



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

PRESENCIA CRÓNICA DE HEMBRAS Y TESTOSTERONA SÉRICA, FLUIDO TESTICULAR Y CARACTERÍSTICAS SEMINALES EN CANINOS MACHO DE LA RAZA BULLDOG INGLES.

Por:

Pablo VIVAS

TESIS DE GRADO presentada
como uno de los requisitos para
obtener el título de Doctor en
Ciencias Veterinarias
MODALIDAD: Ensayo experimental

MONTEVIDEO URUGUAY

2023

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

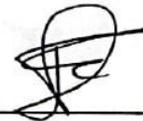
Presidente de mesa:

Dra. Julia Giriboni



Segundo miembro (tutor):

Dr. Danilo Fila



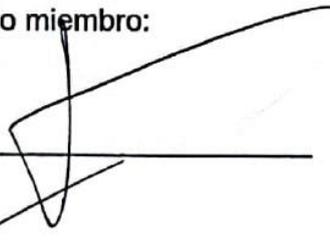
Tercer miembro:

Dra. Victoria Sorriba



Cuarto miembro:

Dr. Matías Villagrán



Fecha

Montevideo, 8 de Febrero 2023.

Autores

Pablo Vivas

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Marcos y Alicia que me dieron su cuidado, su cariño y mi educación durante toda mi vida.

A mis tres hermanos: Nicolas, Florencia y Santiago.

Al Doctor Danilo Fila por permitirme incorporarme a este proyecto y su enseñanza pedagógica.

Al Doctor Matías Villagrán, sin el cual hubiera sido imposible la redacción de este trabajo, a su paciencia y dedicación.

Al Doctor Washington Cardozo, un Jefe y excelente amigo.

Al Doctor Rodolfo Barriola, el cual estuvo al lado mío 10 años de mi vida en las buenas y en las malas.

A mis tíos, Mónica y Gabriel por su cariño y cuidado.

Y especialmente a Cecilia Menéndez, mi novia, la cual con el ejemplo, su cuidado, en las buenas y en las malas. Con su ayuda y su cariño me dieron el empujón final para terminar este proyecto.

Dedicada.

A mi abuela Ivonne, la cual desde que yo fui un niño confió plenamente en mí, me cuidó y educó con todo su amor.

A mi tío Jaime el cual fue como un segundo padre para mí.

A mi padrino Pocho.

Y a mis 2 sobrinos. Bautista y Benjamín.

TABLA DE CONTENIDO

| | Página |
|--|---------------|
| PÁGINA DE APROBACIÓN..... | 1 |
| AGRADECIMIENTOS..... | 2 |
| 1. RESUMEN..... | 5 |
| 2. SUMMARY..... | 6 |
| 3. INTRODUCCION..... | 7 |
| 3.1 Control endocrino de la reproducción en machos..... | 7 |
| 3.2 Fisiología reproductiva de la especie canina..... | 8 |
| 3.3 Evaluación reproductiva del perro..... | 8 |
| 3.4 Factores ambientales que afectan la reproducción..... | 9 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 12 |
| 5. OBJETIVO GENERAL..... | 13 |
| 6. OBJETIVOS PARTICULARES..... | 14 |
| 7. MATERIALES Y METODOS..... | 15 |
| 7.1 Instalaciones y animales utilizados..... | 15 |
| 7.2 Extracción y procesamiento de sangre | 15 |
| 7.3 Evaluación de los testículos por ultrasonografía | 16 |
| 7.4 Colección y procesamiento de semen..... | 17 |
| 7.5 Análisis estadístico..... | 17 |
| 8. RESULTADOS..... | 19 |
| 9. DISCUSIÓN..... | 22 |
| 10. CONCLUSIÓN..... | 25 |
| 11. BIBLIOGRAFIA..... | 26 |

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

| | Página |
|--|---------------|
| FIGURA 1. Imagen ilustrativa que muestra el posicionamiento del transductor para la obtención de imágenes de cortes transversales y longitudinales en el testículo del perro, utilizadas para evaluar su ecogenicidad..... | 17 |
| FIGURA 2. (a) Concentración de testosterona sérica antes y después de la extracción de semen por masturbación; (b) Cambios en la concentración de testosterona sérica entre grupos expresados en porcentaje..... | 20 |
| FIGURA 3. (a) Intensidad de pixeles en la ecografía testicular realizada antes y después de la extracción de semen por masturbación; (b) Cambios en la intensidad de pixeles en la ecografía testicular expresados en porcentajes..... | 21 |

1. RESUMEN

El objetivo de la presente Tesis fue evaluar cómo el contacto crónico con hembras modifica las características del semen y la respuesta a la exposición aguda a una hembra en celo y la eyaculación en la producción de testosterona y la ecogenicidad testicular en perros. Para ello, se utilizaron 23 perros machos adultos de la raza bulldog inglés. Doce de los machos tenían contacto permanentemente con hembras (CH), mientras que 11 machos no tenían contacto con hembras (AH). Se colectó sangre y se realizó ecografía testicular previamente a poner en contacto a los machos con la hembra en celo y 15 minutos después de la eyaculación. A partir de ello se determinó la concentración de testosterona sérica y se determinó la ecogenicidad testicular (intensidad de píxeles) de ambos testículos. A partir del semen eyaculado se realizó un espermiograma básico. La concentración de testosterona sérica aumentó en ambos grupos entre el período antes y después de la exposición a la hembra en celo y la eyaculación, y se reportaron un mayor aumento porcentual en el grupo AH que CH. La intensidad de píxeles disminuyó entre períodos en ambos grupos, y existió una mayor disminución porcentual en el grupo AH que CH. No se observaron diferencias entre los grupos y períodos en los parámetros seminales evaluados. Se concluyó que la exposición crónica de perros macho a hembras resultó en una menor respuesta endócrina y testicular al enfrentamiento a una hembra en celo y la eyaculación, pero no se asoció a cambios en las características del semen.

2. SUMMARY

The aim of this thesis was to evaluate how chronic contact with females modifies semen characteristics and the response to acute exposure to an in-estrus bitch and to the ejaculation, on testosterone production and echogenicity testicular in dogs. For this, 23 adult English bulldog male dogs were used. Twelve of them had permanent contact with females (CH), while eleven males had no contact with females (AH). Blood was collected and a testicular ultrasound was performed to males prior to contacting with an in-estrus bitch and 15 minutes after that and the ejaculation. Then, the testosterone concentration in serum and the testicular echogenicity (pixel intensity) of both testicles was determined. A basic spermogram was performed to the ejaculated semen. The testosterone concentration increased in both groups after the exposure to an in-estrus bitch and the ejaculation. A greater percentage of increase of testosterone occurred in the AI group than the CH. The intensity of pixels decreased after the exposition to an in-estrus female. There was a greater percentage of decrease in the pixels intensity in the group AI than the CH group. Seminal parameters did not differ between groups and periods evaluated. It was concluded that the chronic exposure of dog males to females resulted in a lower endocrine and testicular response to the exposition to an in-estrus female, but it was not associated to changes in semen characteristics.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Control endócrino de la reproducción en machos

