UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD VETERINARIA

EL EFECTO DE GNRH EN DOSIS BAJAS SOBRE LAS TEMPERATURAS Y SOBRE EL FLUIDO TESTICULAR DE CARNEROS ANALIZADO POR IMÁGENES ULTRASONOGRÁFICAS

por

Sandra CARABETTA PRANDI

Silvina GÓMEZ AQUINO

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

MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY
2024

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa: _____

Dr. Jorge Gil

Segundo miembro (Tutor): _____

Dr. Danilo Fila

Tercer miembro: _____

Dra. Flavia Garcia

Fecha: 15/11/24

Autores: _____

Sandra Carabetta Prandi

Silvina Gómez

Silvina Gómez Aquino

AGRADECIMIENTOS

A nuestro tutor, Danilo Fila, por su apoyo y paciencia, a la Cátedra de Teriogenología de la Facultad de Veterinaria.

A los integrantes del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción de la Facultad de Veterinaria, por los aportes en la elaboración de esta tesis.

A Milton Pintos por el cuidado de los animales y ayudarnos en el trabajo experimental.

A los funcionarios de biblioteca y hemeroteca de la Facultad de Veterinaria por su dedicación.

A quienes nos apoyaron y colaboraron con esta tesis: Stephanie Lara, Andrea Gil, Alicia Félix, Verónica Gutiérrez, Carolina Latorre, Cecilia Castro.

A Edison por ser mi compañero, un gran apoyo, aconsejándome e impulsándome a seguir.

A nuestras familias y amigos por darnos fuerza, motivación, comprensión y creer en nosotras durante este largo camino.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANG: Angiopoyetina
COX: Ciclooxigenasa
E2: Estradiol
eCG: Gonadotrofina coriónica equina
FSH: Hormona folículo estimulante
FST: Flujo Sanguíneo Testicular
GnRH: Hormona liberadora de gonadotrofinas
hCG: Gonadotrofina coriónica humana
IF: Fluido intersticial
LH: Hormona luteinizante
PGE_2: Prostaglandina E_2
PGI_2: Prostaciclina
PI: Índice de pulsatilidad
PMN: Polimorfonucleares
RI: Índice de resistencia
ON: Óxido Nítrico
US: Ultrasonográficas
T: Testosterona
TXA_2: Tromboxano A_2
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN 2

AGRADECIMIENTOS 3

LISTA DE ABREVIATURAS 4

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS 6

RESUMEN 7

SUMMARY 8

1. INTRODUCCIÓN 9

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 11

2.1. Anatomía del aparato reproductor del carnero 11
2.2. Termorregulación y circulación testicular 13
2.3. Fisiología reproductiva en carneros 14
2.4. Fluido testicular 16
2.5. Ultrasonografía y su análisis 19

3. HIPÓTESIS 22

4. OBJETIVOS 23

4.1 Objetivo general 23
4.2 Objetivos específicos 23

5. MATERIALES Y MÉTODOS 24

5.1 Diseño experimental 24
5.2 Manejo de los animales 24
5.3 Registros 25
5.3.1 Registros de temperatura 25
5.3.2 Imágenes US testiculares 26
5.4 Administración de GnRH 27
5.5 Análisis estadístico 27

6. RESULTADOS 28

6.1 Temperaturas de los carneros de ambos grupos 28
6.2 Ecogenicidad testicular de los carneros de ambos grupos 29

7. DISCUSIÓN 30

7.1 Efecto de GnRH sobre las temperaturas 30
7.2 Efecto de GnRH sobre la ecogenicidad testicular 30

8. CONCLUSIÓN 32

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 33

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Página

Figura 1. Anatomía del aparato reproductor masculino de rumiantes **.....11**
Figura 2. Estructura histológica del parénquima testicular. **.....12**
Figura 3. Imagen US del parénquima testicular en un corte longitudinal **.....20**
Figura 4. Imagen US del parénquima testicular en un corte transversal **.....21**
Figura 5. Cronograma de muestreo **.....25**
Figura 6. Registro de imágen US del parénquima testicular **.....26**
Figura 7. Método de medición de píxeles **.....27**
Figura 8. a. Temperatura rectal de ambos grupos. **b.** Temperaturas de superficie escrotal **.....28**
Figura 9. Intensidad de pixeles de las ultrasonografías testiculares de ambos grupos **.....29**

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de múltiples administraciones de GnRH a bajas dosis sobre la temperatura rectal, perineal y escrotal, y mediante análisis de imágenes ultrasonográficas sobre el fluido testicular de carneros. Se realizó el experimento durante la época de reproducción tardía (mayo-junio) con 14 carneros de un año de edad. Siete carneros recibieron una dosis por hora de 7 ng de un análogo de GnRH (acetato de buserelina), con un total de 11 administraciones; y los otros siete carneros permanecieron como grupo control. El experimento se realizó con un diseño de grupos cruzados. Todas las determinaciones se realizaron una hora antes de la primera dosis de GnRH, y 0, 1, 2, 4, 7 y 10 h luego de comenzado el tratamiento. Se midió la temperatura rectal con un termómetro de mercurio, la temperatura perineal y de la superficie escrotal se registraron con un termómetro láser. Se realizaron las ultrasonografías testiculares empleando un ecógrafo (modo B) con un transductor lineal de 7,5 MHz. Los registros de temperaturas se realizaron siempre previo al estudio ultrasonográfico para disminuir interferencias provocadas por dicho procedimiento. Las imágenes US fueron analizadas con un software específico utilizando la técnica de cuatro círculos de 1 cm de diámetro, sobre la misma región del testículo en todas las imágenes ultrasonográficas. Para el análisis estadístico, tanto la intensidad de píxeles como las temperaturas fueron comparadas entre ambos grupos mediante un análisis de varianza con medidas repetidas en el tiempo, incluyendo en el modelo los efectos del tratamiento, el tiempo y sus interacciones. La temperatura perineal (34,02 ± 0,2°C) no fue afectada por el tratamiento o el tiempo ($p>0,1$). La temperatura rectal se incrementó luego de 4 h de comenzado el tratamiento ($p<0,0001$) y sin diferencias entre ambos grupos. La temperatura de la superficie escrotal en las zonas craneal, media y caudal, no se vieron afectadas por el tratamiento ($p>0,1$). La intensidad de pixeles disminuyó (mayor cantidad de líquido) como consecuencia del tratamiento con GnRH ($p<0,0001$). La diferencia en la intensidad de los píxeles entre ambos grupos fue significativa a partir de 2 h de la primera dosis de GnRH ($p<0,0001$). Estos cambios en la intensidad de los píxeles no fueron acompañados por variaciones en la temperatura de la superficie escrotal. Se concluye que múltiples bajas dosis de GnRH provocaron una reducción progresiva de la ecogenicidad del parénquima testicular, lo que podría indicar un rápido aumento en el contenido del fluido testicular.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effect of multiple administrations of low-dose GnRH on rectal, perineal and scrotal temperatures, and ultrasound imaging of testicular fluid in rams. The experiment was conducted during the late breeding season (May–June) with 14 one-year-old rams. Seven rams received an hourly dose of 7 ng of a GnRH analogue (buserelin acetate), for a total of 11 administrations; the other seven rams remained as a control group. The experiment was conducted in a cross-over design. All measurements were made one hour before the first dose of GnRH, and 0, 1, 2, 4, 7 and 10 h after starting treatment. Rectal temperature was measured with a mercury thermometer, perineal and scrotal surface temperatures were recorded with a laser thermometer. Testicular ultrasounds were performed using a B-mode ultrasound scanner with a 7.5 MHz linear transducer. Temperature recordings were always made prior to the ultrasound study to reduce interference caused by the procedure. US images were analyzed with specific software using the technique of four circles of 1 cm in diameter, over the same region of the testicle in all ultrasound images. For statistical analysis, both pixel intensity and temperatures were compared between both groups using an analysis of variance with repeated measures over time, including in the model the effects of treatment, time and their interactions. Perineal temperature (34.02 ± 0.2°C) was not affected by treatment or time ($p>0.1$). Rectal temperature increased 4 h after starting treatment ($p<0.0001$) and without differences between both groups. Scrotal surface temperature in the cranial, middle and caudal areas was not affected by treatment ($p>0.1$). Pixel intensity decreased (increased fluid content) as a result of GnRH treatment ($p<0.0001$). The difference in pixel intensity between both groups was significant starting 2 h after the first dose of GnRH ($p<0.0001$). These changes in pixel intensity were not accompanied by variations in scrotal surface temperature. It is concluded that multiple low doses of GnRH caused a progressive reduction in echogenicity of the testicular parenchyma, which could indicate a rapid increase in testicular fluid content.

