

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**FUNCIONALIDAD TESTICULAR EN CORDEROS CRIADOS ARTIFICIALMENTE
Y CON SUS MADRES: DESAFÍO CON GNRH AL FINAL DE LA PRIMERA
ESTACIÓN REPRODUCTIVA**

Por

Guillermo Alejandro AROTCE OTHAIX

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: PRODUCCIÓN ANIMAL

ENSAYO EXPERIMENTAL

MONTEVIDEO
URUGUAY
2013

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Alejandro Bielli

Segundo miembro (Tutor):

Juan Pablo Damián

Tercer miembro:

Danilo Fila

Cuarto miembro (Co-Tutor):

Rodolfo Ungerfeld

Fecha:

8/8/2013

Autor:

Guillermo Arotce

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quisiera agradecer a mis padres que me dieron todas las herramientas y me formaron como persona durante todo mi desarrollo enseñándome los valores de la vida y demostrándome el camino hacia una persona correcta. También me gustaría agradecer a mis hermanas que fueron un ejemplo para mí como personas aportando siempre sus cuotas de humor haciendo todo mucho más sencillo. Por otro lado, también quisiera reconocer a Tatiana, la persona que me acompaña durante casi 7 años, apoyándome y acompañándome en todo, completándome como persona. Del mismo modo, me gustaría agradecer a Daniel y Miriam que los considero como mis segundos padres, aceptándome desde el primer momento y tratándome como si fuera un hijo. También me gustaría reconocer a mis amigos tanto del liceo que continúo en contacto como los de facultad, que me acompañaron siempre y me hicieron disfrutar de mis ratos de ocio. Del orden académico, quisiera agradecer a aquellos profesores que me formaron tanto en lo profesional como en lo personal. Mas precisamente al trabajo final, agradecer primero que nada a Juan Pablo que siempre me ayudo a realizar y ordenar el trabajo, destinando mas del tiempo que podía en ello, sin perder nunca el respeto ni la paciencia. A su vez, también reconocer a Rodolfo, que aportó su experiencia y conocimientos para poder realizar un buen trabajo. Es importante agradecer a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (FCE2626-ANII) que financió el proyecto pudiendo realizar el trabajo sin problemas. Por último, me gustaría agradecer a Cesar, Juan, Conrado, Carol, María Jesús y a los funcionarios Damián González, Alberto García y Sofía Moraes del INIA La Estanzuela que ayudaron de diferentes formas para que este trabajo se pudiera realizar.

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	5
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVOS	14
HIPÓTESIS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
RESULTADOS	19
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIÓN	24
BIBLIOGRAFÍA	25

RESUMEN

Dentro de los factores sociales, la presencia y el vínculo entre la madre y la cría es de fundamental importancia para el desarrollo posterior de la cría. El destete temprano (separación de la madre de su cría) es una práctica de manejo que se realiza en los establecimientos ovejeros con el objetivo de lograr una temprana recuperación de la madre. Sin embargo, no se conoce el efecto que tiene el destete temprano sobre el desarrollo sexual de los corderos. El objetivo de la tesis fue comparar las concentraciones séricas de testosterona basales al final de la primera estación reproductiva y la respuesta testicular al desafío con GnRH en corderos que fueron criados con sus madres de aquellos criados artificialmente. Se utilizaron 27 carneros de raza Ideal, de los cuales 14 fueron separados de sus madres al día de nacidos y criados artificialmente (CA) con leche de oveja, y 13 criados por su madre (CM). El destete se realizó cuando los corderos tenían en promedio 75 días de edad. Las madres de los corderos CM se trasladaron a otro potrero donde no tenían contacto visual ni acústico con los corderos en experimentación. En ese mismo momento los corderos CA dejaron de recibir la leche materna. El experimento se realizó en mayo-junio del 2012. Se obtuvieron muestras de sangre para determinar las concentraciones basales de testosterona sérica en las semanas 35, 37, 38 y 39 de edad de los carneros. En la semana 40 de edad se realizó el desafío con GnRH (se administró acetato de buserelina, un análogo sintético de GnRH) a cada cordero. Se realizaron dos pruebas utilizando dos dosis de buserelina: 4,2 μg (dosis baja) por carnero [CA (n=7) y CM (n=6)], y 8,4 μg (dosis alta) [CA (n=7) y CM (n=7)]. Las concentraciones séricas de testosterona fueron analizadas por RIA, utilizando un kit comercial. Las concentraciones séricas de testosterona entre ambos grupos en las semanas previas al desafío con GnRH y luego del desafío con GnRH, fueron comparadas por ANOVA para medidas repetidas, donde se incluyó el efecto del grupo (CA vs CM), del tiempo y la interacción entre ambos. No hubo diferencias significativas en la concentración sérica de testosterona entre las semanas 35, 37 y 38, pero sí hubo una diferencia significativa ($p < 0,001$) entre estas semanas con respecto a la semana 39. No hubo efecto grupo ni interacción entre grupo y tiempo en la concentración de testosterona. Con respecto al desafío con GnRH a dosis baja no se encontró efecto del grupo, pero sí efecto del tiempo ($p < 0,001$) y una interacción entre grupo y tiempo ($p = 0,009$) en los cambios de concentración sérica de testosterona. Los corderos CA presentaron un mayor incremento proporcional de testosterona a las 3,5 horas ($p = 0,032$) y 4 horas ($p = 0,039$) que el grupo CM. Frente a la dosis alta de GnRH también se encontró un efecto tiempo ($p < 0,001$), pero no hubo efecto grupo ($p = 0,38$) ni interacción entre grupo y tiempo ($p = 0,71$) en los cambios de concentración sérica de testosterona. En conclusión, los corderos que fueron CA presentaron una mayor respuesta al desafío con una dosis baja GnRH (determinada por porcentaje relativo de testosterona) que aquellos CM, pero no presentaron diferencias al desafío con una dosis alta. Al final de la estación reproductiva no se encontraron diferencias en las concentraciones basales de testosterona entre ambos grupos.

SUMMARY

Among social factors, the bond between mother and lamb is of fundamental importance for the subsequent development of the offspring. Early weaning (separation of the mother and her offspring) is a practice done in ovine establishments in order to achieve an early recovery of the mother. However, early weaning effect over lambs' sexual development is unknown. The aim of this study was to compare basal serum testosterone concentrations at the end of the first breeding season and testicular response to GnRH challenge in lambs reared with their mothers from those raised artificially. We used 27 Polwarth sheep from which 14 were separated from their mothers from the day of birth and artificially reared (AR) with sheep's milk, and the other 13 were raised by their mothers (RM). RM lambs were weaned at 75 days of age average. Mothers of RM lambs were moved to another paddock making it impossible for the lambs to have any visual or acoustic contact with their mothers. At the same time the AR lambs stopped receiving breast milk. The experiment was conducted in the period May-June 2012. Blood samples were obtained to determine basal testosterone serum concentrations at 35, 37, 38 and 39 weeks of rams' age. At 40 weeks of age GnRH challenge was performed (buserelin acetate, a synthetic analogue of GnRH) to each lamb. We performed two tests using two doses of buserelin: 4.2 mg (low dose) for ram [AR (n = 7) and RM (n = 6)], and 8.4 mg (high dose) [AC (n = 7) and RM (n = 7)]. Serum testosterone concentrations were analyzed by RIA, using a commercial kit. The serum testosterone concentrations between the two groups in the weeks before and after GnRH challenge were compared by ANOVA for repeated measures, which included the effect of the group; the time (AR vs. MR), and the interaction between both. Results did not show significant difference in serum testosterone between weeks 35, 37 and 38, but there was found a significant difference ($p < 0.001$) between these weeks and the 39 weeks. There was no group effect or interaction between group and time in testosterone concentration. When lambs were GnRH challenged at low-dose we found a time effect ($p < 0.001$) and an interaction between group and time ($p = 0.009$) but no group effect. AR lambs had proportionally a higher increase of testosterone at 3.5 hours ($p = 0.032$) and 4 hours ($p = 0.039$) than the RM group. There was also found a time effect ($p < 0.001$), when a high doses of GnRH was administrated, but nor group effect ($p = 0.38$) neither interaction between group and time ($p = 0.71$) were found. In conclusion, AC lambs showed a greater response to the challenge when the low dose of GnRH was administrated (determined by the relative percentage of testosterone) than RM, but no difference was found when the high dose of GnRH was administrated. At the end of the breeding season there were no differences in baseline testosterone concentrations between groups.