El eje hipotálamo-hipófisis-gonadal es el principal encargado de regular la reproducción. El hipotálamo produce y secreta la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), un neuropéptido que actúa sobre la hipófisis. Se mencionan dos formas o tipos de secreción de esta hormona: pulsos irregulares y de baja amplitud encargados de estimular la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH); y los de alta frecuencia, que resultan en la liberación de la hormona luteinizante (LH) (Cunningham y Bradley, 2003). Diversos estudios han demostrado que el neuropéptido hipotalámico kisspeptina es el principal encargado de la regulación de la producción de GnRH y que la mayoría de las neuronas secretoras de GnRH tienen receptores para esta hormona. Por lo tanto, indirectamente la secreción de LH, FSH y testosterona también son regulados por la kisspeptina (Santos y col, 2014; Smith et al., 2014). La GnRH se secreta de forma pulsátil y llega a la adenohipófisis a través del sistema porta hipotálamo-hipofisario, donde desencadena la liberación pulsátil de la LH y FSH (Tilbrook y Clarke, 2001). La LH llega al testículo a través del torrente sanguíneo, donde actúa sobre las células de Leydig, estimulando la producción de testosterona (Stocco y McPhaul, 2006). La FSH es esencial para iniciar el proceso de espermatogénesis, promoviendo la proliferación de las espermatogonias y regulando la proliferación de las células de Sertoli (Moya, 2014). Existe un retrocontrol negativo de la testosterona sobre la liberación de GnRH, LH y FSH: al aumentar la concentración de testosterona se inhibe la producción y secreción de GnRH y LH (Jeong y Kaiser, 2006; Tilbrook y Clarke, 2001). Las altas concentraciones locales de testosterona que se encuentran en el túbulo seminífero son necesarias para que haya una adecuada espermatogénesis, especialmente para que transcurra correctamente la meiosis (Ungerfeld, 2002). La testosterona alcanza rápidamente el torrente sanguíneo, donde resulta de importancia para el desarrollo y mantenimiento de la libido, la actividad secretoria de los órganos sexuales accesorios y las características sexuales secundarias asociadas con el fenotipo masculino (Ungerfeld, 2002). Por otra parte, el deseo sexual y los comportamientos de cortejo y cópula tienen un rol esencial en la reproducción, todos los que en el macho son favorecidos por la testosterona (Garner y Hafez, 2000).

La espermatogénesis es el proceso por el que se forman y almacenan en los testículos los espermatozoides (Aguera, 2005). Las células germinales a partir de la que ocurre la espermatogénesis se denominan espermatogonias (Peterson y Aurich, 2005) y el proceso se puede dividir en tres etapas: espermatocitogénesis (el pasaje desde las espermatogonias a espermatocitos), meiosis (en la que los espermatocitos primarios pasan a espermátidas) y espermiogénesis (donde las espermátidas se transforman en espermatozoides) (Aguera, 2005; Bielli, 2001). Todo ello ocurre en los túbulos seminíferos (Aguera, 2005).

El semen es la suspensión celular líquida que contiene los espermatozoides y las secreciones de las glándulas accesorias del macho. La porción líquida se denomina plasma seminal, cumple funciones de nutrición y transporte de los espermatozoides, y posee una constitución variable entre especies, asociada entre otras cosas al número y tamaño de las glándulas accesorias presentes (Hafez y Hafez, 2000). Los constituyentes del plasma seminal proceden de los testículos, el epidídimo y las glándulas accesorias: glándulas vesiculares, próstata, glándulas bulbouretrales o de Cowper y las glándulas ampulares. La única glándula accesoria común a todos los mamíferos es la próstata y es la única presente en los perros (Hafez y Hafez, 2000).

3.2 Fisiología reproductiva de la especie canina

Las hembras alcanzan su madurez sexual entre los 6 y los 10 meses de edad, y los intervalos entre períodos reproductivos son de entre 4 y 13 meses (Garzón, 2012; Gaviria et al., 2013). La hembra alcanza las condiciones óptimas para reproducirse entre el segundo y tercer ciclo estral (Garzón, 2012). El ciclo estral de la perra consta de cuatro etapas: proestro (período de actividad folicular), estro (período durante el cual la hembra acepta la monta), diestro (período asociado con la fase luteal) y anestro (período que ocurre entre el final de la fase luteal y la siguiente fase folicular). Se considera que el anestro varía en su duración, se relaciona a factores como raza, salud de la hembra, edad, momento del año y ambiente.

En promedio se considera que la hembra inicia el proestro cada 7 meses, el cual tiene una duración aproximada de 9 días, seguido de un estro de duración de 7 a 9 días. Luego comienza el diestro con una duración aproximada de 58 días y luego el anestro con una duración promedio de 4,5 meses (Feldman y Nelson, 1991). Las hembras de cánidos silvestres, como el lobo gris, el lobo rojo el coyote y los perros salvajes como el dingo, presentan un solo ciclo estral al año por lo cual se consideran estacionales (Bouchard et al., 1991; Fila, 2018). Sin embargo, como fue mencionado anteriormente, la información sobre la estacionalidad reproductiva del perro doméstico aún no es concluyente y varía entre razas. Recientemente, Fila (2018) reportó que machos de la raza ovejero alemán poseen estacionalidad reproductiva, presentando valores máximos en sus características seminales y en la concentración de testosterona sérica en el otoño. Por otra parte, la pubertad en cánidos machos ocurre habitualmente entre los 6 a 12 meses de vida (Harrop, 1960). Esto puede variar entre otros factores, asociado a la raza: razas grandes o gigantes suelen tener una pubertad más tardía que las razas pequeñas, pudiendo llegar en las primeras hasta los 18 meses de vida. Además, la pubertad puede variar por factores genéticos y ambientales como la alimentación (Taha et al., 1981).

3.3 Evaluación reproductiva del perro

La evaluación de los órganos reproductivos del perro se realiza mediante examen clínico y se puede complementar con estudios de ultrasonografía. En la evaluación,

se debe palpar e inspeccionar el pene y prepucio, el pene debe ser móvil dentro del prepucio y se deben descartar heridas o procesos neoplásicos en la zona (Kustritz, 2014). El escroto en el perro debe contar con una cobertura pilosa, ser liso, blando, uniforme al tacto, debe movilizarse con facilidad sobre los testículos y la exploración debe ser indolora. Los testículos deben ser palpados por tamaño, forma y consistencia. Los dos testículos deben ser ovales y tener un contorno liso y regular. El epidídimo y el cordón espermático de cada testículo deben ser palpado en todo su recorrido, en busca de áreas de engrosamiento o agrandamiento. La próstata debe ser evaluada mediante tacto rectal, considerando la simetría entre los lóbulos prostáticos, su consistencia y presencia de dolor (Feldman y Nelson, 1991). Por otra parte, la ultrasonografía permite la evaluación precisa de las características del parénquima y de la arquitectura interna de las estructuras (Christensen, 2018; Gumbsch et al., 2002). La evaluación ultrasonográfica de la próstata se realiza en los planos longitudinal y transversal, a partir de lo que se evalúa el tamaño, forma, simetría, estructura capsular y eco textura del parénquima (homogéneo, heterogéneo hipoecoico o heterogéneo hiperecoico), contorno (conservado o irregular), presencia y cantidad de focos anecoicos e hiperecoicos (Atalan et al., 1999; Ruel et al., 1998). Posteriormente, debe realizarse una colecta y evaluación del semen (espermiograma). Este último es un estudio muy relevante para evaluar el estado reproductivo de un perro, lo que es de gran importancia tanto cuando se desea utilizar al macho para monta natural o inseminación artificial, como también si se desea congelar su semen. El espermiograma debe realizarse inmediatamente después de obtener la muestra. Los parámetros principales a evaluar del semen son: volumen, color, pH, motilidad, vigor, concentración espermática, porcentaje de espermatozoides vivos y porcentaje de espermatozoides normales (Corrada et al., 2014).