1. INTRODUCCIÓN

El sector ovino ha ocupado un lugar importante en la producción uruguaya a través de los años, en la actualidad compite con otros sistemas de explotación agropecuaria como la agricultura, la forestación, la invernada vacuna y la lechería (Cardellino, 2008; Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca [MGAP], 2022a; 2022b). Desde los orígenes el sector se caracterizó por ser una actividad extensiva sobre pasturas naturales de nuestro país, en el que predominan los sistemas de producción ovina de doble propósito (carne y lana) basados mayoritariamente en la raza Corriedale (Cardellino 2018; MGAP, 2022a; Ramos, 2023a y b). Con el objetivo de aumentar la producción ovina del Uruguay es que se apunta a mejorar múltiples aspectos como la sanidad, la nutrición, el manejo y la selección de animales siendo de suma importancia los aspectos reproductivos (De Barbieri et al., 2022). El carnero es el elemento clave para lograr una buena eficiencia reproductiva de la majada, y para contribuir al mejoramiento genético de la misma. Se puede considerar que los machos con problemas de fertilidad atentan contra la obtención de buenos resultados reproductivos en la majada nacional, tanto por disminución directa en la señalada como también por transmisión de defectos congénitos y enfermedades contagiosas (Robles, 2004). En nuestro país la cría ovina se caracteriza, entre otros aspectos, por largas encarneradas y el uso de carneros en una proporción de 4% (MGAP, 2022a). Un estudio realizado en Uruguay determinó que casi un 24,4% de los carneros utilizados a campo no eran clínicamente aptos para la reproducción (Castrillejo, 1990).

Se ha demostrado que la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) es una hormona reproductiva esencial y una valiosa herramienta endocrina para modular la función del sistema reproductivo endocrino masculino (Gábor et al., 1998; Parlevliet, Bevers, Van de Broek y Colenbrander, 2001). Sin embargo, si bien está claro que los testículos retroceden rápidamente y dejan de funcionar normalmente cuando se les priva de la estimulación gonadotrófica normal, es evidente que la función diaria de los testículos está en gran medida controlada localmente (Sharpe, 1983).

El fluido intersticial (IF) es el encargado de transportar todos los nutrientes para cubrir la alta demanda energética de los túbulos seminíferos, para la espermatogénesis, lo cual implica una multiplicación continua e intensa de las células germinales (Fawcett, Neaves y Flores, 1973). Ya en la década de los 80 se comenzó a comprobar que el aumento de flujo sanguíneo testicular (FST), favorece el ingreso de líquido y sustancias hacia el espacio intersticial testicular, aumentando así el IF (Intaglietta, 1981; Widmark, Damber y Bergh, 1986).

Como se ha demostrado en diversas investigaciones, la hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica humana (hCG) tienen un papel significativo en el aumento del FST en animales (Pozor, 2007; Sharpe, 1983). La hCG tiene efectos idénticos a la LH en la permeabilidad capilar y en los cambios de volumen del IF (Sharpe, 1983). Existen diversos autores que evalúan y comparan las similitudes entre las acciones de la hCG y GnRH en los sistemas reproductivos (Parlevliet et al., 2001; Seguin, Oxender y Britt, 1977; Sharpe, 1984). Según Sharpe (1984) los agonistas de

GnRH tienen efectos dependientes de la dosis sobre la permeabilidad capilar y los niveles de testosterona (T) en el IF. La temperatura de la superficie escrotal y las concentraciones séricas de LH y T aumentaron después del tratamiento con GnRH (Gábor et al, 1998). Es bien sabido que la termorregulación testicular tiene relevancia en la producción de espermatozoides morfológicamente normales, móviles y fértiles (Kastelic, Rizzoto y Thundathil 2018). La temperatura de la superficie del escroto de los carneros disminuye gradualmente desde el tercio proximal al distal del órgano debido al mecanismo de pérdida de calor por contraflujo de los vasos sanguíneas (Freitas et al., 2018). Ungerfeld y Fila (2012) describieron en carneros, aumentos de la temperatura rectal, perineal y escrotal luego del contacto con ovejas en estro; acompañado de un aumento del fluido testicular, evaluado a través de la disminución de intensidad de los píxeles del parénquima testicular.

La evaluación microestructural y funcional de los órganos de la reproducción, ha mejorado notoriamente la comprensión de los cambios dinámicos a nivel histofisiológico, por medio del análisis computarizado de imágenes ultrasonográficas (US) digitales (Chandolia et al., 1997; Evans et al., 1996; Giffin, Franks, Rodriguez-Sosa, Hahnel y Bartlewski 2009; Ülker et al., 2005).

Hasta el momento de realizar el presente ensayo, no existían reportes de las variaciones en el parénquima y del fluido testicular mediante el uso de la ultrasonografía, con la administración de múltiples bajas dosis de GnRH. De acuerdo a la revisión bibliográfica son escasos los trabajos en animales de producción, que permita dilucidar la causa que produce el aumento del fluido testicular ni que se utilicen las variaciones en la intensidad de pixeles para la evaluación del mismo (Gábor et al., 1998) y no existían reportes en Uruguay, por lo que nos propusimos investigarlo.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Anatomía del aparato reproductor del carnero

El sistema reproductor masculino se compone por un número de órganos individuales (Figura 1) que actúan en conjunto y tienen a su cargo la formación, la maduración, el transporte y la transmisión de células germinales masculinas (espermatozoides). En las glándulas germinales, los testículos, se producen espermatozoides y hormonas. En el intensamente contorneado conducto del epidídimo los espermatozoides son almacenados hasta su maduración definitiva y luego transportados. Después de un largo recorrido por el conducto deferente estas células alcanzan la zona pélvica de la uretra, sitio en el que se mezclan las secreciones de glándulas genitales accesorias de manera que se forma el semen (Červeny, König y Liebich, 2005; Romano y Brinsko, 2013).