INTRODUCCIÓN

Anatomía y funcionalidad testicular

El testículo es un conglomerado de túbulos seminíferos, rodeados por una cápsula fibrosa (túnica albugínea), recorrida por abundante cantidad de vasos sanguíneos. La albugínea proyecta tabiques hacia el interior del testículo, no llegando a producir separaciones netas. La relación de los túbulos seminíferos con el resto del parénquima testicular es del 45% en el bovino recién nacido, pero de 80% en el animal adulto (2,5 años). Los elementos que forman los testículos son el tejido limitante del túbulo seminífero, el epitelio estratificado, células de soporte de Sertoli, células espermátogénicas (espermátogonias, espermátocito primario, espermátocito secundario, espermátida y espermátocito), células intersticiales o de Leydig, células peritubulares (en el tejido limitante), vasos sanguíneos y vasos linfáticos (Rutter y Ruso 2006).

Los testículos tienen las siguientes funciones: gametogénica (producción de espermátocitos), endocrina (biosíntesis y secreción de hormonas, proteínas portadoras, factores de crecimiento y citoquinas), y biosíntesis y secreción de fluidos (fluido de túbulo seminífero, fluido intersticial y fluido de la rete testis). Estas funciones tienen lugar en los compartimientos denominados intersticial, basal y adluminal. Aunque anatómicamente separados, están funcionalmente integrados para una producción normal tanto cuantitativa como cualitativa de espermátocitos. El funcionamiento de estos compartimientos está regulado en forma sistémica y local. La primera función la realiza a través del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, mediante los mecanismos de retroalimentación entre la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), de origen hipotalámico, las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), de origen hipofisarias, y la relación testosterona/estrógenos para la LH, y las inhibinas para la FSH. En forma local (paracrina-autocrina) existen factores de crecimiento y citoquinas sintetizadas y secretadas por las células situadas dentro de los compartimientos (Rutter y Ruso 2006).

La secreción de hormonas, proteínas portadoras, factores de crecimiento, citoquinas y la producción de espermátocitos, son dependientes de la acción de la LH y FSH, que tienen sus respectivos receptores para llevar a cabo sus acciones fisiológicas en las células de Leydig (LH) y las células de Sertoli (FSH). Las células de Leydig son la fuente primaria de los esteroides testiculares, testosterona (Ewing y Brown 1977, Zirkin et al. 1980). Las células de Sertoli que forman la barrera hemato-testicular en la pubertad, secretan proteínas transportadoras de andrógenos (ABP: Androgen binding protein) e inhibina (Steinberger 1981 a, b). La ABP regula el transporte y la concentración de testosterona en los túbulos seminíferos y el epidídimo, y la inhibina inhibe la secreción de FSH por la hipófisis anterior (Blanc et al. 1981, Ritzen et al. 1981). El compartimiento intersticial contiene las células de Leydig y las células peritubulares que están rodeando a los túbulos seminíferos; los otros dos compartimientos están dentro de los túbulos seminíferos, y están separados del intersticio por la barrera hematotesticular. El compartimiento basal contiene espermátogonias que se dividen por mitosis, mientras que el adluminal es un medio ambiente especial en el cual los espermátocitos sufren meiosis y las espermátidas se diferencian a espermátocitos (Amann y Schanbacher 1983).

Desarrollo sexual en machos

Durante los periodos fetal y neonatal el hipotálamo produce GnRH, la cual produce una estimulación de la hipófisis que se manifiesta con una secreción de LH (Foster et al. 1972b) y FSH (Schanbacher 1982). Con respecto a la LH, la misma aumenta desde el nacimiento para alcanzar un máximo entre el primer y segundo mes de vida, la cual desciende rápidamente para volver a aumentar en la pubertad (Foster et al. 1972 a, Thimonier et al. 1972, Cotta et al. 1975, Courot et al. 1975). El aumento de la concentración de esta hormona en sangre se debe a un incremento de la frecuencia de sus pulsos (Foster et al. 1978). La pulsatilidad de esta hormona se observa a partir de la semana de vida (Savoie et al. 2008).

Los niveles plasmáticos de FSH aumentan a partir del nacimiento hasta las 8-10 semanas de edad, y luego disminuye en forma similar al perfil de secreción de LH (Lee et al. 1976, Savoie 1979, Walton et al. 1980, Lafortune et al. 1984). Existe una estrecha relación entre la secreción de LH y la de testosterona (Cotta et al. 1975, Lee et al. 1976, Savoie et al. 2008). Cada pulso de LH induce un aumento de la concentración sérica de testosterona. Sin embargo, la capacidad de las células de Leydig de responder al estímulo de LH depende de la edad del animal. Durante el primer mes de edad el testículo no es capaz de responder a todos los pulsos de LH (Lafortune et al. 1984). Luego del primer mes de vida aumenta la capacidad de las células de Leydig de responder a LH, alcanzando su plenitud hacia las ocho semanas de edad (Foster et al. 1978), a consecuencia del incremento de la frecuencia de pulsos de LH (Foster et al. 1978, Savoie et al. 2008), el número de receptores de LH (Barenton et al. 1983) y la cantidad de células de Leydig (Monet-Kuntz et al. 1984).

Desarrollo sexual en corderos

Con respecto al desarrollo sexual en corderos, Dyrmondsson (1973) establece que tanto el desarrollo sexual como la edad a la pubertad está controlada por mecanismos que afectan al cerebro y a la glándula pituitaria anterior, que regula tanto la síntesis como la liberación de hormonas gonadotrópicas. La espermatogénesis completa, marcada por la liberación de los espermatozoides, es precedida por un aumento constante en el nivel de secreción de andrógenos y un mayor desarrollo, como descenso de los testículos y la ruptura de las adherencias prepuciales, que a su vez también se encuentran bajo control endocrino, las cuales se completan antes que la pubertad se alcance. El desarrollo sexual, tal como se indica por el crecimiento de los órganos reproductivos y por la realización de la espermatogénesis en forma completa, parece estar más estrechamente relacionado con el crecimiento del cuerpo que por la edad cronológica. Por lo tanto el nivel de nutrición durante la cría, o cualquier alteración en el crecimiento, puede tener una marcada influencia en el desarrollo puberal.

En el macho la pubertad ha sido definida como la presencia de espermatozoides en el testículo (Courot 1962, Dyrmondsson 1973), o como la primera eyaculación (Levasseur y Thibault 1980). Sin embargo Amann y Schanbacher (1983) consideran la pubertad de una manera práctica: "un macho es púber cuando la cantidad de espermatozoides (50×10^6) es suficiente en cantidad y calidad como para fecundar una hembra". Por otro lado Dun (1955) encuentra una

relación elevada entre la aparición de espermatozoides en el eyaculado y la desaparición de adherencias entre el pene y el prepucio. Wiggins y Terril (1952) demostraron la relación existente entre los niveles de testosterona circulante y la desaparición de las mencionadas adherencias. Similarmente, la aparición de espermatozoides dentro de los tubos seminíferos está más correlacionada al peso vivo que a la edad de los corderos (Courrot et al. 1962).

Control de la reproducción en machos

La GnRH juega un rol fundamental en la actividad reproductiva. Cada pulso de GnRH estimula a las células gonadotropas de la adenohipofisis a liberar LH (Bielli 2002). Las concentraciones de LH en sangre periférica mantienen variaciones pulsátiles directamente relacionadas con las concentraciones de GnRH (Ungerfeld 2002).

Existe un sistema de retroalimentación negativa muy sensible entre la LH y la secreción de testosterona. Los aumentos en la concentración de LH son seguidos por aumentos en los niveles plasmáticos de testosterona. En carneros se ha observado un aumento gradual de testosterona durante las 2 horas siguientes a la administración de GnRH (Wilson y Lapwood 1978), para posteriormente descender hasta valores basales a las 4 horas posteriores a la administración, lo que se debe a una inhibición de la secreción de LH por retroalimentación negativa (Tilbrook y Clarke 2001).

Factores que afectan la reproducción en machos

Fotoperiodo

Los cambios estacionales del fotoperiodo son los principales determinantes de la actividad reproductiva. El ovino ha desarrollado un método de contracepción natural impidiendo la reproducción en periodos no favorables (Lincoln y Short 1980). En el macho si bien la espermatogénesis es un proceso continuo, la producción del parénquima testicular es 50 a 80% menor en primavera que en otoño (Ortavant 1958, Decheux et al. 1981). Asimismo, la calidad espermática varía determinando mayor criosupervivencia de los espermatozoides (congelabilidad) en el otoño frente al invierno (Colas y Brice 1976, Fiser y Fairfull 1983).