Las características del semen de los caninos fueron descritas por varios autores (Dahlbom et al., 1995; Feldman y Nelson 1987; Oettle, 1993). La cantidad de espermatozoides totales por eyaculado se relaciona con el peso vivo del animal. Por ejemplo, perros de menos de 15 kg presentan aproximadamente 200 millones de espermatozoides totales por eyaculado, aquellos de entre 31 y 45 kg poseen 500 millones de espermatozoides totales por eyaculado, y los perros de más de 46 kg tienen alrededor de 700 millones de espermatozoides por eyaculado. Al mismo tiempo, se considera que la calidad del semen es adecuada para su uso con fines reproductivos cuando posee al menos 60% de espermatozoides normales y más de 60% de espermatozoides motiles (Dahlbom et al., 1995).

3.4 Factores ambientales que afectan la reproducción

La reproducción es controlada por factores endógenos, sobre los que influyen factores exógenos al individuo. El control endógeno incluye mecanismos endócrinos, regulados por sistemas de retroalimentación entre hormonas, y nerviosos. Por otra parte, los factores ambientales, exógenos al individuo, son interpretados por el sistema nervioso, e influyen en la respuesta endocrina que controla la reproducción (Villagrán, 2012). Como ejemplo de ello, y siendo uno de

los fenómenos más ampliamente estudiados en diversas razas de animales, se encuentra la estacionalidad reproductiva. Varios mamíferos presentan estacionalidad reproductiva, como un mecanismo de sobrevivencia de la especie (Bronson, 1985). Durante la estacionalidad reproductiva las hembras presentan actividad cíclica (ciclos estrales) y los machos presentan su máximo potencial reproductivo y endocrino. Este periodo del año se denomina estación reproductiva, y el momento y duración de la misma varía entre especie. Las principales señales que regulan la estacionalidad reproductiva son el fotoperiodo, la disponibilidad de alimento, y la temperatura ambiental (Delgadillo et al., 2004). El momento y la duración de la estación reproductiva y de la gestación son los principales determinantes del momento de nacimiento de las crías (Karsch et al., 1984; Lincoln y Short, 1980). En general esto tendrá lugar en épocas del año donde las condiciones climáticas favorezcan la supervivencia de las crías, como por ejemplo cuando haya una buena disponibilidad de alimentos (Bronson, 1985).

En especies como ovejas, cabras y ciervos, las gestaciones tienen una duración entre 148 y 250 días. En estos casos su periodo reproductivo ocurrirá durante los días más cortos en el otoño. En especies en que la duración de la preñez es de aproximadamente un año, el periodo reproductivo ocurre entre la primavera y el verano. El equino (cuya gestación dura ~11 meses) es un ejemplo de esto último (Bustos y Torres, 2012). En felinos domésticos la estacionalidad de la hembra es marcada y ocurre durante los días que presentan más de 12 horas de luz (Urviola y Fernández, 2017). Las hembras de caninos domésticos presentan varios ciclos estrales al año. La excepción la representa la raza Basenji, la que posee un ciclo estral al año (Bouchard et al., 1991). Sin embargo, algunos autores reportaron una frecuencia heterogénea de ciclos estrales durante el año, con una mayor incidencia de estos en mayo, julio y octubre (Christiansen 1989; Fila 2013). Por lo tanto, hasta el momento no es posible describir una estacionalidad clara en diferentes razas de la especie canina, sino que parece existir una variación importante entre las razas.

Los mecanismos endógenos que controlan la actividad reproductiva interactúan con diversos factores ambientales, entre los que se encuentran los factores sociales (Martin et al., 2004). La presencia de individuos adultos del mismo sexo o del sexo opuesto afectan la reproducción, lo que ha sido estudiado especialmente en rumiantes (Ungerfeld y Bielli, 2012; Villagrán, 2012). Durante el anestro, las ovejas y cabras no presentan actividad cíclica, sin embargo, estas aumentan su secreción de LH y ovulan al exponerlas a machos. Este fenómeno estimulador se denomina “efecto macho” (Ugalde y García; 2002). Al mismo tiempo, la presencia de hembras en celo estimula la fisiología reproductiva de los machos, fenómeno conocido como “efecto hembra” (Martin et al., 2004; Ungerfeld y Silva, 2004). Este fenómeno ha sido mucho menos estudiado que el efecto macho. La exposición de carneros a ovejas en celo resultó en un aumento en la frecuencia de pulsos y la concentración basal de LH, y la concentración de testosterona sérica en carneros (González et al., 1988; Perkins, Fitzgerald y Price, 1992). Por otra parte, Ungerfeld y Fila (2011a) reportaron que carneros expuestos a hembras en celo presentaron

un aumento en la concentración sérica de testosterona y una disminución en la ecogenicidad testicular, aparentemente asociada a un aumento del fluido testicular. Además, machos caprinos y de ciervos expuestos en contacto crónico con hembras mostraron mayores concentraciones de testosterona sanguínea, mejor calidad del semen y modificaciones en la ecogenicidad testicular -aparentemente asociadas a un aumento del fluido testicular- en relación a machos alojados sin contacto con hembras (Giriboni et al., 2017; Villagrán y Ungerfeld, 2013).

Las señales que participan en la estimulación de individuos del otro sexo involucran diferentes sentidos (olfativo, visual, auditivo y táctil). En machos la estimulación sexual es mayor cuando las hembras están en estro que cuando no lo están (Harre y Lamb, 1991). Por lo tanto, la estimulación de los machos parece ser influenciado por el momento reproductivo en que se encuentre la hembra. Por otra parte, el porcentaje de hembras que ovulan luego de la exposición a un macho es mayor si existe contacto físico con este que si las hembras solo son expuestas al olor del macho. (Ramírez y Quintero; 2001). González et al., (1988) demostraron que carneros en contacto con hembras mostraron un mayor aumento en la secreción de LH que aquellos que no tuvieron contacto con hembras y solo tuvieron un estímulo olfativo y visual. Por lo tanto, tanto en hembras como en machos contacto físico parece ser de mayor importancia que la estimulación por otras vías.

Como se describió anteriormente, los efectos del contexto social sobre la reproducción han sido principalmente estudiados en pequeños rumiantes. Sin embargo, hasta el momento ha sido poco estudiado cómo el contexto socio-sexual afecta la reproducción de los machos en la especie canina. Las hembras caninas preñadas por machos con los que conviven tienen una mayor posibilidad de mantener la preñez que aquellas que conviven con uno o varios machos distintos al padre de los futuros cachorros (Bartos et al., 2016). Esto se explicaría por un fenómeno similar al efecto Bruce, en el que las hembras suspenderían una gestación en curso (mediante abortos o reabsorción temprana de los embriones) como forma de evitar el infanticidio de cachorros por parte de machos no emparentados con estos. De esta forma las hembras disminuirían la inversión energética en una progenie con pocas chances de sobrevivir (Bartos et al., 2016). Por lo tanto, este estudio demuestra como la presencia de machos puede afectar seriamente la fisiología reproductiva de las hembras en caninos. En condiciones domésticas o de criaderos los perros utilizados como reproductores pueden vivir solos o cohabitar con hembras. Sin embargo, hasta donde sabemos no existe información científica que describa el efecto de la presencia de hembras sobre la fisiología reproductiva de los machos en perros.

4. HIPÓTESIS

La exposición crónica de perros macho a hembras mejora las características seminales, así como, aumenta la concentración sérica de testosterona y el fluido testicular.

5. OBJETIVO GENERAL

Establecer el efecto del contacto crónico con hembras sobre las características reproductivas de perros adultos.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar cómo el contacto crónico con hembras modifica en perros:

- La respuesta en la concentración de testosterona sérica y la ecogenicidad testicular frente a la exposición aguda a una hembra y la eyaculación.
- Las características del semen.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo experimental fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República (Protocolo ID 111900-000759-20).

