian rhythms in seasonal reproduction in rams. *J Reprod Fert (Suppl.)*; 30:23-31.
- 51) Lincoln GA, Davidson W. (1977). The relationship between sexual and aggressive behavior, and pituitary and testicular activity during the seasonal sexual cycle of rams, and the influence of photoperiod. *J Reprod Fert*; 49(2): 267-276.
- 52) Lincoln GA, Lincoln CE, McNeilly AS. (1990). Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. *J Reprod Fert*; 88(2): 623-633.
- 53) Lincoln GA, Short RV. (1980). Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Recent Prog Horm Res*; 36: 1-52.
- 54) Lindsay DR, Fletcher IC. (1968). Sensory involvement in the recognition of lambs by their dams. *Anim Behav*; 16: 415–417.
- 55) Malpaux B. (2006). Seasonal regulation of reproduction in mammals. En: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. 3a ed. St. Louis, Academic, p. 2231-2281.
- 56) Malpaux B, Daveau A, Maurice-Mandon F, Duarte G, Chamineau P. (1998). Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: Presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinol*; 139: 1508-1516.

- 57) Malpaux B, Robinson JE, Brown MB, Karsch FJ. (1988). Importance of changing photoperiod and melatonin secretory pattern in determining the length of the breeding season in the Suffolk ewe. *J Reprod Fert*; 83: 461-470.
- 58) Malpaux B, Skinner DC, Maurice F. (1995). The ovine pars tuberalis does not appear to be targeted by melatonin to modulate luteinizing hormone secretion, but may be important for prolactin release. *J Neuroendocrinol*; 7: 199-206.
- 59) Malpaux B, Vigui C, Skinner DC, Thiéry JC, Chemineau P. (1997). Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Res Bull*; 44: 431-438.
- 60) McGowan M, Galloway D, Taylor E, Entwistle KW, Johnston P. (1995). *The Veterinary Examination of Bulls*. Brisbane, Lesley Marman AACV, 81p.
- 61) Mickelsen WD, Paisley LG, Dahmen JJ. (1982). Seasonal variation in scrotal circumference, sperm quality, and sexual ability in rams. *J Amer Vet Med Ass*; 181(4): 376-380.
- 62) Mickelsen WD, Paisley LG, Dahmen JJ. (1981). The effect of season on the scrotal circumference and sperm motility and morphology in rams. *Theriogenology*; 16(1): 45-51.
- 63) Moberg GP, Anderson CO, Underwood TR. (1980). Ontogeny of the adrenal and behavioral responses of lambs to emotional stress. *J Anim Sci*; 51: 138–142.
- 64) Moberg GP, Wood VA. (1981). Neonatal stress in lambs: behavioral and physiological responses. *Dev Psychobiol*; 14: 155–162.
- 65) Mogi K, Nagasawa M, Kikusui T. (2011). Developmental consequences and biological significance of mother–infant bonding. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 35: 1232–1241.
- 66) Moore C. (1984). Maternal contributions to the development of masculine sexual behavior in laboratory rats. *Dev Psychobiol*; 17: 347-356.
- 67) Moore CL. (1992). The role of maternal stimulation in the development of sexual behavior and its neural basis. *Ann NY Acad Sci*; 662: 160–177.
- 68) Neill JD, Challis JRG, De Kretser DM, Ptuff DW, Richards JS, Plant TM, Wassarman PM. (2006). En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3a ed. San Diego, Elsevier, 1; 1726.
- 69) Nowak R. (1990). Mother and sibling discrimination at a distance by three to seven day old lambs. *Dev Psychobiol*; 23: 285–295.