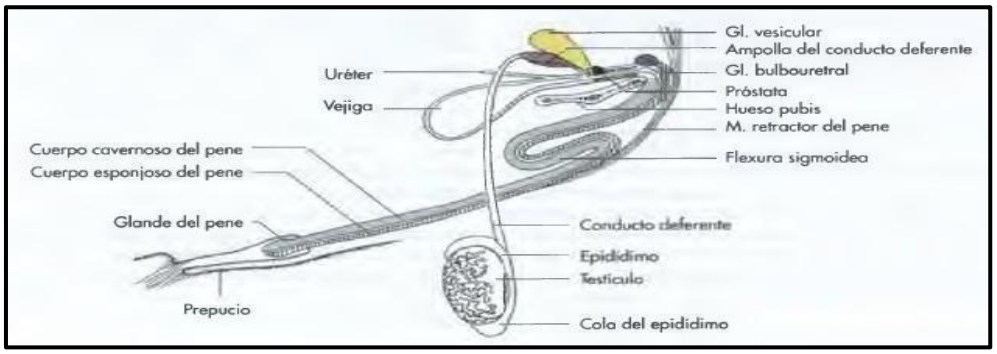

Figura 1. Anatomía del aparato reproductor masculino de rumiantes (Červeny et al., 2005).

La existencia de un escroto penduloso facilita la exposición de los testículos a la temperatura ambiental, favoreciendo así la pérdida de calor. El escroto presenta una irrigación sanguínea y linfática superficial lo que permite la pérdida de calor; a su vez el aumento de la temperatura en el escroto causa vasodilatación (Dahl y Herrick, 1959). La piel del escroto es una de las más finas del cuerpo, no presentando grasa subcutánea que aislaría térmicamente al testículo. Es una de las zonas de la piel con menos lana en carneros que presenta un importante número de glándulas sudoríparas, capaces de producir gran cantidad de secreción, las cuales están inervadas por gran cantidad de nervios simpáticos (Ungerfeld, 2002; Waites, 1962). Frente a temperaturas elevadas en la superficie escrotal, el hipotálamo detecta estos cambios y envía impulsos a estas glándulas generando un enfriamiento por evaporación (Robertshaw y Vercoe, 1980). Debajo de la piel del escroto hay una lámina fina de músculo liso, la túnica dartos. La misma está bajo el control de los nervios simpáticos lumbares y responde a los cambios de temperatura del ambiente contrayéndose o relajándose, lo que altera el grosor y la superficie escrotal y aleja o acerca los testículos al abdomen, al igual que el músculo cremáster. Aunque como este último es un músculo estriado la contracción no puede mantenerse por tiempos prolongados (Ungerfeld, 2002).

En pequeños rumiantes los testículos son elipsoides y grandes en relación con el tamaño corporal, y penden verticalmente (Dyce, Sack y Wensing 2010). Los testículos están contenidos por una firme cápsula de tejido conectivo, la túnica albugínea, por la cual discurren los grandes vasos sanguíneos. Desde la cápsula irradian hacia el interior del testículo pequeños tabiques de tejido conectivo, los septos del testículo, que lo dividen en lobulillos de forma piramidal. Estos tabiques se unen entre sí en el eje testicular, o algo desplazados en dirección al epidídimo, para formar el mediastino del testículo (Červeny et al., 2005). Más del 90% del volumen testicular está constituido por parénquima avascular; formado por túbulos seminíferos contorneados, túbulos seminíferos rectos y red del testículo (*Rete testis*). El resto del parénquima está compuesto por el tejido intersticial altamente vascularizado (Bielli, 2002; Červeny et al., 2005; Sharpe, 1983). El intersticio testicular consiste en células de Leydig, vasos sanguíneos y linfáticos; y otros tipos de células (en particular, los macrófagos), con cantidades variables de tejido conectivo (Figura 2). En los carneros los vasos linfáticos son una característica prominente en el intersticio testicular (Sharpe, 1983). Por lo que se genera un abundante IF, bañando las células de Leydig, los vasos sanguíneos y el exterior de los túbulos seminíferos. Es a través de este fluido que se transportan todas las hormonas y nutrientes desde el torrente sanguíneo a las células y entre estas células dentro del testículo (Sharpe, 1983).

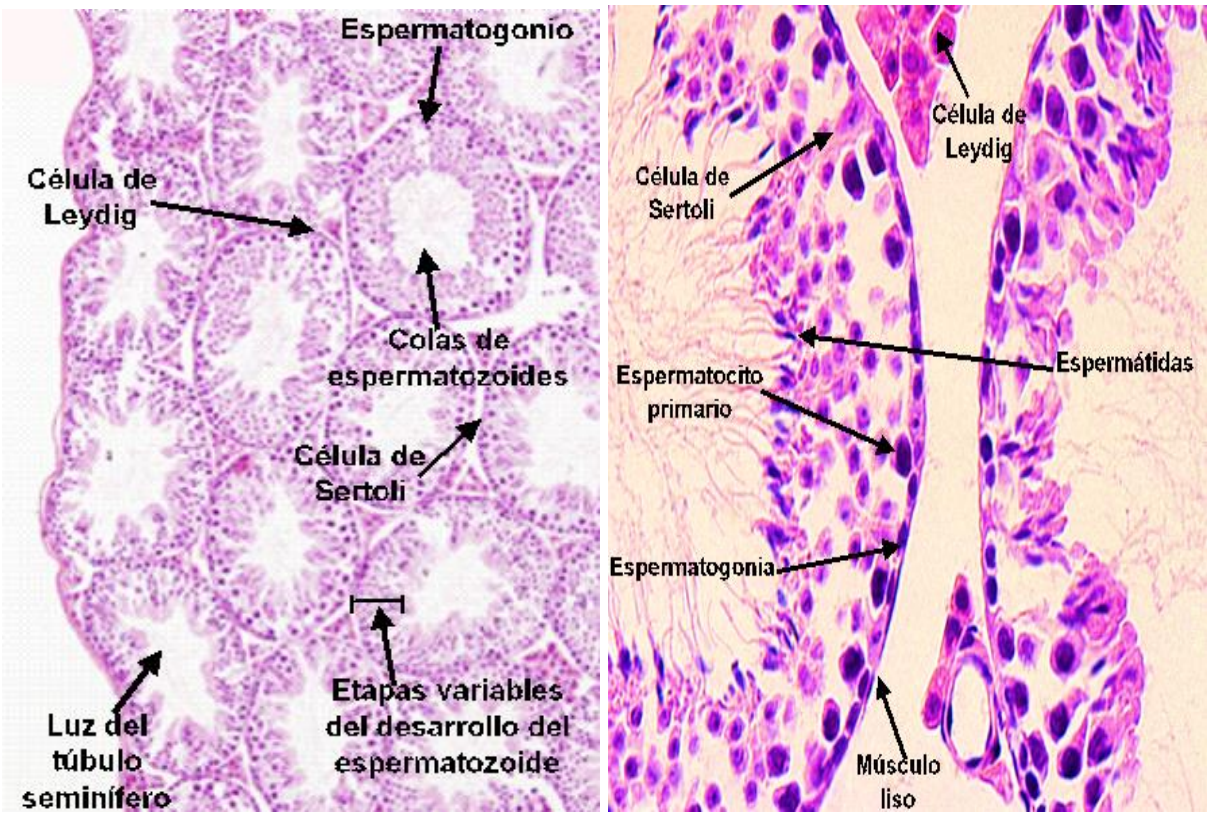

Figura 2. Estructura histológica del parénquima testicular. (Fuente: Megías Pacheco, Molist García y Pombal Diego, 2017).