7.1 Instalaciones y animales utilizados

El estudio fue realizado entre el 10 de setiembre y el 10 de noviembre del 2011 en la Clínica Veterinaria Don Quijote, Montevideo. Se escogieron estas fechas asociado a una mayor oferta de individuos reproductores para el ensayo, ya que los criadores tienen interés en tener cachorros a fin de año. Se utilizaron 23 machos bulldog inglés, de entre 2 y 7 años de edad. Doce de estos individuos convivían con las hembras que posteriormente fueron inseminadas (grupo CH). Los restantes 11 machos vivían aislados de hembras (grupo AH), por lo que al momento de la extracción de semen tuvieron contacto por primera vez con las hembras que fueron inseminadas. Todos los machos vivían con sus propietarios, eran alimentados con ración balanceada super premium, disponían de agua *ad libitum*, poseían las vacunas al día, y habían sido desparasitados recientemente. Además, al momento del estudio todos los machos se encontraban en un período de inactividad sexual con hembras de al menos dos meses.

En nuestro diseño, los perros machos llegaban a la clínica por separado de la hembra en celo a ser inseminada. Al llegar al consultorio se les realizaba la extracción de sangre y la evaluación ecográfica de los testículos por ultrasonografía. Luego, se hacía ingresar la perra en celo para proceder a estimular al macho para coleccionar el semen. A los 15 minutos, se le repetiría la extracción de sangre y la evaluación de ecográfica. Teniendo en cuenta que no son animales exclusivamente experimentales, sino individuos incluidos en un sistema de reproducción asistida para realizar la inseminación artificial, se realizaba un máximo de dos animales en el día, uno de mañana y otro de tarde, a lo largo del periodo descripto.

7.2 Extracción y procesamiento de sangre

Se obtuvo sangre de la vena cefálica de uno de los miembros anteriores, inmediatamente antes y 15 minutos después de la extracción de semen. La sangre fue centrifugada y el suero resultante se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento para la determinación hormonal. La concentración de testosterona fue determinada en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal de Facultad de Veterinaria, mediante RIA en fase sólida, utilizando un kit comercial (Coat-A-Count TKTT, Siemens HealthcareDiagnostics Inc., CA, EEUU). Se consideraron los valores de concentración de testosterona previos y posteriores al contacto agudo con la hembra y la eyaculación, y se calculó el porcentaje de cambio entre ambos períodos.

7.3 Evaluación de los testículos por ultrasonografía

Se utilizó un ecógrafo portátil (Wed9618V, Guangdong Well Technology, Guangdong, China) con un transductor lineal de 7,5 MHz. Los preset del equipo se mantuvo constante a lo largo de todas las sesiones de ecografía (Chandolia et al., 1997). Previamente a realizar cada ecografía, se colocó gel ecográfico sobre la superficie del escroto de cada testículo. Se aplicaron orientaciones transversales y longitudinales del transductor. La observación transversal se realizó perpendicular al eje mayor del testículo, en el tercio medial del mismo. La observación longitudinal se realizó paralelo al eje mayor de los mismos, sobre su parte media (Pugh et al., 1990) (Figura 1).

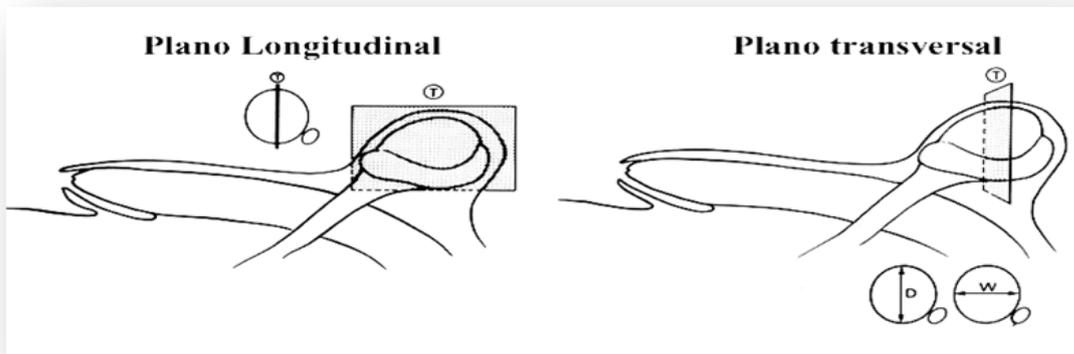


Figura 1. Imagen ilustrativa que muestra el posicionamiento del transductor para la obtención de imágenes de cortes transversales y longitudinales en el testículo del perro, utilizadas para evaluar su ecogenicidad. Ambos cortes se realizaron en la zona media del testículo y evitando el epidídimo. La (T) es la posición del transductor. Los rectángulos punteados representan planos de escaneo. Tomado de (Pugh et al., 1990).

Todas las imágenes realizadas de los testículos de los perros fueron procesadas con el software Imagen Pro Plus® (Media Cybernetics Inc, Rockville, USA), a una resolución de 640 x 480 píxeles según la metodología descrita por (Pierson y Adams, 1995) y (Chandolia et al., 1997). Cada imagen consiste en elementos denominados píxeles (Aravindakshan et al., 2000). La escala en píxeles de cada imagen individual, varía en un rango entre 0 y 255, donde el 0 corresponde al negro y 255 corresponde al blanco. La intensidad media fue determinada a partir de cuatro áreas circulares, tomadas al azar en cada una de las imágenes del parénquima del testículo (Aravindakshan et al., 2000). Estas áreas fueron seleccionadas evitando incluir al mediastino o albugínea (reconocibles por un intenso color blanco), o zonas de las ecografías que pudieran presentar "errores" o artefactos. Estas mediciones se realizaron con la finalidad de determinar la

intensidad de píxeles en las imágenes ecográficas digitalizadas (Ungerfeld y Fila, 2011b; 2012). Se consideraron los valores de ecogenicidad testicular previos y posteriores al contacto agudo con la hembra y la eyaculación, y se calculó el porcentaje de cambio entre ambos períodos.

7.4 Colección y procesamiento de semen

El procedimiento fue realizado siempre por la misma persona y de la misma forma, siempre en presencia de una perra en celo. Se obtuvo semen de cada animal mediante manipulación digital. El operario se colocó del lado izquierdo del perro, mientras este último estaba restringido en sus movimientos. Se estimuló el glande a través del prepucio por masturbación con la mano derecha. Cuando se logró una semierección, se desplazó hacia caudal el prepucio, dejando libre el bulbo del glande y manteniendo alternativamente presión constante e intermitente. Posteriormente se permitió que el perro levantara un miembro posterior para desviar el pene hacia caudal, de manera semejante a lo que ocurre en la cópula (Linde-Forsberg, 1991). Cabe aclarar que todos los reproductores estaban acostumbrados a la maniobra de recolección de semen por lo cual no existió un factor estrés individual. El semen obtenido fue colectado en un vaso plástico estéril graduado y precalentado. Se descartó la primera fracción del semen, proveniente de la próstata, para conservar y evaluar la segunda fracción, rica en espermatozoides (0,5-3 mL). Para tener la seguridad de haber colectado la totalidad de esta última fracción se colectó una pequeña parte de la tercera fracción (Dahlbom et al., 1995).