Los mensajes del fotoperiodo provocan una acción sobre el eje hipotalámico-hipofisario, previo pasaje por la glándula pineal, determinando una menor sensibilidad a la retroalimentación negativa de los esteroides gonadales, tanto en machos como en hembras. El ovino mide el fotoperiodo existente a través de un sistema fotosensible controlado por un ritmo circadiano endógeno. Para las gonadotropinas, la existencia de un periodo luminoso de una hora, entre 10 a 20 horas después del alba actúa favorablemente incrementándose los niveles plasmáticos semanas después (Pelletier et al. 1981). Esto determina que los valores máximos de LH y FSH en el plasma sanguíneo se alcancen durante el otoño (días cortos). La existencia de estos periodos fotosensibles fue descubierta inicialmente en el carnero y verificada su existencia posteriormente en la oveja (Ravault y Ortavant 1977, Lincoln et al. 1977, Pelletier et al. 1981).

Nutrición

Las respuestas a la subnutrición, especialmente aquellas debidas a cambios en la suplementación de energía, se puede dividir en: efectos indirectos o a largo plazo y efectos directos o efecto a corto plazo.

Los efectos a largo plazo se refieren a la influencia de la nutrición durante las etapas fetales del animal hasta alcanzar la pubertad y su repercusión en el animal adulto. La nutrición afecta el potencial genético de un individuo a partir de su estado fetal (Gunn 1983). Existen datos experimentales que demuestran la estrecha relación entre la secreción de las gonadotropinas y la hormona de crecimiento (STH o GH) (Foster y Olster 1985). Estas hormonas son secretadas a niveles crecientes en los corderos prepúberes bien alimentados (Foster et al. 1985). En los corderos machos, la nutrición afecta marcadamente la pubertad. Al igual que en la hembra, los niveles de gonadotropinas afectan la liberación de andrógenos y el crecimiento testicular (Mann et al. 1967, Skinner y Rowson 1968).

Los efectos a corto plazo son aquellos que actúan directamente en los periodos de pre-cubrición y cubrición (encarnerada) (Gunn 1983, Haresign 1984). En el carnero, los efectos nutricional modifican en muy corto plazo el peso vivo y el volumen del eyaculado (a la semana), al mes el tamaño testicular, y después de siete semanas la producción espermática. Esto indica que la nutrición afecta los estados de la espermatogénesis posteriormente a la última división espermatogonial (Cameron et al. 1988).

Clima

Las temperaturas extremas (mayores de 30°C) provocan un estrés en el animal, variable según su capacidad para mantener la temperatura corporal. Esto provoca alteraciones importantes en las funciones reproductivas, se reduce el flujo sanguíneo hacia los órganos reproductivos y se modifican las secreciones hormonales. En el carnero, las elevadas temperaturas afectan la espermatogénesis disminuyendo la fertilidad. Cuanta más alta es la temperatura interna del testículo y la duración de esta temperatura, mayor será el daño producido (Dun 1956, Moule 1970, Rathore 1970).

Sanidad

Existen enfermedades infecciosas y metabólicas como orquitis, periorquitis o epididimitis, que afectan varios procesos reproductivos, principalmente la producción espermática en el carnero (Castrillejo 1987).

Factores sociales

Dentro de los factores sociales, la presencia y el vínculo entre la madre y la cría es de fundamental importancia para el desarrollo posterior de la cría. La madre provee comida, calor, refugio y protección de los depredadores, por lo que influye en la supervivencia del cordero hasta el destete (Lévy y Keller 2008). La madre también influye en el desarrollo fisiológico, sensorial, emocional y social de los recién nacidos (Lévy y Keller 2008).

El cordero desencadena un fuerte vínculo con la madre inmediatamente luego del nacimiento (Poindron y Le Neindre, 1980), el que se mantiene por las siguientes 4 semanas (Morgan y Arnold, 1974). Separar al cordero de su madre antes de este tiempo es considerado un estresor, el cual se evidencia por el aumento en la frecuencia de locomoción y de las vocalizaciones, tanto del cordero como de su madre (Alexander 1977). Continuando con este razonamiento, Johnson et al. (1992) indica que la actividad reproductiva es una de las principales funciones que se alteran e inactivan mediante factores estresantes. Los animales machos bajo situaciones de estrés pueden disminuir la secreción de testosterona (Collu et al. 1984, Damián y Ungerfeld 2011), espermatogénesis (Almeida et al. 2000a, 2000b) e inclusive la libido (Keverne 1979 y Sapolsky et al. 1986).

Si bien no hay ninguna información de que el vínculo con la madre pueda afectar directamente la etapa reproductiva posterior en ovinos, existen trabajos efectuados en roedores en los que se evaluó el efecto que producía el lamido de la madre en la región ano genital y su repercusión en la vida adulta. Birke y Sadler (1987) observaron que aquellas crías que no fueron lamidas por la madre en la región ano-genital, presentaron intervalos mayores entre montas cuando llegaron a la etapa adulta que aquellos que sí lo fueron. A lo mismo se refiere Moore (1984), quien concluyó que la estimulación del lamido materno a las crías contribuye al desarrollo de la tasa de copulación cuando adultos, lo que significa una menor cantidad de penetraciones por eyaculado. Nishi et al. (2012) adjudicaron estas diferencias a que la separación maternal puede afectar a nivel central al eje hipotálamo-hipófiso-adrenocortical con la consecuente secreción de corticosterona, la que tendría un efecto de depresión y alteración de la actividad de los correspondientes sistemas fisiológicos en la etapa adulta. En el mismo sentido, Kikusui et al. (2009) observaron que aquellos ratones que fueron destetados a los 14 días de vida presentaron niveles de corticosterona altos durante las 48 horas luego del destete, mientras que en aquellos destetados a los 21 días los niveles de corticosterona descendían a niveles basales a las 2 horas posteriores al destete.

Una revisión efectuada en mamíferos por Mogi et al. (2011) sintetiza información en la que se demuestra en roedores que el destete precoz no afecta el crecimiento del cuerpo, pero sí tiene efectos sobre la ansiedad, aumentando la misma en la etapa adulta (Ito et al. 2006, Kanari et al. 2005, Kikusui et al. 2004, 2006). También se ha demostrado que el destete precoz disminuye la conducta materna y la aceptación de las crías en la etapa adulta en ratas (Novakova 1975).

Otros hallazgos se han observado en animales domésticos. Lechones destetados precozmente tuvieron menor tasa de crecimiento (Leibbrandt et al. 1975) y mayor agresividad (McGlone y Curtis 1985). A su vez, el destete precoz se correlaciona con la aparición de problemas de comportamiento en perros, como mayor agresividad y ansiedad crónica (Slabbert y Rasa 1993, Hsu y Serpell 2003). Un estudio realizado en bovinos de carne (Arias et al. 1998) concluyó que el destete precoz en bovinos disminuye la ganancia de peso en los terneros logrando terneros más livianos al concluir la cría.

A su vez, en los ovinos, el vínculo emocional entre la madre y su descendencia masculina, más que otros factores sociales o genéticos, puede

determinar alteraciones irreversibles, tanto en el ámbito social como sexual, mientras que en hembras esta influencia es más leve y reversible (Kendrick et al. 1998). En el mencionado trabajo, se criaron corderos con cabras pero permitiendo el contacto social con ovejas en todo momento. Durante la etapa de cría, su comportamiento de juego era más parecido al de las cabras, sin embargo parámetros específicos de agresión, vocalización, escalada y alimentación no fueron afectados. En la etapa adulta, los corderos machos criados por cabras prefirieron socializar y montar a cabras (89,1% del tiempo) inclusive después de haber convivido 3 años con animales de su misma especie.

Evaluación testicular

Existen diferentes formas para evaluar el funcionamiento testicular, dentro de las cuales Uthlaut (2011) menciona la medición de la circunferencia escrotal, la respuesta a la LH y testosterona y un completo análisis del semen.