- 70) Nowak R. (1991). Senses involved in discrimination of merino ewes at close contact and from a distance by their newborn lambs. *Anim Behav*; 42: 357–366.
- 71) Nowak R, Keller M, Lévy F. (2011). Mother–young relationships in sheep: a model for a multidisciplinary approach of the study of attachment in mammals. *J Neuroendocrinol*; 23: 1042–1053.
- 72) Nowak R, Murphy TM, Lindsay DR, Alster P, Andersson R, Uvnas-Moberg K. (1997). Development of a preferential relationship with the mother by the newborn lamb: importance of the sucking activity. *Physiol Behav*; 62: 681–688.
- 73) Nowak R, Poindron P, Putu IG. (1989). Development of mother discrimination by single and multiple newborn lambs. *Dev Psychobiol*; 22: 833–845.
- 74) O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, McLachlan RI. (2006). Endocrine regulation of spermatogenesis. En: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*, 3a ed. St. Louis, Academic, p. 1017-1054.
- 75) Orgeur P, Mavric N, Yvone P, Bernard S, Nowak R, Schaal B, Levy F. (1998). Artificial weaning in sheep: consequences on behavioral, hormonal and immuno-pathological indicators of welfare. *Appl Anim Behav Sci*; 58(1): 87-103.
- 76) Orihuela A, Suárez E, Vázquez R. (2004). Effect of restricting suckling on the social bond between ewes and their 10-week-old lambs. *Livest Prod Sci*; 87(2): 259-264.
- 77) Palmer CW, Amundson SD, Brito LFC, Waldner CL, Barth AD. (2004). Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. *Anim Reprod Sci*; 80: 213–223.
- 78) Palmer CW, Brito LFC, Arteaga AA, Soderquist L, Persson Y, Barth AD. (2005). Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. *Anim Reprod Sci*; 87: 25–31.
- 79) Pérez-Clariget R, Forsberg M, López A, Castrillejo A. (1998). Effects of nutrition on seasonal changes in scrotal circumference, testosterone and pituitary responsiveness to exogenous GnRH in Corriedale rams. *Small Rum Res*; 29(1): 61-69.
- 80) Pérez-Clariget R, López A, Castrillejo A, Bielli A, Laborde D, Gastel T, Tagle R, Queirolo D, Franco J, Forsberg M, Rodríguez-Martínez H. (1997). Reproductive seasonality of Corriedale Rams under extensive rearing conditions. *Acta Vet Scand*; 38: 109-117.
- 81) Perkins A, Fitzgerald JA. (1994). The behavioral component of the ram effect:

- the influence of ram sexual behavior on the induction of estrus in anovulatory ewes. *J Anim Sci*; 72: 51–55.
- 82) Perkins A, Fitzgerald JA, Price EO. (1992). Sexual performance of rams in serving capacity tests predicts success in pen breeding. *J Anim Sci*; 70: 2722-2725.
 - 83) Pineda MH. (1989). Male reproduction. En: McDonald LE, Pineda MH. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. 4a ed. Philadelphia, Lea & Febiger, p. 261-302.
 - 84) Poindron P, Caba M, Gomora Arrati P, Krehbiel D, Beyer C. (1994). Responses of maternal and non-maternal ewes to social and mother–young separation. *Behav Proc*; 31: 97–110.
 - 85) Poindron P, Le Neindre P. (1980). Endocrine and sensory regulation of maternal behavior in the ewe. *Adv Study Behav*; 11: 75-119.
 - 86) Poindron P, Levy F, Keller M. (2007). Maternal responsiveness and maternal selectivity in domestic sheep and goats: the two facets of maternal attachment. *Dev Psychobiol*; 49: 54–70.
 - 87) Price EO, Borgwardt R, Blackshaw JK, Blackshaw A, Dally MR, Erhard H. (1994). Effect of early experience on the sexual performance of yearling rams. *Appl Anim Behav Sci*; 42: 41–48.
 - 88) Price EO, Borgwardt R, Dally MR. (1996). Heterosexual experience differentially affects the expression of sexual behavior in 6-and 8-month-old ram lambs. *Appl Anim Behav Sci*; 46(3): 193-199.
 - 89) Price EO, Estep DQ, Wallach SJ, Dally MR. (1991). Sexual performance of rams as determined by maturation and sexual experience. *J Anim Sci*; 69(3): 1047-1052.
 - 90) Pursel VG, Johnson LA. (1974). Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*; 1: 63-68.
 - 91) Rhees RW, Lephart ED, Eliason D. (2001). Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. *Behav Brain Res*; 123: 1-10.
 - 92) Salisbury GW, VanDenmark NL, Lodge JR. (1978). *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bovinos*. 2a ed. Zaragoza, Acibia, 831p.
 - 93) Santiago-Moreno J, Gomez-Brunet A, Gonzalez de Bulnes A, Villar D, Lopez-Sebastian A. (2000). Attainment of puberty in the European Mouflon (*Ovis gmelini musimon*) and the domestic manchega ewe (*Ovis aries*). *Reprod Domest Anim*; 35: 49–52.