Se determinó el volumen del eyaculado utilizando un tubo graduado y el pH del mismo se determinó utilizando tiras reactivas (busco la marca), así como, el aspecto macroscópico de las distintas fracciones de cada eyaculado. Además, los parámetros subjetivos como la motilidad espermática (con un score de porcentaje) y el vigor (con un score semicuantitativo de 0 a 5, de nada a máximo de vigor respectivamente) se evaluó de inmediato en un microscopio de contraste de fase Nikon Labophot, a 200x de magnificación y a 37°C. La motilidad progresiva rectilínea a través del campo se evaluó a 400x de la misma manera, diluyendo la muestra en diluyente isoosmótico. La concentración espermática se estableció utilizando una cámara de Neubauer. Se calculó el número de espermatozoides por mL y el total de espermatozoides por eyaculado, según la técnica descrita por Silva y col. (2003). Una alícuota se diluyó con formol salino bufferado para el examen de la morfología celular. Las anomalías espermáticas se evaluaron según Bane (1983). El semen se preservó en formol salino bufferado. El porcentaje de vivos y muertos se determinó usando una coloración de eosina-nigrosina, según el método descrito por Blom, mencionado por Bane (1983).

7.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el programa R (R DevelopmentCoreTeam, 2015). Previamente a realizar el análisis se comprobaron los supuestos de

normalidad y homocedasticidad de los datos mediante la inspección visual de los residuos. Los datos de testosterona y ecografía testicular fueron analizados utilizando un modelo mixto, considerando como efectos fijos el grupo (grupos CH y AH), el tiempo (antes y después de la eyaculación). La interacción entre el grupo y el tiempo, el individuo y la edad fueron considerados como efectos aleatorios.

La edad fue considerada como efecto fijo en un modelo inicial. Al no existir efectos significativos de este factor, fue incluida como efecto aleatorio en el modelo final.

Para las mismas variables, el porcentaje de cambio entre grupos fue comparado mediante ANOVA simple. La concentración de espermatozoides, cantidad total de espermatozoides, motilidad en masa motilidad individual, porcentaje de espermatozoides vivos, y porcentaje de espermatozoides anormales fueron transformados a logaritmo previo a su análisis. Estas variables fueron comparadas entre grupos mediante ANOVA simple. El volumen, pH y vigor fueron comparadas entre grupos mediante el test de Mann-Whitney. Los resultados son expresados como media \pm EEM.

8. RESULTADOS

La concentración de testosterona sérica no difirió entre el grupo CH y el grupo AH ($257,34 \pm 9,2$; $p=0,39$) y aumentó luego de la extracción de semen ($p<0,0001$). Existió una interacción positiva entre el grupo y el momento en relación a la extracción de semen ($p=0,02$; Figura 2a). El porcentaje de aumento en la concentración de testosterona sérica expresada en porcentaje fue mayor en el AH que en grupo CH ($p=0,002$) (Figura 2b).

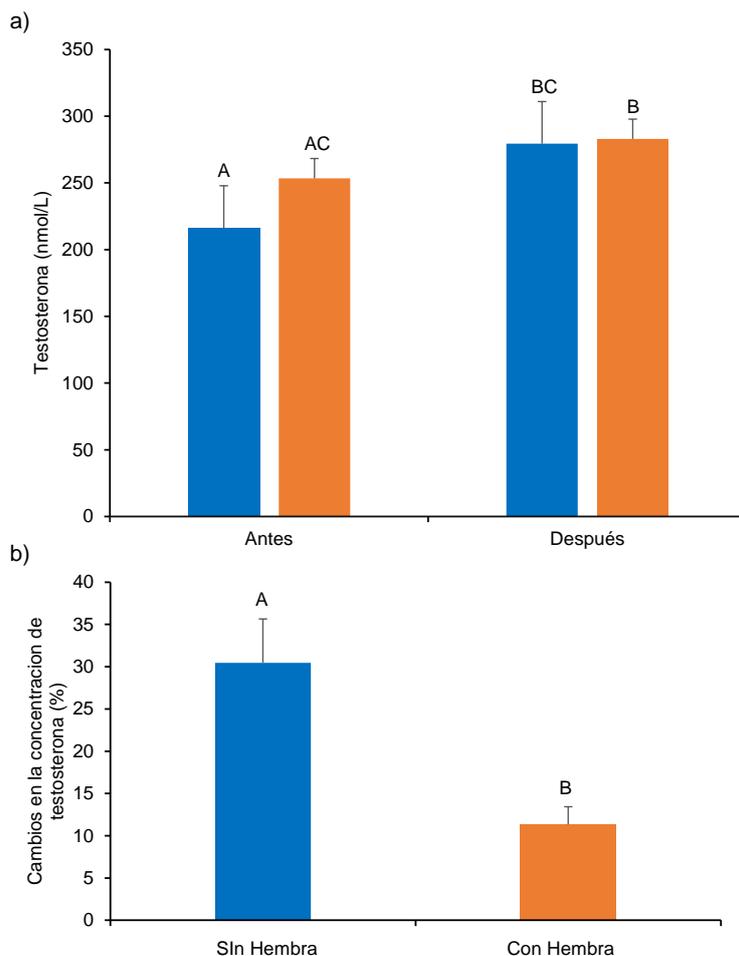


Figura 2. (a) Concentración de testosterona sérica antes y después de la extracción de semen por masturbación en caninos machos que convivían permanentemente con hembras (■) y en aquellos que vivían aislados de hembras (■) y (b) Cambios en la concentración de testosterona sérica entre grupos expresados en porcentaje. Letras diferentes indican $p \leq 0,05$.

La intensidad de píxeles en la ecografía testicular no difirió entre grupos ($152,8 \pm 2,68$; $p=0,45$) y disminuyó luego de la extracción de semen ($p<0,0001$). Existió una interacción positiva entre el grupo y el momento en relación a la extracción de semen ($p=0,008$; Figura 3a). La diferencia en la intensidad de píxeles en la ecografía testicular expresada en porcentaje fue mayor en el grupo AH que en el grupo CH ($p=0,005$) (Figura 3b).