Como se observa en la Figura 2, los túbulos seminíferos son una estructura tubular que está rodeada por una lámina basal. El epitelio seminífero constituye el resto de la pared del túbulo. Es un epitelio estratificado complejo que contiene células de dos tipos: las células de Sertoli y de la línea germinal, o células espermatogénicas (Bielli, 2002). La espermatogénesis implica la transformación de una célula madre indiferenciada (espermatogonia tipo A) en un espermatozoide inmaduro altamente diferenciado, estas células germinales están en estrecha asociación con el citoplasma de las células de Sertoli, o incluso incrustadas en él. Las cuales proporcionan la totalidad o la mayor parte del soporte nutricional y físico para las células germinales en desarrollo, así como mueven las células germinales del interior de la membrana basal hacia el lumen a medida que avanza el desarrollo (Sharpe, 1983).

2.2. Termorregulación y circulación testicular

Para la espermatogénesis normal es esencial el mantenimiento de una temperatura intratesticular uniforme entre 2 a 6°C por debajo de la temperatura central del cuerpo (Waites, 1970).

Tal como se mencionó en la sección 2.1, varios factores contribuyen a la termorregulación escrotal y testicular, incluido el cono vascular testicular que reduce la temperatura testicular mediante el intercambio de calor a contracorriente, la estructura del escroto que mantiene los testículos alejados del cuerpo y genera radiación de la temperatura de la superficie escrotal. Además, la túnica dartos afecta la ubicación de los testículos en relación con el cuerpo y las glándulas sudoríparas escrotales proporcionan enfriamiento por evaporación (Kastelic, Cook y Coulter, 1996).

La disposición vascular en el cordón espermático es un sistema de intercambio de calor notablemente eficiente (Waites y Moule, 1961). La arteria espermática interna de muchos mamíferos es altamente compleja y en animales de granja el enrollamiento es tan extenso que la arteria forma un cono vascular en el polo dorsal del testículo. Dicho cono vascular se compone por una red venosa, el plexo pampiniforme, que rodea la altamente enrollada arteria testicular. Esta ramificación reduce la presión arterial media y permite la transferencia de calor de las arterias testiculares (alta temperatura) a las venas (baja temperatura) por un sistema de intercambio de calor contra corriente. Este mecanismo de intercambio de calor es posible, debido a que la arteria espermática se enrolla ampliamente y en estrecha proximidad con el plexo venoso pampiniforme. Además, hay venas peri arteriales y anastomosis arteriovenosas que facilitan la transferencia de calor, así como la transferencia de hormonas tales como la T de las venas hacia las arterias (Romano y Brinsko, 2013).

El escroto controla la temperatura intratesticular, pero la temperatura de la superficie escrotal no se ve afectada significativamente por la presencia de un testículo (Kastelic et al., 1996).

Las células de Sertoli están conectadas a través de uniones estrechas, que constituyen una barrera de transporte, denominada barrera hematotesticular; el desarrollo de las células germinales se describe como un pasaje desde la membrana basal (es decir, fuera de la barrera de unión estrecha) al compartimiento del lumen (es decir, dentro de la barrera de uniones estrechas). La barrera hematotesticular es de evidente importancia en el control local de los testículos (Sharpe, 1983). Debemos considerar a esta barrera no sólo como un mecanismo de selección, previniendo la entrada de ciertas sustancias, sino también como un medio para impedir que otras sustancias se liberen de los testículos; asegurando así la concentración local de factores con funciones intratesticulares específicas. Esto impide funcionalmente que muchos compuestos que se encuentran en la sangre y el IF entren en el compartimento luminal (Romano y Brinsko, 2013; Sharpe, 1983).

Según Kastelic et al. (2018) se ha informado sobre el papel de los vasos sanguíneos y su asociación con la temperatura escrotal y testicular. El área inmediatamente encima de la parte superior del testículo suele ser el área más cálida del escroto, ya que se disipa una cantidad considerable de calor de la arteria testicular subyacente (Kastelic et al., 2018).

En un estudio en toros se encontró un aumento de la temperatura superficial escrotal después de la administración de GnRH, y una correlación positiva entre dicho aumento de temperatura y el número de espermatozoides producidos (Gábor et al., 1998). Por otra parte, se demostró que el contacto con ovejas en estro (incluido el cortejo y el apareamiento) produce un aumento en la temperatura de la superficie escrotal, así como un aumento del contenido de líquido testicular en los carneros, evaluado por disminución de la ecogenicidad testicular (Ungerfeld y Fila, 2012).

2.3. Fisiología reproductiva en carneros

Los ritmos reproductivos estacionales en las especies de mamíferos silvestres reflejan adaptaciones a los cambios de temperatura y disponibilidad de alimentos que aseguran que el parto ocurra en la época del año óptima para la supervivencia de los recién nacidos. En zonas subtropicales, así como en latitudes medias y altas, las diferentes razas de ovinos muestran cambios estacionales de su actividad reproductiva (Gómez-Brunet, Santiago-Moreno, Toledano-Oraz y López-Sebastián, 2012). Los mismos se consideran reproductores de días cortos ya que, en condiciones ambientales naturales, la actividad reproductiva comienza durante los días más cortos de finales del verano y principios del otoño, y termina durante los días más largos de finales del invierno y principios de la primavera (Hafez, 1952). Estando regulado el comienzo y final de la estación reproductiva por el ritmo endógeno circanual

sincronizado por el fotoperiodo. Sin embargo el inicio y duración de la estación reproductiva puede estar afectado por la interacción del fotoperiodo con otros factores tales como la raza, origen geográfico, lactación, estado nutricional, interacciones sociales y época del parto (Gómez et al., 2012). En las regiones templadas, los carneros también muestran cambios estacionales en su comportamiento sexual, secreción de T, peso testicular, como también en la cantidad y la calidad del esperma (Ortavant et al 1985 citado por Gómez et al., 2012).

La información del fotoperíodo percibida por los ojos se transmite a través de una vía multi sináptica a la glándula pineal, donde la luz se traduce en un ciclo diario de secreción de melatonina caracterizado por altos niveles de secreción durante la noche y bajos niveles durante el día (Arendt, 1998). La duración de la secreción nocturna de melatonina, que refleja la duración de la noche, regula la secreción pulsátil de la GnRH del hipotálamo (Gómez et al., 2012).