Examen clínico testicular

El tamaño testicular varía según las razas, la edad y la presencia de patologías. Se puede medir a lo largo, ancho y espesor expresándolo en centímetros, siendo este método el más usado. El contorno escrotal se mide mediante una cinta métrica de metal o plástico (escrotímetro) que en uno de sus extremos cuenta con un cursor que permite operarla con una sola mano. La forma normal del testículo es abollonada (ovoide longitudinal). Las distintas formas halladas en los testículos pueden en parte correlacionarse con otros parámetros como lo es la consistencia; así en los testículos casi cilíndricos, se nota una consistencia dura fibrosa, pero en los testículos casi esféricos la consistencia es más blanda (Rutter y Russo 2006).

La simetría es otra medición que se realiza de forma bastante subjetiva. Como en todo órgano par, en los testículos hay una leve asimetría fisiológica; cualquier otro tipo de variaciones en la asimetría puede corresponder a un trastorno. La posición normal es vertical sin cruzamientos y sin torsión. En el examen de toros se observa con relativa frecuencia testículos con posición vertical, pero con diversos grados de cruzamiento y torsión. A su vez, la movilidad se realiza con el fin de encontrar los testículos deslizables y desplazables dentro de la bolsa escrotal. La consistencia del testículo es tenso elástica y se asemeja al músculo bíceps braquial en semiflexión (Rutter y Russo 2006).

Evaluación de la funcionalidad testicular: desafío a GnRH

Varios estudios han utilizado la administración exógena de GnRH con el fin de evaluar la respuesta del eje pituitario-gonadal. Wilson y Lapwood (1978) realizaron dos tipos de administración exógena, una a través de prolongadas infusiones y otra a través de una sola inyección manejando 4 dosis diferentes de GnRH (3,1 µg, 12,5 µg, 50 µg y 200 µg) con el fin de evaluar niveles séricos de LH y testosterona. Se realizaron 2 extracciones sanguíneas antes y 14 extracciones luego de administrar la GnRH espaciadas de 5 a 10 minutos entre cada una debido al comportamiento de las hormonas en estudio.

Como fue planeado anteriormente, queda establecido que la separación madre-cría afecta el comportamiento sexual de la cría pero no se sabe qué sucede con la funcionalidad reproductiva en machos. Por lo tanto, se manejaron dos grupos diferentes en su forma de crianza, uno destetado tempranamente y otro que permaneció con su madre, para poder evaluar cuánto afecta este manejo sobre la funcionalidad reproductiva. Este trabajo forma parte de un proyecto en el cual uno de los objetivos es evaluar la respuesta a un desafío con GnRH, pero a su vez se encuentran otros objetivos que evalúan el desarrollo reproductivo (características del semen, circunferencia escrotal, concentraciones séricas de testosterona, comportamiento sexual) cada 15-20 días.

OBJETIVOS

Determinar si las concentraciones séricas de testosterona basales al final de la estación reproductiva es mayor en corderos criados con sus madres que en corderos criados artificialmente.

Determinar si los perfiles de testosterona sérica en respuesta a un desafío con GnRH al final de la primera estación reproductiva es mayor en corderos criados con sus madres que en corderos criados artificialmente.

HIPÓTESIS

Los corderos criados con sus madres producen mayor concentración sérica de testosterona basal y mayor concentración sérica de testosterona frente al desafío con GnRH que aquellos criados artificialmente al final de la primera estación reproductiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Manejo de los animales

El trabajo se realizó en la Unidad de Ovinos del INIA - La Estanzuela, Colonia con 27 carneros de raza Ideal en el mes de junio del 2012 correspondiente a la semana 40 de vida. Lo mismos nacieron en el mes de setiembre del 2011, siendo hijos de 3 carneros y nacidos de parto único con un máximo de 12 días de diferencia. Antes de la parición las madres permanecieron en el mismo lugar y se les brindaron las mismas condiciones. Durante la parición se recorría 3-4 veces/día el potrero. Los corderos fueron asignados a dos grupos experimentales homogéneos de acuerdo al día de nacidos y el peso al nacer: 1) corderos criados artificialmente (grupo CA, n=14) los cuales fueron separados de las madres a las 24-36 horas después de nacidos; 2) corderos criados por su madre (grupo CM, n=13) los cuales permanecieron con la misma hasta los 75 días de vida.

Los corderos criados artificialmente succionaban la leche de las madres u ordeñada de otras ovejas a través de tetinas artificiales. La cantidad de leche se ajustó para mantener un peso corporal similar al de los corderos CM. Durante los primeros 7 días de vida se les suministró 0,5-0,7 L dividido en 6 tomas diarias, a las 8:00 h, 10:00 h, 12:00 h, 14:00 h, 16:00 h y 19:00 h. Desde el día 8 al 15 se les dio 0,8-1 L dividido en 4 tomas diarias a las 8:00 h, 12:00 h, 16:00 h y 19:00 h. Desde el día 16 hasta el día de destete se les suministró 3 tomas diarias 8:00 h, 12:00 h y 19:00 h. A partir del día 16 hasta el día 30 se les suministró 1,0-1,3 L, y desde el día 31 hasta el día 75, se les dio 1,4-1,6 L. Durante la alimentación los corderos CA tenían solo el mínimo contacto necesario con los seres humanos, como se puede observar en la siguiente imagen.



Durante los primeros 15 días de vida, todos los corderos se alojaron en dos corrales cerrados durante la noche, con una temperatura ambiental de 20 a 23°C. A partir de los 15 días, los dos grupos se manejaron en diferentes potreros de 25x50 m cada uno. Los corderos tenían libre acceso a sombra artificial hecha con una tela de sombra con el apoyo de un cuadrante de hierro (área=4,5m², altura=0,8m) y un pedazo de madera (0,2m de alto x 0,2m de ancho x 2m de largo), que se colocó en el potrero de los corderos que podían usarlo para jugar. Para reducir las diferencias

en las relaciones sociales que podrían resultar en diferencias en el proceso de aprendizaje, se alojaron 4 ovejas adultas que tenían corderos de edad similar a los corderos experimentales con los corderos CA. Todos los corderos recibieron ración sólida desde el día 20 de nacidos, pastoreando sobre pasturas mejoradas y tuvieron libre acceso al agua, como se puede observar en la siguiente imagen.



El destete se realizó cuando los corderos tenían en promedio 75 días de vida (entre 69 y 81 días de edad). Las madres de los corderos CM y las 4 ovejas con corderos alojadas en el potrero de los corderos CA fueron trasladadas a otro potrero donde no tenían contacto visual ni acústico con los corderos en experimentación. En ese mismo momento los corderos CA dejaron de recibir la leche materna.

Análisis previo al desafío

Se obtuvieron muestras de sangre para determinar las concentraciones basales de testosterona sérica en las semanas 35, 37, 38 y 39 de edad de los carneros de forma de contar con las concentraciones basales previas al experimento del desafío con GnRH, como se pueden observar en la siguiente imagen.

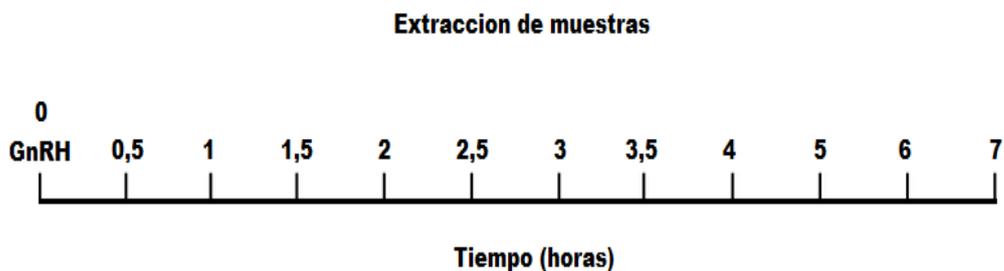


Desafío con GnRH

Se administró acetato de buserelina (análogo sintético de GnRH, Receptal, Intervet international GmbH, Alemania) a cada carnero por vía intravenosa en la semana 40 de vida. Se realizaron dos pruebas utilizando dos dosis de buserelina: 4,2 µg (dosis baja) por carnero [CA (n=7) y CM (n=6)], y 8,4 µg (dosis alta) [CA (n=7) y CM (n=7)]. Las dosis bajas y altas de GnRH propuestas en el estudio, han sido utilizadas en varios trabajos realizados en ovinos (Khan et al., 2006, 2007; Mirzaei et al., 2011).