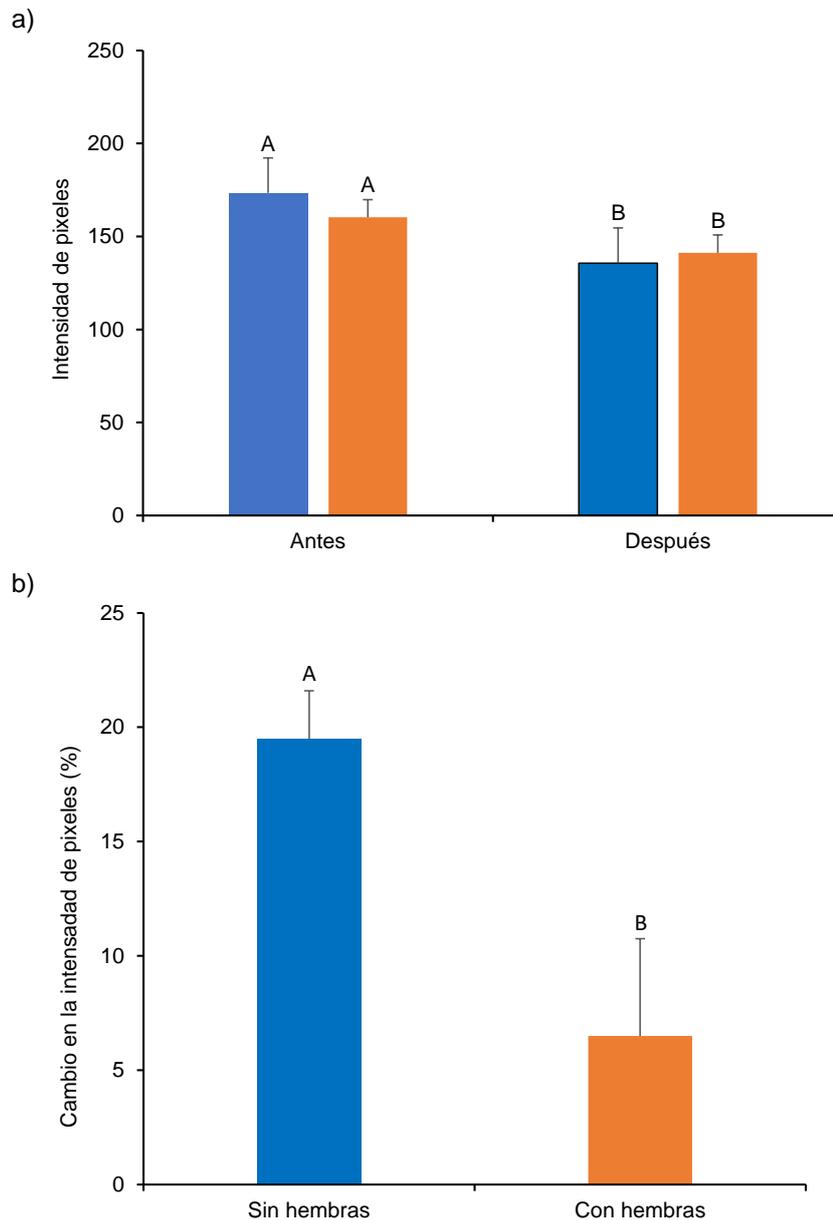


Figura 3. (a) Intensidad de píxeles en la ecografía testicular realizada antes y después de la extracción de semen por masturbación en caninos machos que convivían permanentemente con hembra (■) y en aquellos que vivan aislados de hembras (■); y (b) Cambios en la intensidad de píxeles en la ecografía testicular expresados en porcentajes. Letras diferentes indican $p \leq 0,05$.

No se observaron diferencias entre los grupos en las características de semen evaluadas: volumen eyaculado ($2,6 \pm 0,7$ mL; $p=0,29$), pH ($6,5 \pm 0,1$; $p=0,7$), motilidad espermática de masa ($83 \pm 11,4\%$; $p=0,92$), vigor ($4,1 \pm 0,6$; $p=0,9$), concentración espermática ($429,1 \pm 150,4 \times 10^3/\text{mL}$; $p=0,53$), porcentaje de espermatozoides vivos ($79,5 \pm 11,0\%$; $p=0,78$), porcentaje de espermatozoides móviles ($74 \pm 12,5\%$; $p=0,91$), porcentaje de espermatozoides anormales ($17,7 \pm 8,5\%$; $p=0,73$), y cantidad total de espermatozoides ($1105,6 \pm 419,1 \times 10^3$; $p=0,98$).

9. DISCUSIÓN

En la presente Tesis se comprobó la hipótesis de que la exposición crónica de machos a hembras en celo afecta el estado reproductivo de caninos macho. La presencia de las hembras involucró estímulos crónicos y agudos sobre los machos. Sólo los perros que convivían con hembras estuvieron expuestos a la estimulación crónica, mientras que ambos grupos fueron expuestos en forma aguda a una hembra en celo. La exposición aguda a una hembra en celo y la eyaculación resultaron en un aumento en la concentración de testosterona y en una disminución en la ecogenicidad testicular en ambos grupos. Coincidentemente, la exposición aguda a ovejas en celo resultó en un aumento en la frecuencia de pulsos y la concentración basal de LH, y la concentración de testosterona sérica en carneros (González et al., 1988; Perkins, Fitzgerald y Price, 1992). Por otra parte, Ungerfeld y Fila (2011b) demostraron que carneros expuestos a hembras en celo presentaron un aumento en la concentración sérica de testosterona y una disminución en la ecogenicidad testicular, lo que según los autores se asociaría a un aumento del fluido testicular. Por lo tanto, la exposición aguda a una hembra en celo y la eyaculación, constituyeron un efecto positivo sobre los niveles hormonales evaluados y las características testiculares de perros macho.

Luego de la exposición aguda a hembras en celo se observó un mayor aumento porcentual de la concentración de testosterona y una mayor disminución porcentual en la intensidad de píxeles en la ecografía testicular en el grupo de machos aislados de hembras respecto al grupo que convivía con hembras. Como resultado, ambas variables presentaron un claro efecto entre la medición de testosterona sérica y la evaluación de la intensidad de píxeles en la ecografía testicular y el momento en relación a la exposición aguda a las hembras en celo y la eyaculación. Por lo tanto, sumado al efecto agudo, la exposición crónica a hembras resultó en diferencias entre grupos en la respuesta endócrina y testicular. Esto podría asociarse a que, para ambas variables, los perros CH partieron de valores más cercanos a los posts estimulación que los perros AH. Para ello, los perros CH habrían partido de una condición endócrina y testicular basal (*i.e.* pre estimulación) mayor que la de los perros AH, vinculada a una estimulación crónica por la convivencia con hembras.

Coincidentemente con esta explicación, Giriboni y col (2017), reportaron que los machos caprinos expuestos en forma crónica a hembras en celo, mostraron un incremento en la concentración de testosterona sanguínea y una disminución en la ecogenicidad testicular, aparentemente vinculada a un aumento del fluido testicular. Además, Villagrán y Ungerfeld (2013) hallaron mayores concentraciones de testosterona en ciervos macho que compartían el recinto con hembras, en relación a aquellos aislados físicamente de estas. En pequeños rumiantes el efecto bioestimulador, asociado a la presencia de hembras, se denomina “efecto hembra”, fue demostrado en varias especies e incluye diversas respuestas

positivas crónicas y agudas sobre la reproducción de los machos (Giriboni et al., 2017; Ungerfeld, 2007; Villagrán y Ungerfeld, 2013). Hasta donde sabemos, no existe información sobre el efecto de la presencia de hembras sobre la fisiología reproductiva de caninos machos. Por lo tanto, esta Tesis amplía a caninos el conocimiento existente sobre este efecto socio-sexual asociado a la presencia de las hembras.

La exposición aguda a hembras en celo podría haber sido un efecto más novedoso para los perros que vivían aislados de hembras que para aquellos que convivían con estas. Prado et al., (2003) observaron una reducción en el número de machos que eyaculaban y una tendencia a una reducción en la concentración de espermatozoides en el eyaculado luego de exponer sostenidamente durante 2 horas machos caprinos a una hembra en celo. Sin embargo, cambiar a la hembra estimulante resultó en que todos los machos volvieran a eyacular y un aumento del 67% en el total de espermatozoides en los eyaculados -en relación a los valores registrados al inicio de la exposición a la primer hembra- (Prado et al., 2003). En nuestro estudio, los perros AH no tenían contacto con hembras, por lo que la exposición a una hembra en celo podría haber sido un estímulo más novedoso y generador de una mayor respuesta endócrina y testicular que en los perros CH. Aunque también fue un efecto novedoso para los machos del grupo CH que tomaron contacto agudo con una hembra desconocida por lo cual en estos también se observó una respuesta endocrina y testicular, pero menor a los machos del grupo AH.

Pese a las diferencias en magnitud de respuestas en la concentración de testosterona sérica e intensidad de pixeles en la ecografía testicular, los valores antes y después de la exposición a las hembras y la eyaculación no difirieron entre grupos. Esto podría explicarse de varias formas. Es posible que todos los individuos ya hubieran respondido a dicho estímulo. Por otra parte, los machos podrían haber alcanzado su máxima respuesta endócrina y testicular luego de la exposición a las hembras, lo que explicaría porque no se hallaron diferencias post exposición. En este sentido, futuros ensayos en los que se colecten las muestras antes de exponer a los machos a las hembras en celo permitirán complementar las diferencias halladas entre grupos en el presente trabajo.