En los mamíferos el sistema reproductor de los machos está regulado por complejos mecanismos de retroalimentación que implican el hipotálamo, la hipófisis anterior y los testículos (Romano y Brinsko, 2013). La GnRH es un decapéptido expresado en núcleos hipotalámicos seleccionados y otras estructuras neurales. Las neuronas hipotalámicas que producen GnRH proyectan sus axones a los lechos capilares en la porción basal medial del hipotálamo. Los extremos de estos axones están ricamente revestidos con vesículas que contienen GnRH, la cual se libera en el compartimento vascular adyacente en respuesta a una variedad de estímulos nerviosos y humorales (Smith y Jennes, 2001). La GnRH, secretada de manera pulsátil, actúa directamente sobre las células gonadotróficas de la hipófisis anterior; estimulando la síntesis y la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y la LH. La liberación de FSH y LH depende del patrón pulsátil de la secreción de GnRH. Los pulsos de GnRH de baja amplitud resultan en la liberación de FSH, mientras que los de alta amplitud inducen la liberación de LH (Romano y Brinsko, 2013). Se han asociado aumentos de LH en carneros que estaban en contacto con ovejas en estro con aumentos en la firmeza y la elasticidad testicular (Ungerfeld y Silva, 2004).

Dentro de los testículos, la LH se une a los receptores de membrana de las células de Leydig y las estimula para convertir el colesterol a T. Los andrógenos (como la T) sintetizados son difundidos en la sangre y la linfa, donde se unen a proteínas de unión de andrógenos producidas por las células de Sertoli. La alta concentración de andrógenos dentro de los testículos se considera esencial para que ocurra la espermatogénesis normal (Romano y Brinsko, 2013). La T, no sólo tiene un rol fundamental en la espermatogénesis, sino que también participa en el desarrollo y mantenimiento de la libido, en la actividad secretora de las glándulas sexuales accesorias y en las características sexuales secundarias (Bielli, 2002).

Las células de Sertoli poseen receptores de membrana para la FSH e intranucleares para andrógenos. Existen evidencias que indican que la FSH estimula a la célula de Sertoli a secretar estrógenos a partir de la T proveniente de las células

de Leydig mediante un proceso denominado aromatización. Por esto la FSH sería importante para iniciar la espermatogénesis y la LH para que este proceso ocurra adecuadamente (Bielli, 2002). La inhibina junto con la T está involucrada en la compleja función de la regulación de la retroalimentación de la hipófisis (Romano y Brinsko, 2013; Ruckebusch, Phaneuf y Dunlop, 1994).

Debido a que el desarrollo y la función testicular dependen claramente de las hormonas gonadotróficas secretadas por la hipófisis anterior, tal vez sea inevitable que los investigadores de la reproducción en general hayan llegado a considerar que la regulación de la función testicular está predominantemente bajo el control de la hipófisis. Si bien esta hormona ofrece los estímulos básicos de los que depende la función testicular, el cómo y cuándo responde el testículo a estos estímulos, y en qué medida estos estímulos se utilizan, parece estar determinado por complejos factores intratesticulares (Sharpe, 1983; 1984).

2.4. Fluido testicular

El FST es altamente importante para la función del órgano, y puede ser particularmente crítico para el testículo porque los túbulos seminíferos tienen una concentración de oxígeno muy baja (Setchell, 1990 citado por Samir et al., 2015). La espermatogénesis se adapta a un ambiente de baja tensión de oxígeno dentro de los túbulos seminíferos para evadir el daño de los espermatozoides por los radicales libres de oxígeno (Setchell, 1998 y Aitken, 1999 citado por Samir, El-Shalofy y El-Sherbiny, 2023). Por lo tanto, cualquier reducción del FST causa daño isquémico y el deterioro de la espermatogénesis (Kay, Grobbelaar y Hattingh, 1992). Herwig et al. (2004) demostraron que la calidad y cantidad del esperma depende de la perfusión sanguínea dentro del testículo. En condiciones de hipoxia aguda, los testículos mantienen el suministro y la captación de oxígeno aumentando el flujo sanguíneo y la extracción de oxígeno, sin indicación de metabolismo anaeróbico (Kastelic et al., 2018).

La velocidad de formación del IF, que es esencialmente lo que controla la velocidad de entrada de la mayoría de los compuestos a los testículos, está determinada en gran medida por la permeabilidad de los capilares testiculares, y esta última es bajo control hormonal y local (Sharpe, 1983).

El FST puede estar influenciado por factores tales como la postura, la temperatura y por sustancias vasoactivas comunes, tales como las prostaglandinas y los neurotransmisores (Free, 1977; Setchell, 1970; Setchell, 1978 citados por Sharpe 1983). Desde el punto de vista del control local de los testículos, el efecto potencialmente más importante es la capacidad de la LH para aumentar el FST. Dicho efecto y el que tiene sobre la permeabilidad capilar no se considera que es una acción directa en la vasculatura, pero es probablemente mediada por factores testiculares producidos en respuesta a ella (Sharpe, 1983). Hay antiguas evidencias, de acuerdo

a lo reportado por Williams (1949), que indican claramente que algún producto de las células intersticiales (células de Leydig, macrófagos) puede regular tanto la naturaleza como la cantidad del suministro de sangre en sus proximidades.

Existen trabajos recientes que demostraron la acción de la FSH en el aumento del FST, los cuales encontraron una asociación del mismo a aumentos en la concentración de estradiol (E2) y óxido nítrico (ON) debido al poderoso efecto vasodilatador de ambos (Samir et al., 2023). Recientemente se ha evaluado que el efecto de la administración aguda de melatonina mejoró el flujo sanguíneo de la arteria testicular y aumentó la FSH, la T y el E2 en machos cabríos (Samir et al., 2023).

Hay estudios que demuestran que la hCG comparte receptores con LH (Assmus et al., 2005). La hCG tiene efectos idénticos a la LH en la permeabilidad capilar (Setchell y Sharpe, 1981), que a su vez conduce a un marcado aumento en el volumen del IF (Sharpe, 1980). El FST total, el volumen de fluido intersticial y el flujo linfático de los testículos, aumentan después del tratamiento con hCG (Setchell y Sharpe, 1981). Como mencionó Matteo et al. (2006), existen estudios experimentales que demostraron que la administración de hCG es capaz de disminuir el índice de resistencia de los vasos intratesticulares, y en consecuencia, incrementar el suministro del FST. Se ha reportado que la hCG puede alterar la actividad del músculo liso a nivel arteriolar de la microcirculación testicular, induciendo el intercambio transvascular de líquido y aumentando los períodos de flujo sanguíneo continuo (Damber, Bergh, Fagrell, Lindahl y Rooth, 1986).

Los cambios hemodinámicos inducidos por las gonadotropinas en el tracto reproductivo masculino pueden estar mediados por cambios en el equilibrio de eicosanoides vasoactivos (Matteo et al., 2006). Los eicosanoides no se almacenan y tienen una vida media muy corta, características como estas los hacen estratégicos en la regulación del microambiente celular y la homeostasis. Los prostanoides pertenecen al grupo de los eicosanoides, que incluye a las prostaglandinas, las prostaciclinas y los tromboxanos (Domínguez, 2006). El tromboxano A_2 (TXA_2) es un potente estimulador de la agregación plaquetaria y causa vasoconstricción, mientras que la prostaciclina (PGI_2) inhibe la agregación plaquetaria y causa vasodilatación (Armstrong, 1996; Narumiya et al., 1999 citado por Matteo et al., 2006). Varios estudios comprobaron la acción vasoconstrictora de la prostaglandina E_2 (PGE_2) en diversos vasos sanguíneos (Toth et al., 1994; Wilhelmsson, Lindblom, Wikland y Wigvist 1981). Las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2, respectivamente) catalizan el primer paso enzimático en la formación de los eicosanoides (Domínguez, 2006; Park, Pillinger y Abramson, 2006). La hCG da como resultado un aumento de COX-1, COX-2 y PGI_2 sintetasa y al mismo tiempo una disminución de PGE_2 y TXA_2 sintasa (Toth et al., 1994). Por lo tanto, estos cambios en los eicosanoides y sus enzimas pueden mediar el efecto vasodilatador de la hCG y la LH en las arterias (Toth et al., 1994).