Muestras de sangre y determinación de testosterona

Se analizaron las concentraciones basales de testosterona extraídas las semanas previas al desafío con GnRH (semanas 35, 37, 38 y 39) juntas con las obtenidas del desafío (semana 40) las cuales se extrajeron inmediatamente antes (tiempo 0) de la administración de Buserelina, y luego de la misma cada 30 min durante las primeras 4 horas. Posteriormente se tomaron una muestra de sangre cada una hora por tres horas más. El tipo de muestreo se debe al perfil de esta hormona en sangre luego de la administración exógena de GnRH (Wilson y Lapwood, 1978).



Luego de extraer las muestras, se las centrifugó y se obtuvo el suero para determinar las concentraciones séricas de testosterona por RIA, utilizando un kit comercial de fase sólida (TKPG, Count-A-Count, Siemens, Los Ángeles, CA, EEUU). El coeficiente de variación intra-ensayo fue 2,6 % y el coeficiente de variación inter-ensayo fue 5,6 % y la sensibilidad fue de 0,1388 mmol/L.

Análisis estadísticos

Las concentraciones séricas de testosterona en las semanas previas al desafío con GnRH y luego del desafío con GnRH, fueron comparadas entre ambos grupos por ANOVA para medidas repetidas, donde se incluyó el efecto del grupo (CA vs CM), del tiempo y la interacción entre ambos.

RESULTADOS

Concentraciones séricas de testosterona basales al final de la estación reproductiva

No hubo diferencias significativas en la concentración sérica de testosterona entre las semanas 35, 37 y 38, pero sí hubo una diferencia significativa ($p < 0,001$) entre estas semanas con respecto a la semana 39 (Figura 1). No hubo efecto grupo ni interacción entre grupo y tiempo en la concentración de testosterona.

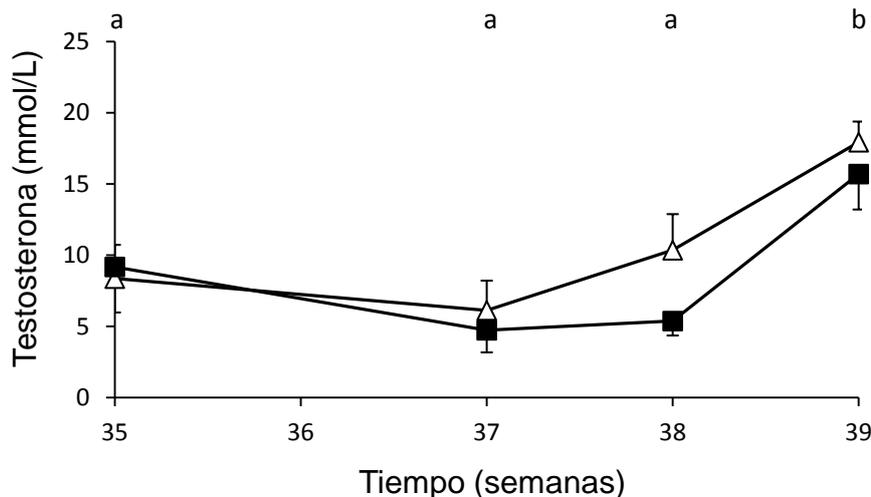


Figura 1. Concentración basal de testosterona (mmol/L) a diferentes semanas de edad de los corderos criados artificialmente (CA: -Δ-) y criados con sus madres (CM: -■-) al final de la estación reproductiva. Diferentes letras entre semanas difieren $p < 0,05$.

Desafío con GnRH

Dosis baja

No hubo efecto grupo, pero sí efecto tiempo ($p < 0,001$) y una interacción entre grupo y tiempo ($p = 0,009$) en los cambios de concentración sérica de testosterona luego de la administración de GnRH, como se puede observar en la Figura 2. El incremento en la concentración de testosterona se evidenció a la hora de administrada la GnRH ($p < 0,001$), y su pico máximo fue a las 3,5 horas ($p < 0,001$), llegando por debajo de los valores iniciales a la 7 horas ($p < 0,001$). Los corderos CA presentaron un mayor incremento proporcional de testosterona a las 3,5 horas ($p = 0,032$) y 4 horas ($p = 0,039$) que el grupo CM. Mientras que en las horas: 1,5, 2, 2,5, 3 y 5 los CA tendieron ($0,05 > p < 0,1$) a presentar mayor incremento proporcional de testosterona que los CM. A su vez, los corderos CA tuvieron un incremento más rápido en la concentración de testosterona, presentando cambios significativos desde los 30 min ($p = 0,015$), mientras que los corderos CM permanecieron sin diferencias significativas durante todo el desafío.

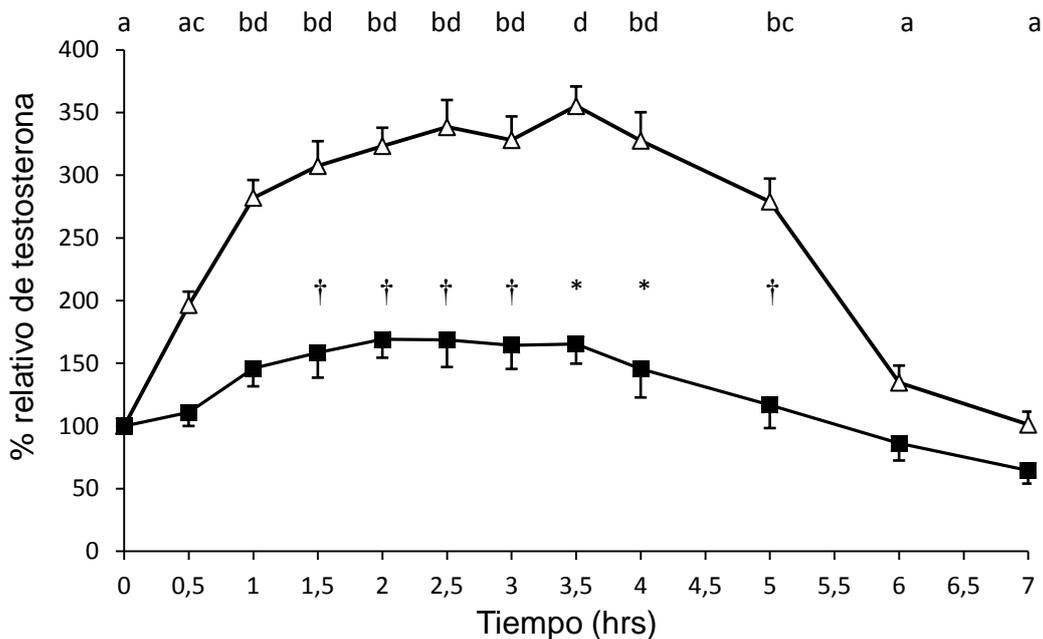


Figura 2. Porcentaje relativo de testosterona (%) correspondiente a cada grupo CA (- Δ -) vs CM (- \blacksquare -) en el tiempo (horas) luego de la inyección de 4,2 μ g buserelina (dosis baja). Diferentes letras entre tiempos difieren $p < 0,05$. * entre grupos en el mismo tiempo indican diferencias significativas ($p < 0,05$). † entre grupos en el mismo tiempo indican tendencia $0,05 > p < 0,1$.

Dosis alta

Hubo un efecto tiempo ($p < 0,001$), pero no hubo efecto grupo ($p = 0,38$) ni interacción entre grupo y tiempo ($p = 0,71$) en los cambios de concentración sérica de testosterona luego de la administración de GnRH. La concentración de testosterona alcanzó su mayor porcentaje promedio en la hora 2 ($p < 0,001$) para luego descender sin llegar a alcanzar los valores basales a la hora 7 ($p < 0,001$) (Figura 3).