No se registraron diferencias en las características del semen entre los grupos CH y AH. Contrariamente, la estimulación resultante de la presencia de hembras mejoró la calidad espermática en machos caprinos (Giriboni et al., 2017), ovinos (Falhey et al., 2012) y de ciervos (Villagrán y Ungerfeld, 2013). Como se comentó anteriormente, no existieron diferencias en las concentraciones de testosterona, tanto antes como después de la eyaculación, entre los grupos. La producción normal de semen requiere concentraciones altas de testosterona, la testosterona producida por la célula de Leydig llega hasta el túbulo seminífero (Bielli, 2002) las que seguramente fueron alcanzadas por los machos de ambos grupos. Por tanto, la producción similar de testosterona entre grupos y que estos habrían alcanzado

las concentraciones necesarias para mantener la espermatogénesis normal, explicarían que no se detectaran diferencias en las características del semen entre los machos CH y AH.

Fila (2018) demostró que perros machos de ovejero alemán en Uruguay, presentaron un patrón estacional en sus características reproductivas; con máximos valores de testosterona sérica y de calidad seminal en otoño. Nuestro ensayo fue realizado en primavera, por lo que los machos podrían haber estado en un periodo alejado del momento de máxima concentración de testosterona y calidad seminal, a pesar de que mantienen una buena calidad seminal. En este sentido, es posible especular que si el ensayo se hubiera realizado en otoño la estación reproductiva podríamos no haber encontrado esta respuesta ya que todos los reproductores hubieran estado en sus máximas condiciones respecto a la concentración de testosterona sérica y calidad seminal. Sin embargo, en otras razas no se han hallado patrones de estacionalidad reproductiva claros (Christiansen 1989; Fila 2013). Por lo tanto, futuros estudios deberían abordar la estacionalidad reproductiva de machos de bulldog inglés.

Desde el punto de vista práctico, los resultados de esta tesis sugieren que en la cría de perros se debería considerar el efecto de la presencia de las hembras sobre las características endócrinas y testiculares de los machos reproductores. En este sentido, estos efectos podrían ser utilizados para plantear medidas de manejo que minimicen las variaciones estacionales en las características reproductivas de los machos.

10. CONCLUSIÓN

La exposición crónica de perros macho a hembras resultó en una respuesta pobre en los cambios de la concentración de testosterona y de la intensidad de pixeles del parénquima testicular, al enfrentarse a una hembra en celo y la eyaculación, pero no se asoció a cambios en las características del semen.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aravindakshan, J.P., Honaramooz, A., Bartlewski, P.M., Beard, A.P., Pierson, R.A., y Rawlings, N.C. (2000). Pattern of gonadotropin secretion and ultrasonographic evaluation of developmental changes in the testis of early and late maturing bull calves. *Theriogenology*, (54), 339-354.
- Aguera, S. (2005). Aparato genital masculino. En A.G. García (Ed.), *Fisiología Veterinaria* (pp. 969-986). Zaragoza: Interamericana McGraw Hill.
- Atalan, G., Holt, P., Barr, F, J., y Brown, J. (1999). Ultrasonographic estimation of prostatic size in canine cadavers. *Research in Veterinary Science*, (67), 7-15.
- Bane, A. (1983). Morfológica evaluation on semen. En Proceeding XV FAO Postgraduate Course on Animal Reproduction, Sweden.
- Bartoš, L., Bartošová, J., Chaloupková, H., Dušek, A., Hradecká, L., y Svobodová, I. (2016). A sociobiological origin of pregnancy failure in domestic dogs. *Scientific Reports*, (6), 1-10.
- Bielli, A. (2001). Regulación hormonal de la función reproductiva en el macho. En R. Ungerfeld (Ed.), *Reproducción en animales domésticos* (Vol. 1., pp. 79-92) Montevideo, Melibea.
- Bronson, F.H. (1985). Mammalian reproduction: an ecological perspective. *Biology of Reproduction*, (32), 1-26.
- Bouchard, G., Younquist R., Vaillancourt D., Krause J., Guay P., y Paradis, M. (1991). Seasonality and variability of the interestrus Interval in the bitch. *Theriogenology*, (36), 41-50.
- Bustos, O., y Torres, L. (2012). Reproducción estacional en el macho. *International Journal of Morphology*, (30), 1266-1279.
- Christiansen, I. J. (1989). Ginecología de la hembra normal. En I, J. Christiansen (Ed.), *Reproducción en el perro y en el gato* (pp. 3-41). Buenos Aires: Intervet.
- Christensen, B. (2018). Canine prostate disease. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, (48), 701-719.
- Corrada, Y.A., Gimenez, P. E., y Gobello, A. (2014). El espermograma en la reproducción canina. *Revista del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires*, (36), 36-37.
- Cunningham, J., y Bradley, G. (2003). Reproducción y lactación. En J. Cunningham., y G. Bradley (Eds.), *Fisiología Veterinaria* (3ª ed., pp. 373-420). Barcelona: Elsevier.

- Chandolia, R.K., Bartlewski, P. M., Omeke, B.C., Beard, A.P., Rawlings, N.C., y Pierson, R.A. (1997). Ultrasonography of the developing reproductive tract in ram lambs: effects of a GnRH agonist. *Theriogenology*, (48), 99-117.
- Dahlbom, M., Andersson, M., Huszenicza, G., y Alanko, M. (1995). Poor semen quality in Irish wolfhounds: a clinical, hormonal and spermatological study. *Journal of Small Animal Practice*, (36), 547-552.
- Delgadillo, J.A., Fitz-Rodríguez, G., Duarte, G., Véliz, F.G., Carrillo, E., Flores, J.A., Vielma, J., Hernandez, H., y Malpoux, B. (2004). Management of photoperiod to control caprine reproduction in the subtropics. *Reproduction, Fertility and Development*, (16), 471-478.
- Fahey, A.G., Duffy, P., y Fair, S. (2012). Effect of exposing rams to a female stimulus before semen collection on ram libido and semen quality. *Journal of Animal Science*. (90), 3451-3456.
- Feldman, E. C. y Nelson, R.W. (1987). Disorders of the canine reproductive tract. En: E.C. Feldman., y R.W. Nelson. (Eds.), *Canine and Feline endocrinology and reproduction*. Saunder CO, Philadelphia (pp, 456-459).
- Feldman, E. y Nelson, R.W. (1991). Reproducción de la hembra canina. En E. C. Feldman., y R. W. (Eds.), *Endocrinología y reproducción canina y felina*. Mc Graw Hill Interamericana. Buenos Aires (pp, 445-460).
- Fila, D. (2013). Estacionalidad y características reproductivas en perras cimarronas. En: Llambí, M.S., Gagliardi, R. (Eds.). *Conociendo al perro cimarrón uruguayo*. Ediciones Universitarias, Montevideo (pp, 49-59).
- Fila, D. (2018). *Utilización de imagenología y determinación de parámetros testiculares para la evaluación del potencial reproductivo en perros ovejero alemán*. (Tesis de Maestría). Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.
- Garner, L. y Hafez, E. (2000). Espermatozoides y plasma seminal. En B, Hafez. y E, Hafez. (Eds.), *Reproducción de los animales domésticos (pp. 98-109)*. México: Mc Grau Hill Interamericana (pp, 98-109).
- Garzón, A. (2012). *Determinación de momento óptimo para la monta en una hembra canina*. (Tesis de Grado). Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad de La Salle, Bogotá.
- Gaviria, E., Bonilla, D., Sánchez, I., y Quintero, A. (2013). Evaluación reproductiva de la hembra canina en el momento del servicio: consideraciones para la práctica clínica. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, (6), 113-117.
- Giriboni, J., Lacuesta, L., y Ungerfeld, R. (2017). Continuous contact with females in estrus throughout the year enhances testicular activity and improves seminal traits of male goats. *Theriogenology*, (87), 284-289.