Una única inyección subcutánea de hCG en dosis altas induce aumentos rápidos y transitorios en los niveles de citoquinas proinflamatorias, como la interleucina 1β, en los testículos de rata. Las células de Leydig son el principal objetivo testicular para la activación de la hCG a través del receptor de LH (Assmus et al., 2005). Estos autores concluyeron que la hCG induce inflamación testicular mediante las células de Leydig, produciendo una activación local de los macrófagos residentes para la producción de citocinas proinflamatorias. La exposición local a la interleucina 1β induce una respuesta vascular, incluida la extravasación de leucocitos al intersticio testicular (Assmus et al., 2005).

La vasculatura testicular es única en varios sentidos, los microvasos testiculares normalmente son resistentes a los mediadores de la inflamación (Rudolfsson, Johansson, Lissbrant, Wikström y Bergh, 2003). Como mencionó Bergh, Damber y Widmark (1990), basándose en sus ensayos previos, el tratamiento de ratas macho adultas con hCG o LH en dosis altas produce cambios similares a la inflamación en la microcirculación testicular. Dentro de las 4 horas posteriores al tratamiento, los leucocitos polimorfonucleares (PMN) se acumulan en los vasos sanguíneos, se abren espacios entre células interendoteliales en las vénulas poscapilares y, a través de esta ruta, las macromoléculas se filtran y los PMN migran al espacio intersticial. La hCG aumenta la proliferación de las células endoteliales, la permeabilidad vascular y la sensibilidad a los mediadores de la inflamación inyectados localmente; también genera una mayor expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) A y la angiopoyetina (ANG) 2 (Rudolfsson et al., 2003). La ANG 1, la ANG 2 y su receptor 2 se expresan en los testículos, aparentemente exclusivamente en los vasos sanguíneos. La inyección de ANG 2 en el testículo aumenta la proliferación de células endoteliales y el volumen del espacio intersticial (Rudolfsson et al., 2003). Una dosis única de VEGF-A en el testículo aumenta la proliferación de células endoteliales (Rudolfsson, Wikström, Jonsson, Collin y Bergh, 2004). Pero, a diferencia de la mayoría de los otros tejidos en los que el VEGF-A causa un aumento agudo importante en la permeabilidad vascular, en los testículos sólo produce un aumento moderado (Rudolfsson et al., 2004).

La gonadotrofina coriónica equina (eCG) es una hormona con actividad similar a la FSH y la LH (Cole, 1936; Talamantes y Ogren, 1988 citados por Bergh, Damber, Lieu y Widmark, 1992). El tratamiento con eCG en ratas adultas dio como resultado un aumento del doble en el FST a las 24 h y un aumento en el volumen de líquido intersticial a las 36 h después de su administración (Bergh et al., 1992). Como lo mencionan los autores anteriormente citados, no es sorprendente que la eCG diera como resultado un aumento en el FST que pareció ocurrir al mismo tiempo y ser de la misma magnitud que después del tratamiento con hCG.

La propia GnRH se degrada rápidamente y su vida media en la circulación es de aproximadamente 2 a 4 minutos. Los análogos agonistas ejercen la misma actividad biológica que el péptido nativo pero son más resistentes a la degradación enzimática y poseen mayor afinidad por el receptor de GnRH (Ortmann, Weiss y

Diedrich, 2002). El acetato de buserelina es un agonista de GnRH, el cual es aproximadamente 50 veces más potente que la GnRH nativa (Chenault, Kratzer, Rzepkowski y Goodwin, 1990). La administración crónica de dosis altas conduce a la supresión del número de receptores de GnRH. Se ha observado que con dosis bajas de GnRH, la hipófisis no se vuelve refractaria a la estimulación repetida como ocurre con dosis mucho más altas (McLeod et al., 1982). La administración intravenosa de agonistas de GnRH induce un aumento de la secreción de LH y T en cuestión de algunos minutos (Fraser y Lincoln, 1980). Esto es reafirmado por McLeod, Haresign y Lamming (1982) quienes describieron un aumento en la pulsatilidad de la LH mediante múltiples tratamientos con bajas dosis de GnRH. La utilización de GnRH en carneros durante la temporada no reproductiva, no sólo dio como resultado concentraciones más altas de T y una actividad de apareamiento más elevada, sino también un aumento del tamaño de los testículos y una mejora en la calidad del semen (Schanbacher y Lunstra, 1977).

En cuanto a la utilización de ultrasonografía Doppler de onda pulsada, el índice de resistencia (RI) y el índice de pulsatilidad (PI) son medidas precisas del flujo sanguíneo arterial y representan información sobre la vasculatura testicular (El-Shalofy y Hedia, 2021). Los ensayos en carneros revelaron una disminución sustancial en los valores del RI y del PI después de la administración de acetato de buserelina, reflejando un consiguiente aumento en la perfusión sanguínea testicular debido a la falta de resistencia de la pared arterial interna al flujo sanguíneo, lo que es beneficioso para la funcionalidad testicular (El-Shalofy y Hedia, 2021). Esto concuerda con lo descripto por Samir et al. (2015), quienes evaluaron el efecto de una sola inyección de hCG o de GnRH en la disminución de los valores del RI y del PI de la arteria supratesticular, lo que podría resultar en un aumento de la perfusión sanguínea testicular, y conducir a un aumento de la permeabilidad vascular testicular y el líquido intersticial. Tanto la administración de hCG como de GnRH pueden mejorar el FST y el volumen testicular en machos cabríos, se observó que dichos aumentos se producen significativamente más temprano y son mayores con hCG (1 h) que con GnRH (2 h), una posible explicación para esto puede estar relacionado con el efecto directo de la hCG en comparación con el efecto indirecto de la GnRH (Samir et al., 2015).