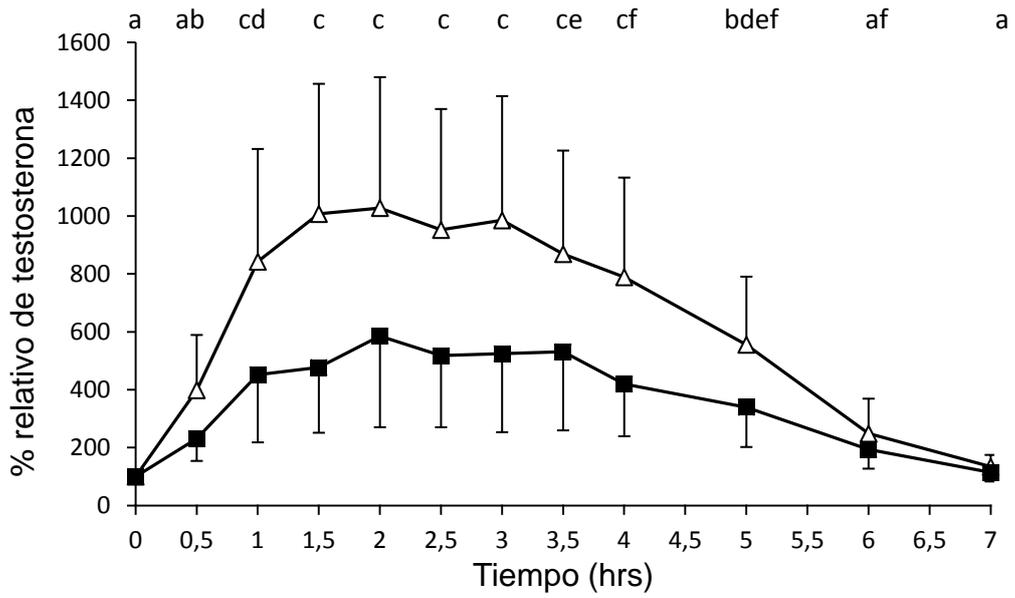


Figura 3. Porcentaje relativo de testosterona (%) correspondiente a cada grupo CA (Δ -) vs CM (\blacksquare -) en el correr del tiempo en horas luego de la inyección de 8,4 μ g buserelina (dosis alta). Diferentes letras entre tiempos difieren $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

En este trabajo se demostró que la respuesta del eje hipofisario-gonadal al desafío con GnRH y la consecuente liberación de testosterona fueron afectados diferencialmente de acuerdo a la presencia y vínculo que tuvieron los corderos criados por su madre durante la etapa de lactancia. En contraposición a la hipótesis planteada en este trabajo, se encontró que los corderos CA tuvieron una respuesta mayor y más rápida al desafío con GnRH a dosis menor que los CM. Esta diferencia nos hace especular sobre alteraciones en los diferentes niveles de acción de las hormonas, las cuales podrían estar a nivel de la hipófisis (diferencias en la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH y la capacidad de respuesta de la hipófisis secretando LH), a nivel testicular (ya sea en la sensibilidad de las células de Leydig a la LH o en la capacidad esteroidogénica de las células de Leydig), o diferencias en más de uno de estos mecanismos. Como solamente se evaluó la concentración sérica de testosterona, es imposible determinar con exactitud si las diferencias entre grupos al desafío con GnRH se encuentran a nivel hipofisario, testicular, o ambos. La posibilidad de conocer los cambios en las concentraciones séricas de LH luego del desafío con GnRH nos permitiría confirmar o descartar si la hipófisis se encuentra involucrada, pero no existe disponible en nuestro país un kit comercial que nos permita medir las concentraciones de LH.

Es importante destacar que no se encontró diferencia de grupo en las concentraciones séricas de testosterona luego del desafío con GnRH a la dosis mayor. Esto puede estar dado por una alta descarga de LH que provocó un gran aumento de testosterona en ambos grupos y posiblemente no haya permitido determinar diferencias entre grupos. Es decir, que ambos grupos de corderos (CA y CM) presentaron capacidad potencial de respuesta máxima similar de secreción de testosterona frente al desafío con GnRH.

Las diferencias encontradas entre los CA y CM frente al desafío con GnRH pueden ser parcialmente explicadas por cambios a nivel cerebral durante el desarrollo de los corderos. Se conoce que la separación de la cría de su madre provoca alteraciones hormonales a nivel cerebral. Neumann (2009) encontró diferencias en la vasopresina, serotonina y oxitocina entre ratas que fueron separadas de sus madres a las 2 semanas de vida con ratas que permanecieron con las mismas, demostrando cambios comportamentales en la rata adulta, resultando en ratas más agresivas y con una menor actitud maternal. Por otro lado, a nivel reproductivo no hay estudios hasta el momento que fundamentalmente de manera directa diferencias entre aquellos que permanecieron con sus madres de aquellos que no permanecieron. Por otro lado, Nishi et al. (2012) establece que la separación maternal genera un estrés que puede afectar a nivel cerebral al eje hipotálamo-hipófiso-adrenocortical con la consecuente secreción de corticosterona, la que tendría un efecto de depresión y alteración de la actividad de los correspondientes sistemas fisiológicos en la etapa adulta. En este sentido, es conocido que el estrés produce una inhibición a nivel central que afecta la funcionalidad reproductiva. Rosen et al. (1988), afirman que los glucocorticoides inhiben la respuesta a la GnRH, repercutiendo de esta forma la posterior secreción de LH.

A su vez, como fue comentado anteriormente, no debe ser descartada una alteración a nivel testicular provocada por la forma de la crianza. Si bien no se encuentran estudios sobre cómo la separación madre-cría pueda afectar directamente a nivel testicular, sí se puede adjudicar a que los corderos que fueron criados en forma diferente, con o sin sus madres, son más o menos susceptibles al estrés a lo largo del desarrollo. Como ya se sabe (Ge et al. 1997, Hu et al. 2008) el estrés (a través de los glucocorticoides) es capaz de inhibir la actividad esteroidogénica de las células de Leydig, disminuyendo la secreción de testosterona. Si bien no se obtuvieron los valores de cortisol séricos, no se debe descartar una posible acción del estrés producto de la separación materna que pueda estar alterando tanto a nivel cerebral como a nivel testicular la funcionalidad reproductiva.

En este trabajo no se encontraron diferencias significativas en los valores basales de testosterona, pero la diferencia se observó cuando se lo sometió a una estimulación exógena. El hecho de no haber encontrado diferencias significativas en las concentraciones séricas de testosterona basales entre grupos, nos permite sugerir que ambos grupos se comportaron en forma similar frente a los mismos estímulos ambientales naturales y en los momentos finales de la estación reproductiva, cuando la actividad reproductiva está disminuyendo. Sin embargo, cuando a estos mismos animales se los sometió en forma artificial a un marcado estímulo con un análogo de GnRH, ambos grupos respondieron diferente. Esta mayor sensibilidad al desafío con GnRH en los corderos CA podría estar asociado con una mayor sensibilidad de respuesta ya sea a nivel hipofisario y/o a nivel testicular, como fue mencionado antes. Esto también podría deberse a diferencias en la cantidad y el tiempo en las respectivas tomas de sangre. A diferencia de las muestras de sangre que se obtuvieron para conocer las concentraciones basales de testosterona, en las cuales se puncionó la yugular una sola vez en las respectivas semanas, frente al desafío con GnRH los mismos animales fueron sujetos y puncionados 12 veces durante 7 horas. Por tanto, es posible que parte de las diferencias encontradas entre grupos en las concentraciones de testosterona puedan deberse a una diferencia en la respuesta del estrés del manejo. En un estudio realizado en ratas (Lui et al. 1997) se observó que aquellas ratas que tuvieron un bajo nivel de lamido ano-genital durante la cría, cuando se los sometió a un estresor en la etapa adulta, respondieron con mayor producción de ACTH (hormona adenocorticotropa) y cortisol que aquellos que tuvieron un alto nivel de lamidos ano-genital. Por lo tanto, es posible especular con que animales que fueron criados con o sin sus madres durante la lactancia, puedan tener una sensibilidad diferente frente a situaciones estresantes durante la etapa adulta. Si bien el contacto con los humanos fue mínimo en el grupo CA durante la cría, no se puede descartar el efecto que pueden generar las personas sobre los corderos (ambos grupos) en los diferentes manejos experimentales.