- 94) Schoeanian S. (2006). Reproduction in the Ram. Disponible en URL: <http://www.sheep101.info/201/ramrepro.html>. Fecha de consulta: 28 de septiembre de 2016.
- 95) Searby A, Jouventin P. (2003). Mother-lamb acoustic recognition in sheep: a frequency coding. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*; 270: 1765–1771.
- 96) Senger PL. (2003). Puberty. En: Senger, P.L. (Ed.), *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2a ed. USA, Pullman, Current Conceptions, p. 128–143.
- 97) Shillito Walser EE. (1978). A comparison of the role of vision and hearing in ewes finding their own lambs. *Appl Anim Ethol*; 4: 71–79.
- 98) Stellflug JN, Lewis GS. (2007). Effects of early and late exposure to estrual ewes on ram sexual performance classifications. *Anim Rep Sci*; 97: 295-302.
- 99) Tulley D, Burfening PJ. (1983). Libido and scrotal circumference of rams as affected by season on the year and altered photoperiod. *Theriogenology*; 20(4): 435-448.
- 100) Ungerfeld R. (2012). Seasonal reproductive patterns and effectiveness as teasers (ram effect) of Corriedale and Milchschaf rams. *Anim Prod Sci*; 52: 1036-1041.
- 101) Ungerfeld R, González-Pensado SP. (2008). Social rank affects reproductive development in male lambs. *Anim Rep Sci*; 109: 61-171.
- 102) Ungerfeld R, Lacuesta L. (2010). Social rank during pre-pubertal development and reproductive performance of adult rams. *Anim Rep Sci*; 121: 101–105.
- 103) Ungerfeld R, Lopez-Sebastian A, Estes M, Pradiee J, Toledano-Diaz A, Castano C, Labrador B, Santiago-Moreno J. (2015). Physiological responses and characteristics of sperm collected after electroejaculation or transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands in anesthetized mouflons (*Ovis musimon*) and Iberian ibexes (*Capra pyrenaica*). *Theriogenology*; 84: 1067–1074.
- 104) Val-Laillet D, Meurisse M, Tillet Y, Nowak R. (2004). Differential c-Fos expression in the newborn lamb nucleus tractus solitarius and area postrema following ingestion of colostrum or saline. *Brain Res*; 1028: 203–212.
- 105) Vince MA, Ward TM. (1984). The responsiveness of newly born Clun Forest lambs to odour sources in the ewe. *Behaviour*; 89: 117–127.
- 106) Weary DM, Jasper J, Hötzel MJ. (2008). Understanding weaning distress. *Appl Anim Behav Sci*; 110(1): 24-41.
- 107) Wolf FR, Almquist JO, Hale EB. (1965). Prepuberal behavior and puberal

- characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. *J Anim Sci*; 24: 761–765.
- 108) Wood RI, Foster DL. (1998). Sexual differentiation of reproductive neuroendocrine function in sheep. *Rev Reprod*; 3(2): 130-140.
- 109) Zavros Y, Fleming WR, Hardy KJ, Shulkes A. (1998). Regulation of fundic and antral somatostatin secretion by CCK and gastrin. *Am J Physiol*; 274: G742–G750.
- 110) Zavros Y, Shulkes A. (1997). Cholecystokinin (CCK) regulates somatostatin secretion through both the CCK-A and CCK-B/gastrin receptors in sheep. *J Physiol*; 505: 811–821.
- 111) Zenchak JJ, Anderson GC. (1980). Sexual performance levels of rams (*Ovis aries*) as affected by social experiences during rearing. *J Anim Sci*; 50(1): 167-174.
- 112) Zenchak JJ, Anderson GC, Schein MW. (1981). Sexual partner preference of adult rams (*Ovis aries*) as affected by social experiences during rearing. *Appl Anim Ethol*; 7(2): 157-167.