2.5. Ultrasonografía y su análisis

La imagen US se basa en la densidad relativa (contenido de fluido) del tejido que está siendo examinado, es decir, la capacidad intrínseca de los tejidos de reflejar o transmitir ondas acústicas de alta frecuencia (Ginther, 1986). La organización micro-anatómica de los tejidos y el relativo fluido que componen los órganos son la determinación primaria de la apariencia o el patrón de imagen US de un tejido, el que se denomina ecotextura (Evans et al., 1996). De modo simple, a mayor contenido de fluido, menor ecogenicidad del tejido (Evans et al., 1996; Giffin et al., 2009; Pierson y Adams, 1995). Una imagen US está formada por miles de elementos de imagen o píxeles. Cada pixel representa el reflejo del tejido y puede asumir uno de los 256 tonos

de grises, que van desde el negro (0) al blanco (255) (Carnevale, Checura, Coutinho, Adams y Pierson 2002; Giffin et al., 2009; Pierson y Adams, 1995; Singh, Adams y Pierson, 2003). Las US son afectadas por diferentes condiciones, colocando limitaciones en la precisión de la interpretación de las imágenes y el análisis de píxeles. Una de estas condiciones es la configuración diferente del ultrasonido, es decir, la ganancia principal, cercana y lejana, los puntos focales, etc. Estos ajustes están bajo el control directo del operador y, según como se requieran, pueden ser manipulados o ser mantenidos constantes (Giffin et al., 2009). La ultrasonografía es una técnica no invasiva que ha permitido la evaluación de la anatomía normal de los testículos en diferentes especies (Evans et al., 1996). Es una herramienta segura para la evaluación testicular, pues estudios realizados indican que es posible obtener una imagen del parénquima testicular sin alterar la calidad y cantidad de espermatozoos, la circunferencia escrotal o la consistencia testicular (Coulter y Bailey, 1988).

El testículo aparece como una estructura homogénea y moderadamente ecogénica con un mediastino testicular situado centralmente, representado por una línea hiperecogénica en las imágenes tomadas en el plano longitudinal y por un terreno casi circular en las imágenes transversales (Figuras 3 y 4) (Ahmad, Noakes y Subandrio, et al., 1991).

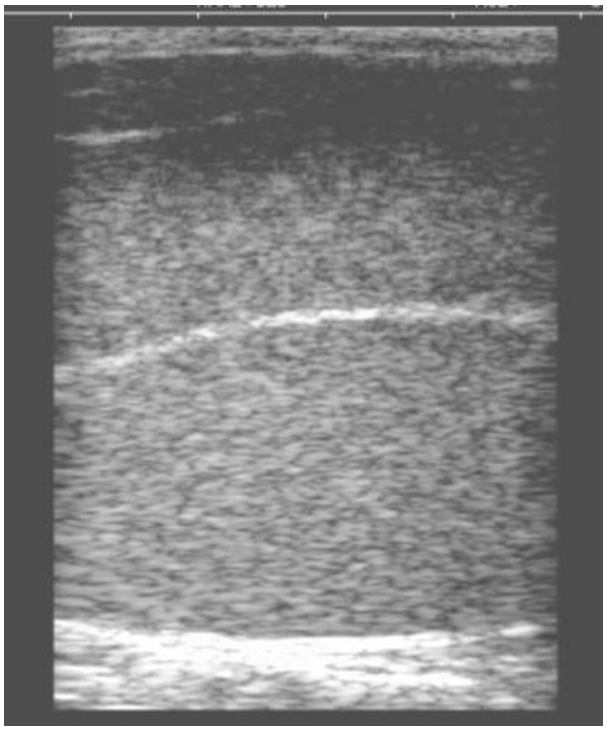

Figura 3. Imagen US del parénquima testicular en un corte longitudinal de un carnero (Fuente: imagen tomada en el marco de la presente tesis).

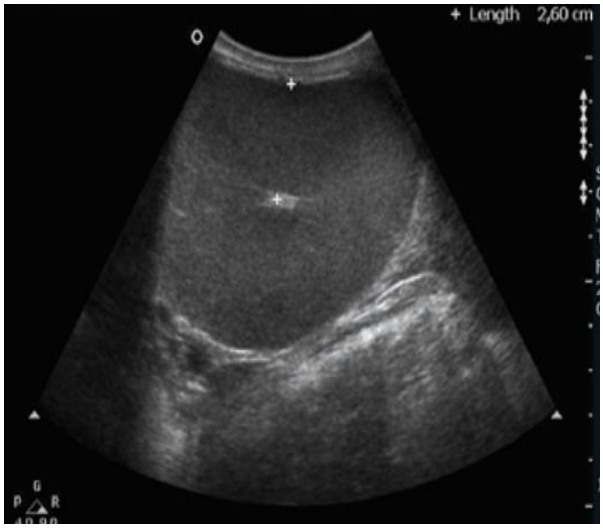

Figura 4. Imagen US del parénquima testicular en un corte transversal de un jabalí (Liepa et al., 2014)

El uso de la escala de grises de las imágenes US se utiliza para la evaluación microestructural y funcional de los órganos de la reproducción (Chandolia et al., 1997; Evans et al., 1996; Giffin et al., 2009; Ülker et al., 2005). El ojo humano puede percibir claramente la variación de tonos de grises pero sólo puede distinguir entre 18 a 20 tonos de gris (Baxes, 1994 citado por Singh et al., 2003). El análisis computarizado de imágenes US digitales ofrece un método sensible y objetivo de cuantificar la ecogenicidad del tejido, con la capacidad de detectar cambios en las estructuras que anteriormente sólo eran visualizados por la histología (Giffin et al., 2009). En este sentido, es uno de los avances tecnológicos que permiten el uso de la ultrasonografía como herramienta biomédica más amplia (Brito, Silva, Barbosa, Unanian y Kastelic, 2003).

Los cambios en la ecogenicidad testicular (intensidad de píxeles) están relacionados con cambios en la histomorfología (Giffin et al., 2009) y la hemodinámica testicular (Hedia y El-Belely, 2021).

3. HIPÓTESIS

La aplicación de múltiples administraciones de GnRH a bajas dosis durante un día aumenta la temperatura rectal, perineal y escrotal; y disminuye la ecogenicidad del parénquima testicular de carneros.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de múltiples administraciones de GnRH a bajas dosis sobre la temperatura rectal, perineal y escrotal; y mediante análisis de imágenes ultrasonográficas sobre el fluido testicular de carneros.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar la relación de las administraciones de GnRH sobre la temperatura rectal, perineal y escrotal.

- Determinar el efecto de la GnRH sobre la ecogenicidad del parénquima testicular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en el Departamento de Fisiología (Facultad de Veterinaria, Montevideo-Uruguay, 35º S), entre los meses de mayo y junio, durante la estación reproductiva tardía de carneros. Para seleccionar los animales del ensayo se efectuó un examen objetivo general y particular del aparato reproductivo de los carneros con el objetivo de descartar anormalidades. La muestra se conformó por 14 carneros cruza (Corriedale x Milchschaf) de un año de edad, con un peso promedio de 47,4 ± 1,6 Kg. El diseño de este experimento fue de grupos cruzados con determinaciones repetidas. Dichos carneros fueron asignados al azar a uno de los dos siguientes grupos (n=7):

Grupo Control - Sin administración de GnRH.
Grupo GnRH - Con administración de GnRH.

Luego de transcurrida una semana se invirtieron los grupos, tratando los controles con GnRH y viceversa. De este modo se evitaron la influencia de los efectos día e individuo.

5.2 Manejo de los animales

El protocolo realizado para el manejo animal está aprobado por el expediente Nº 111130-00288-13 de CHEA. En cuanto al manejo sanitario se contempló que los carneros se encontraban con la sanidad correspondiente para dicha categoría (vacuna contra Clostridiosis y antiparasitarios internos y externos).

Ambos grupos estuvieron alojados y alimentados juntos en un corral de 5 por 3 metros con piso de cemento y era apartado el animal a manipular momentáneamente. Los animales se alimentaron con aproximadamente un promedio de 355 gr. de alfalfa, 110 gr. de maíz y 38 gr. de soja por animal, manteniendo una asignación estable; fraccionando dicha dieta en dos administraciones al día y contaron con libre acceso al agua. Previo a comenzar el ensayo experimental se realizó esquila en zona escrotal y ventral del cuello.