- González, R., Orgeur, P., y Signoret, J. (1988). Luteinizing hormone, testosterone and cortisol responses in rams upon presentation of estrous females in the nonbreeding season. *Theriogenology*, (30), 1075-1086.
- Gumbsch, P., Gabler, C., y Holzmann, A. (2002). Colour coded duplex sonography of the testes of dogs. *Veterinary Record*, (151), 140-144.
- Hafez, B., y Hafez, E. (2000). Comportamiento reproductivo. En B, Hafez., y E, Hafez (Eds.), *Reproducción en animales domésticos* (pp. 302-305). México: Mc Grau Hill Interamericana.
- Harre, R., y Lamb, R. (1991). *Diccionario de etología y aprendizaje animal*. Paidós. España.
- Harrop, A.E. (1960). *Reproduction in the dog* (pp, 1-204).
- Jeong, K.H., y Kaiser, U.B. (2006). Gonadotropin-releasing hormone regulation of gonadotropin biosynthesis and secretion. En *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Academic Press. London (pp, 1635-1701).
- Karsch, F.J., Bittman, E.L., Foster, D.L., Goodman, R. L., Legan, S. J., y Robinson, J. E. (1984). Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. Laurentian Hormone Conference (pp, 185-232).
- Kustritz, M. V. R. (2014). Applied small animal andrology. En: Chenoweth, P.J., Lorton, S. (Eds.) *Animal Andrology. Theories and Applications*. CAB International. Boston (pp, 177-196).
- Lincoln, G.A., y Short, R.V. (1980). Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Recent Progress in Hormone Research*, (36), 1-52.
- Martin, G.B., Rodger, J., Blache, D. (2004). Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, (16), 491-501
- Linde-Forsberg, C. (1991). Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Veterinary Clinics of North America*, (21), 467-485.
- Moya, M.J.M. (2014). *Estudio de la función de la hormona estimuladora del folículo de lubina: su implicación en la espermatogénesis y sus rutas de señalización intracelular*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Murcia.
- Oetlé, C.E. (1993). Sperm morphology and Fertility in the dog. *Journal of Reproduction and fertility Supplement*, (47), 257-260.
- Perkins. A., Fitzgerald, J. A., y Price, E.O. (1992). Luteinizing hormone and testosterone response of sexually active and inactive rams. *Journal of Animal Science*, (70), 2086-2093.

- Peterson, E., y Aurich, C. (2005) La reproducción en el macho. En W, Engelhardt, y G Breves. (Eds.), *Fisiología Veterinaria*. Acribia. Zaragoza (pp, 567-585).
- Pierson, R.A., y Adams, G.P. (1995). Computer-assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bedfellows. *Theriogenology*, (43), 105-112.
- Pugh, C. R., Konde, L. J., y Park, R. D. (1990). Testicular ultrasound in the normal dog. *Veterinary Radiology*, (31), 195-199.
- Prado, V., Orihuela, A., Lozano, S., y Pérez-León, I. (2003). Effect on ejaculatory performance and semen parameters of sexually-satiated male goats (*Capra hircus*) after changing the stimulus female. *Theriogenology*, (6), 261-267.
- Ramírez, L., y Quintero, L. (2001). Los fenómenos de bioestimulación sexual en ovejas y cabras. *Veterinaria México*, (32), 117-129.
- Ruel, Y., Barthez, P., Mailles, A., y Begon, D. (1998). Ultrasonographic evaluation of the prostate in healthy intact dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, (39), 212-216.
- Santos, R., Calderón, R., Vera, H., Perera-Marín, G., Arreguín, J., y Godoy, A. (2014). Hormona luteinizante y actividad ovárica en respuesta a kisspeptina-10 y su asociación con IGF-1 y leptina en becerras pre-púberes. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, (5), 181-200.
- Sharpe, R.M. (1984). Intratesticular factors controlling testicular function. *Biology of Reproduction*, 30(1), 29-49. Smith, J.T., Hawken, P.A., Lehman, M.N., y Martin, G.B. (2014). The role of kisspeptin in reproductive function in the ewe. En J.L., Miyamoto, A., Price, C., Reynolds, L., C., Smith M., F., Webb, R. (Eds.), *Reproduction in Domestic Ruminants VIII: Proceedings of the Ninth International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants*. Context Publishing. Madison (pp, 105-116).
- Stocco, D.M., y McPhaul, M.J. (2006). Physiology of testicular steroidogenesis. En J. D. Neill. (Ed), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier Academic Press. Missouri (V1. 3a ed, pp, 977-1016).
- Taha, M.A., Noakes, D.E., y Allen, W.E. (1891). Some aspects of reproductive function in the male Beagle and puberty. *Journal of Small Animal Practice*, (22), 663-667. Ugalde, J.P.R., y García, J.R.S. (2002). Respuesta al efecto macho de primaras Pelibuey en condiciones de pastoreo y suplementación en trópico. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 40.
- Ungerfeld, R. (2002). Hormonas gonadales, otras hormonas vinculadas a la reproducción Reproducción en los animales domésticos. En R. Ungerfeld (Ed.), *Reproducción en animales domésticos* (Vol. 1., pp. 32-37) Montevideo, Melibea.

- Ungerfeld, R., y Silva, L. (2004). Ewe effect: endocrine and testicular changes in experienced adult and inexperienced young Corriedale rams used for the ram effect. *Animal reproduction science*, (80), 251-259.
- Ungerfeld, R. (2007). Socio-sexual signalling and gonadal function: Opportunities for reproductive management in domestic ruminants. En: Juengel, J.I., Murray, J.F., Smith, M.F. (Eds.). *Reproduction in Domestic Ruminants*, (4), 207-221.
- Ungerfeld, R., y Bielli, A. (2012). Seasonal and social factors affecting reproduction. Livestock reproduction: bovine, swine, and ruminants” Encyclopaedia of life support systems (EOLSS).
- Ungerfeld, R., y Fila, D. (2011 a). Testicular fluid content and scrotal surface temperature increase with rams’ sexual activity. *Reproduction in Domestic Animals*, (47), 56-58.
- Ungerfeld, R., y Fila, D. (2011b). Testicular fluid content evaluated by ultrasound image computer-assisted analysis increases with small-dose multiple GnRH injections in rams. *Reproduction in Domestic Animals*, (46), 720-723.
- Urviola García, A.P., y Fernández, J.L. (2017). Factores moduladores de la estacionalidad reproductiva en ungulados. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, (19), 319-336.
- Tilbrook, A.J., y Clarke, I.J. (2001). Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biology of reproduction*, (64), 735-742.
- Villagrán, M. (2012). *Efecto de la presencia de hembras sobre la biología reproductiva de machos de venado de campo (Ozotoceros bezoarticus)*. Tesis de Maestría. PEDECIBA. Universidad de la República.
- Villagrán, M., y Ungerfeld, R. (2013). Permanent contact with females increases testosterone and improves fresh semen traits in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) males. *Animal Reproduction Science*, (143), 85-90.