CONCLUSIÓN

En conclusión, los corderos que fueron CA presentaron una mayor respuesta al desafío con una dosis baja GnRH (determinada por porcentaje relativo de testosterona) que aquellos CM, pero no presentaron diferencias al desafío con una dosis alta. Al final de la estación reproductiva no se encontraron diferencias en las concentraciones basales de testosterona entre ambos grupos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alexander G. (1977). Role of auditory and visual cues in mutual recognition between ewes and lambs in Merino sheep. *Applied Animal Ethology*, 3:65-81.
2. Almeida S.A., Petenusci S.O., Franci J.A., Rosa e Silva A.A., Carbalho T.L., (2000a). Chronic immobilization-induced stress increases plasma testosterone and delays testicular maturation in pubertal rats, *Andrologia* 32:7–11.
3. Almeida S.A., Kempinas W.G., Lamano Carvalho T.L., (2000b). Sexual behavior and fertility of male rats submitted to prolonged immobilization-induced stress. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33:1105–1109.
4. Amann R.P., Schanbacher B.D. (1983). Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science*, 57:380-403.
5. Arias A. A., Capellari A., Revidatti M. A., Slobodzian A. (1998). Diferencias en la ganancia de peso atribuibles al destete precoz en terneros cruza en el NO de Corrientes. *Revista Argentina Producción Animal*, 18: 240.
6. Barenton B., Hochereau-de Reviers M. T., Perreau C., Saumande J. (1983). Changes in testicular gonadotropin receptors and steroid content through postnatal development until puberty in the lamb. *Endocrinology*, 112:1447-1453.
7. Bielli A. (2002). Fisiología reproductiva en el macho. En: Ungerfeld R. *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea. v. 1, p. 81-94.
8. Birke L., Sadler D. (1987). Differences in maternal behavior of rats and the sociosexual development of the offspring. *Developmental Psychobiology*, 20: 85-99.
9. Blanc M.R., Hochereau-de Reviers M.T., Cahoreau C., Courrot M., Dacheux. J.C. (1981). Inhibin: effects on gonadotropin secretion and testis function in ram and rat. En: Franchimont P., Channing C.P.(Ed.). *Intragonadal regulation of reproduction*. New York, Academic Press, 299 p.
10. Cameron A. W., Murphy P. M., Oldham C. M. (1988). Nutrition of rams and output of spermatozoa. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*, 17:162-165.
11. Castrillejo A. (1987). Enfermedades de los órganos genitales de los carneros. En: Bonino Morlán J., Duran del Campo A., Mari J.J. *Enfermedades de los lanares*. Montevideo, Hemisferio Sur. v 3, p.1-47.
12. Colas G., Brice G. (1976). Seasonal variations of the fertilizing capacity of deep-frozen ram semen. *Proceedings 8th Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination*. Crakow, Poland, p. 977-980.

13. Collu R., Gibb W., Ducharme G.R., (1984). Role of catecholamines in the inhibitory effect of immobilization stress on testosterone secretion in rats. *Biology of Reproduction*, 30:416–422.
14. Cotta Y., Terqui M., Pelletier J., Courrot M. (1975). Testosterone et LH plasmatiques chez l'agneau de la naissance a la puberte. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences*, 280:1473-1476.
15. Courrot M. (1962). Développement du testicule chez l'agneau. Etablissement de la spermatogenèse. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 2:25-42.
16. Courrot M., de Reviere M.M., Pelletier J., (1975). Variations in pituitary and blood LH during puberty in the male lamb. Relation to time of birth. *Annals of Biologie Animal, Biochimie, Biophysique*, 15:509-516.
17. Dacheux J. L., Pisselet C., Blanc M. R., Hochereau-de-Reviere M. T., Courrot M. (1981). Seasonal variations in rete testis fluid secretion and sperm production in different breeds of ram. *Journal of Reproduction and Fertility*, 61:363-371.
18. Damián J.P., Ungerfeld R. (2011). The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: Hormonal, Physiological, Biochemical, Haematological and Behavioural Parameters. *Reproduction in Domestic Animals* 46:646-650.
19. Dun R.B. (1955). Puberty in Merino rams. *Australian Veterinary Journal*, 31:104-106.
20. Dun R.B. (1956). Temporary infertility of rams associated with flooding. *Australian Veterinary Journal*, 32:1-3.
21. Dyrmondsson O.R. (1973). Puberty and early reproductive performance in sheep rams lambs. *Animal Breeding Abstracts*, 41:419-430.
22. Ewing L. L., Brown B.L. (1977). Testicular steroidogenesis. En: Johnson A.D., Gomes W.R. (Ed.). *The Testis*. New York, Academic Press. v. 4. p 239.
23. Fiser P. S., Fairfull R. W. (1983). Effects of changes in photoperiod on freezability of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 20:684-689.
24. Foster D. L., Cruz T. A., Jackson G. L., Cook B., Nalbandov A. V. (1972a). Regulation of luteinizing hormone in the fetal and neonatal lamb 3. Release of LH by the pituitary in vivo in response to crude ovine hypothalamic extract of purified porcine gonadotrophin releasing factor. *Endocrinology*, 90:673-683.
25. Foster D. L., Roach J. F., Karsch F. J., Norton H. W., Cook B., Nalbandov A. V. (1972b). Regulation of luteinizing hormone in the fetal and neonatal lamb 1. LH concentrations in blood and pituitary. *Endocrinology*, 90:102-111.

26. Foster D. L., Mickelson I. H., Ryan K. D., Coon G. A., Drongowski R. A., Holt J. A. (1978). Ontogeny of pulsatile luteinizing hormone and testosterone secretion in male lambs. *Endocrinology*, 102:1137-1146.
27. Foster D. L., Olster D. H. (1985). Effect of restricted nutrition on puberty in the lamb: patterns of tonic luteinizing hormone (LH) secretion and competency of the LH surge system. *Endocrinology*, 116:375-381.
28. Foster D. L., Olster D. H., Yellon S. M. (1985). Neuroendocrine regulation of puberty by nutrition and photoperiod. En: Venturoli S., Flamigni C., Gioens J. Adolescence in females. Chicago, Year Book Medical. p. 1-21.
29. Ge R.S., Gao H.B., Nacharaju V.L., Gunsalus G.L., Hardy M.P. (1997). Identification of a kinetically distinct activity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. *Endocrinology*, 138:2435-2442.
30. Gunn R. G. (1983). The influence of nutrition on the reproductive performance of ewes. En: W. Haresign, Sheep production. London, Butterworths. p. 99-110.
31. Haresign W. (1984). Underfeeding and reproduction: Physiological mechanisms. *Reproduction des ruminants en zone tropicale*. INRA Publication, 20:339-365.
32. Hu G.X., Lian Q.Q., Lin H., Latif S.A., Morris D.J., Hardy M.P., Dea R.S. (2008). Rapid mechanisms of glucocorticoid signaling in the Leydig cell. *Steroids*, 73:1018–1024.
33. Hsu Y., Serpell J. (2003). Development and validation of a questionnaire for measuring behavior and temperament traits in pet dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223:1293-1300.
34. Ito A., Kikusui T., Takeuchi Y., Mori Y. (2006). Effects of early weaning on anxiety and autonomic responses to stress in rats. *Behavioural Brain Research*, 171:87-93.
35. Johnson E., Kamilaris T., Chrousos G., Gold P., (1992). Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 16:115–130.
36. Kanari K., Kikusui T., Takeuchi Y., Mori Y. (2005). Dimensional structure of anxiety-related behavior in early-weaned rats. *Behavioural Brain Research*, 56:45-52.
37. Kendrick K.M., Hinton M.R., Atkins K. (1998). Mothers determine sexual preferences. *Nature Magazine*, 395:229-230.
38. Keverne E.B. (1979). Sexual and aggressive behavior in social groups of talapoin monkeys. *Ciba Foundation Symposium*, New York, 63:271–286.

39. Khan T.H., Beck N.F.G., Mann G.E., Khalid M. (2006). Effect of post-mating GnRH analogue (buserelin) treatment on PGF_{2α} release in ewes and ewe lambs. *Animal Reproduction Science*, 95:107-115.
40. Khan T.H., Beck N.F.G., Khalid M. (2007). The effects of GnRH analogue (buserelin) or hCG (Chorulon) on Day 12 of pregnancy on ovarian function, plasma hormone concentrations, conceptus growth and placentation in ewes and ewe lambs. *Animal Reproduction Science*, 102:247-257.
41. Kikusui T., Takeuchi Y., Mori Y. (2004). Early weaning induces anxiety and aggression in mice. *Physiology & Behavior*, 81:37-42.
42. Kikusui T., Nakamura K., Kakuma Y., Yuji M. (2006). Early weaning augments neuroendocrine stress responses in mice. *Behavioural Brain Research*, 175:96-103.
43. Kikusui T., Ichikawa S., Mori Y. (2009). Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. *Psychoneuroendocrinology*, 34:762-772.
44. Lafortune E., Blanc M. R., Pelletier J., Perreau C., Terqui M., Hochereau-de Reviers M. T. (1984). Variations in the plasma levels of gonadotrophin and testosterone and in Leydig and Sertoli cell populations between birth and adulthood in Romanov lambs born in spring or autumn. *Reproduction Nutrition Development*, 24:937-946.
45. Lee V. W., Cumming I. A., De Kretser D. M., Findlay J. K., Hudson B., Keogh E. J. (1976). Regulation of gonadotrophin secretion in rams from birth to sexual maturity. *Journal of Reproduction and Fertility*, 46:1-6.
46. Leibbrandt V., Ewan R., Speer V., Zimmerman D. (1975) Effect of weaning and age at weaning on baby pig performance. *Journal of Animal Science*, 40:1077-1080.
47. Levasseur M. C., Thibault C. (1980). De la puberté à la sénescence; la fécondité chez l'homme et les autres mammifères. Paris, Masson, 117 p.
48. Lévy F., Keller M. (2008). Neurobiology of Maternal Behavior in Sheep. *Advances in the Study of Behavior*, 38:399-437.
49. Lincoln G. A., Peet M. J., Cunningham R. A. (1977). Seasonal and circadian changes in the episodic release of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in rams exposed to artificial photoperiods. *Journal of Endocrinology*, 72:337-349.
50. Lincoln G.A., Short R.V. (1980). Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Recent Progress in Hormonal Research*, 36:1-43.
51. Liu D., Tannenbaum B., Caldji C., Francis D., Freedman A., Sharma S., Pearson D., Plotsky P.M., Meaney M.J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid

- receptor gene expression and hypothalamic–pituitary–adrenal responses to stress. *Science* 277:1659-1662.
52. Mann T., Rowson L. E., Short R. V., Skinner J. D. (1967). The relationship between nutrition and androgenic activity in pubescent twin calves, and the effect of orchitis. *Journal of Endocrinology*, 38:455-468.
 53. McGlone J.J., Curtis S.E. (1985). Behavior and performance of weanling pigs in pens equipped with hide areas. *Journal of Animal Science* 60:20–24.
 54. Mirzaei A., Mohebbi-Fani M., Nazifi S., Aghamiri M. (2011). Effect of GnRH administration, combined with the ram effect, on the occurrence of ovulation and pregnancy during the transition period from anoestrus in crossbred ewes. *Small Ruminant Research*, 100:59-62.
 55. Mogi K., Nagasawa M., Kikusui T. (2011) Developmental consequences and biological significance of mother–infant bonding. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35:1232-1241.
 56. Monet-Kuntz C., Hochereau-de Reviers M. T., Terqui M. (1984). Variations in testicular androgen receptors and histology of the lamb testis from birth to puberty. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70:203-210.
 57. Moore C. (1984). Maternal contributions to the development of masculine sexual behavior in laboratory rats. *Developmental Psychobiology*, 17:347-356.
 58. Morgan P.D., Arnold G.W. (1974). Behavioural relationships between merino ewes and lambs during the four weeks after birth. *Animal Production*, 19:169-176.
 59. Moule G.R. (1970). Australian research into reproduction in the ram. *Animal Breeding Abstracts* 38:185-202.
 60. Neumann I.D. (2009). The advantage of social living: Brain neuropeptides mediate the beneficial consequences of sex and motherhood. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30:483–496.
 61. Nishi M., Horii-Hayashi N., Sasagawa T., Matsunaga W. (2012). Effects of early lifestress on brain activity: Implications from maternal separation model in rodents. *General and Comparative Endocrinology*, 181:306-309.
 62. Novakova V. (1975). Maternal behavior in normally and prematurely weaned female laboratory rats. *Physiologia Bohemoslovaca*, 24:73–74.
 63. Ortavant R. (1958). Le cycle spermatogénétique chez le bélier. Thesis Science Nat. University Paris. 127 p.
 64. Pelletier J., Blanc M., Daveau A., Garnier D. H., Ortavant R., de Reviers M. M., Terqui M. (1981). Mechanism of light action in the ram: a photosensitive phase for LH, FSH, testosterone and testis weight? En: Ortavant R., Pelletier J., Ravault

- J.P. Photoperiodism and Reproduction in Vertebrates. Colloques de l'INRA 6:117-134.
65. Poindron P., Le Neindre P. (1980). Endocrine and sensory regulation of maternal behaviour in the ewe. *Advances in the Study of Behavior*, 11;76-119.
 66. Rathore A. K. (1970). Fertility of rams heated for 1, 2, 3, and 4 days, mated to superovulated ewes. *Australian Journal of Agricultural Economics*, 21:355-358.
 67. Ravault J. P., Ortavant R. (1977). Light control of prolactin secretion in sheep. Evidence for a photoinducible phase during a diurnal rhythm. *Annals de Biologie Animal, Biochimie, Biophysique* 17:459-473.
 68. Ritzen E. M., Hansson V., French F.S. (1981). The Sertoli cell. En: Burger H., de Kretser H. (Ed). *The Testis*. New York, Raven Press. p 171.
 69. Rosen H., Jameel M.L., Barkan A.L. (1988). Dexamethasone suppresses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion and has direct pituitary effects in male rats: differential regulation of GnRH receptor and gonadotropin responses to GnRH. *Endocrinology*, 122: 2873-2880.
 70. Rutter B., Russo A. (2006). Bases para la evaluación de la aptitud reproductiva del toro. Buenos Aires, Agroveter. 270 p.
 71. Sapolsky R., Krey L.C., McEwen B.S. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging: The glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocrine Reviews*, 7: 622–629.
 72. Savoie S., Forest M. G., Bourel B., Saez J. M., Collu R., Bertrand J., Ducharme J. R. (1979). Perinatal activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the lamb. I. Circulating levels of LH, FSH, prolactin and testosterone and in vivo response to hCG in the first two months of life. *Biology of Reproduction*, 21:1051-1056.
 73. Savoie S., Bourel B., Hamel R., Buithieu M., Jequier J. C., Bertrand J., Ducharme J. R. (2008). Circulating LH, FSH, Prolactin, Testosterone, 4-Androstenedione, Dehydroepiandrosterone Sulfate and Cortisol Levels in the Fetus in Late Gestation and in Newborn Male and Female Lambs. *Hormone Research in Pediatrics*, 15:122-132.
 74. Schanbacher B. D. (1982). Responses of ram lambs to active immunization against testosterone and luteinizing hormone-releasing hormone. *American Journal of Physiology*, 242:201-205.
 75. Skinner J. D., Rowson L. E. (1968). Puberty in Suffolk and cross-bred rams. *Journal of Reproduction and Fertility*, 16:479-488.
 76. Slabbert J., Rasa O. (1993). The effect of early separation from the mother on pups in bonding to humans and pup health. *Journal of the South African Veterinary Association*, 64:4-8.

77. Steinberger A. (1981a). The Sertoli cell and its role in spermatogenesis. En: Frajese G., Hafez E.S., Conti C., Fabbrini A. (Ed.). *Oligozoospermia: Recent Progress in Andrology*. New York, Raven Press, p 35.
78. Steinberger A. (1981b). Regulation of inhibin secretion in the testis. En: Franchimont P., Channing C.P. (Ed). *Intragonadal Regulation of Reproduction*. New York, Academic Press, p 283.
79. Tilbrook A.J., Clarke I.J. (2001). Negative Feedback Regulation of the Secretion and Actions of Gonadotropin-Releasing Hormone in Males. *Biology of Reproduction*, 64:735-742.
80. Thimonier J., Pelletier J., Land R.B., (1972). The concentration of plasma LH in male and female lambs of high and low prolificacy breed types. *Journal of Reproductive and Fertility*, 31:498-499.
81. Ungerfeld R. (2002). *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea, v. 1, 291 p.
82. Uthlaut V. A., Moss G. E., Stobart R. H., Larson B. A., Alexander B. M. (2011). Sexual performance and production traits in white-faced yearling rams. *Small Ruminant Research*, 100:63-66.
83. Walton J. S., Evins J. D., Hillard M. A., Waites G. M. (1980). Follicle-stimulating hormone release in hemicastrated prepubertal rams and its relationship to testicular development. *Journal of Endocrinology*, 84:141-152.
84. Wiggins E., Terrill C.E. (1952) Variations in penis development in rams lambs. *Journal of Animal Science* 12:524-535.
85. Wilson P.R., Lapwood K.R. (1978). Pituitary and gonadal secretory responses of rams following intravenous infusion or injection of graded doses of GnRH. *Theriogenology*, 9:417-428.
86. Zirkin B. R., Ewing L.L., Kromann N., Cochran R.C. (1980). Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology*, 106:1867.