5.3 Registros

Ambos grupos fueron manejados simultáneamente para evitar efectos ambientales, así como también influencias del ritmo circadiano. En cada examen, los carneros estaban en la misma secuencia y se llevaron a cabo los mismos procedimientos. Como se esquematiza en el cronograma de la Figura 5, se consideró como hora 0 el inicio del tratamiento de GnRH. Los registros de temperaturas y la toma de imágenes US fueron realizados en las horas: menos una, cero, una, dos, cuatro, siete y diez.

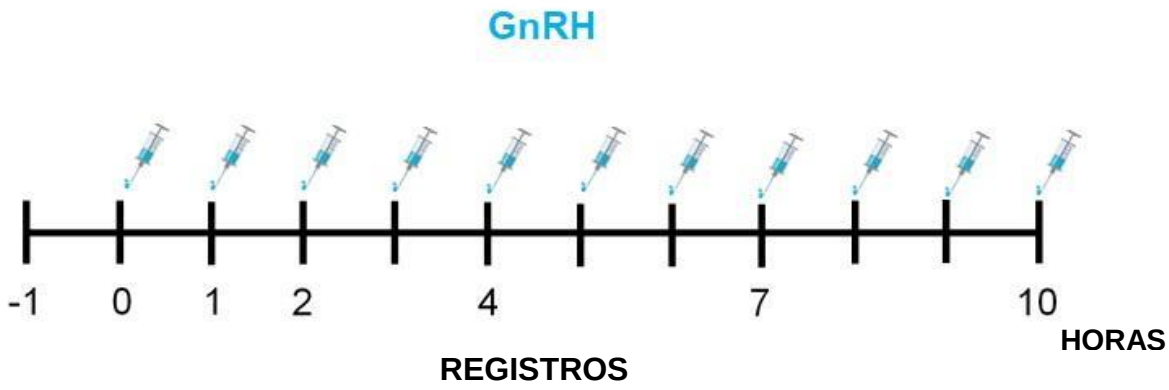

Figura 5. Cronograma de muestreo: las jeringas esquematizan las administraciones de acetato de buserelina al grupo GnRH y los números indican el tiempo (h) de los registros de las temperaturas y las imágenes US en todos los animales.

5.3.1 Registros de temperatura

Se registró la temperatura rectal con un termómetro de mercurio y las temperaturas de la región perineal y escrotal por medio de un termómetro láser (IR-102 Infrared Thermometer; Super Elec. Equip Co., Shanghai, China). En cuanto a la temperatura escrotal, se midió en la cara anterior de cada testículo, en zonas craneal, media y caudal. Los registros de temperaturas se realizaron siempre previo al estudio ultrasonográfico para disminuir interferencias provocadas por dicho procedimiento.

5.3.2 Imágenes US testiculares

Se utilizó un equipo de ultrasonografía modo-B, modelo Wed 9618V (Welld, Guangdong, China), con un transductor lineal de 7.5 MHz. Con el animal sentado se efectuaron las ultrasonografías en ambos testículos en su cara lateral, en corte longitudinal tomándose como referencia el rafe medio, como se muestra en la Figura 6. Para ello previo a realizar las ultrasonografías se aplicó una capa de aproximadamente 0,5 cm de gel de Carboxi-metil-celulosa de consistencia semilíquida sobre la piel escrotal para posibilitar un buen contacto con el transductor. Los valores de ganancia total, cercana y lejana, fueron estandarizados en valores predeterminados, a los efectos de normalizar los atributos de las imágenes US para evitar que incidieran en el análisis de las mismas. Por la misma razón, todas las ultrasonografías fueron realizadas por el mismo operador. Posterior a cada estudio ultrasonográfico se realizó el secado de la piel escrotal, utilizando toallas de papel, para disminuir las interferencias en la temperatura de la misma.

Figura 6. Registro de imágen US del parénquima testicular en su cara lateral (Fuente: elaboración propia).

Las imágenes fueron congeladas y guardadas en la memoria del equipo. Posteriormente las imágenes US se evaluaron con un software específico (Imagen Proplus 3.01; Media Cybernetics, LA, USA), utilizando la técnica de medición puntual, descripta por Pierson y Adams (1995). La misma consistió en la selección de 4 zonas circulares (1cm de diámetro), en lugares iguales para todas las imágenes, como muestra la Figura 7. En esas zonas se midió la intensidad de pixeles del parénquima testicular, en una escala de 1 (negro) a 255 (blanco). Se realizó un promedio por

carnero de los píxeles obtenidos en las 4 zonas de ambos testículos en cada registro; quedando así un valor por carnero en cada momento del ensayo.

Figura 7. Método de medición de píxeles: Ultrasonografía del parénquima testicular de un carnero. Los círculos indican los sitios de medición de píxeles (Fuente: elaboración propia).

5.4 Administración de GnRH

El principio activo utilizado fue acetato de buserelina, el cual es un análogo de GnRH (GnRH®, Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina). A los carneros del grupo GnRH se les administraron dosis de 7 ng/animal a través de la vía intravenosa en la vena yugular, en la zona media del cuello. Se utilizaron jeringas de 1ml con agujas 21G (0,8mm x 40mm) y previo a cada dosificación se realizó desinfección de la zona con alcohol. Fueron realizadas dosificaciones seriadas cada una hora, totalizando 11 administraciones por animal. La dosificación fue basada en el trabajo de Tasende, Meikle, Rodríguez-Piñón, Forsberg y Garófalo (2002).

5.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, tanto la intensidad de píxeles como las distintas temperaturas fueron comparadas entre ambos grupos mediante un análisis de varianza con medidas repetidas en el tiempo, incluyendo los efectos del tratamiento, el tiempo y sus interacciones. Se realizó prueba de rango *Post hoc* con el test de LSD. El análisis se evaluó por medio de STATA 11 (StataCorp LP, College Station, TX, USA). Los valores se analizaron como media ± error estándar y se consideró como diferencia significativa a valores de $p<0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Temperaturas de los carneros de ambos grupos

La temperatura perineal (34,02 ± 0,2°C) no se afectó por el tratamiento ni por el tiempo (p>0,1). La temperatura rectal se incrementó luego de 4 h de comenzado el tratamiento (13:00 h) (p<0,0001) y sin diferencias entre ambos grupos (Figura 8a).

Tanto las temperaturas craneales, medias y caudales de la superficie escrotal no se vieron afectadas por el tratamiento (p>0,1), las cuales se presentan agrupadas en la Figura 8b. La temperatura craneal de la superficie escrotal no fue afectada por el tratamiento ni el tiempo (p>0,1). La temperatura en la superficie escrotal media disminuyó significativamente 2 horas después de que comenzó el tratamiento (11:00 h), y permaneció baja 2 horas (p<0,0001). En cuanto a la temperatura de la superficie escrotal caudal, fue mayor en la primera medición, disminuyó a las 0 y 1 h (p<0,0001) y aumentó nuevamente a las 4 y 7 h (13:00 y 16:00 h) con una p<0,05.

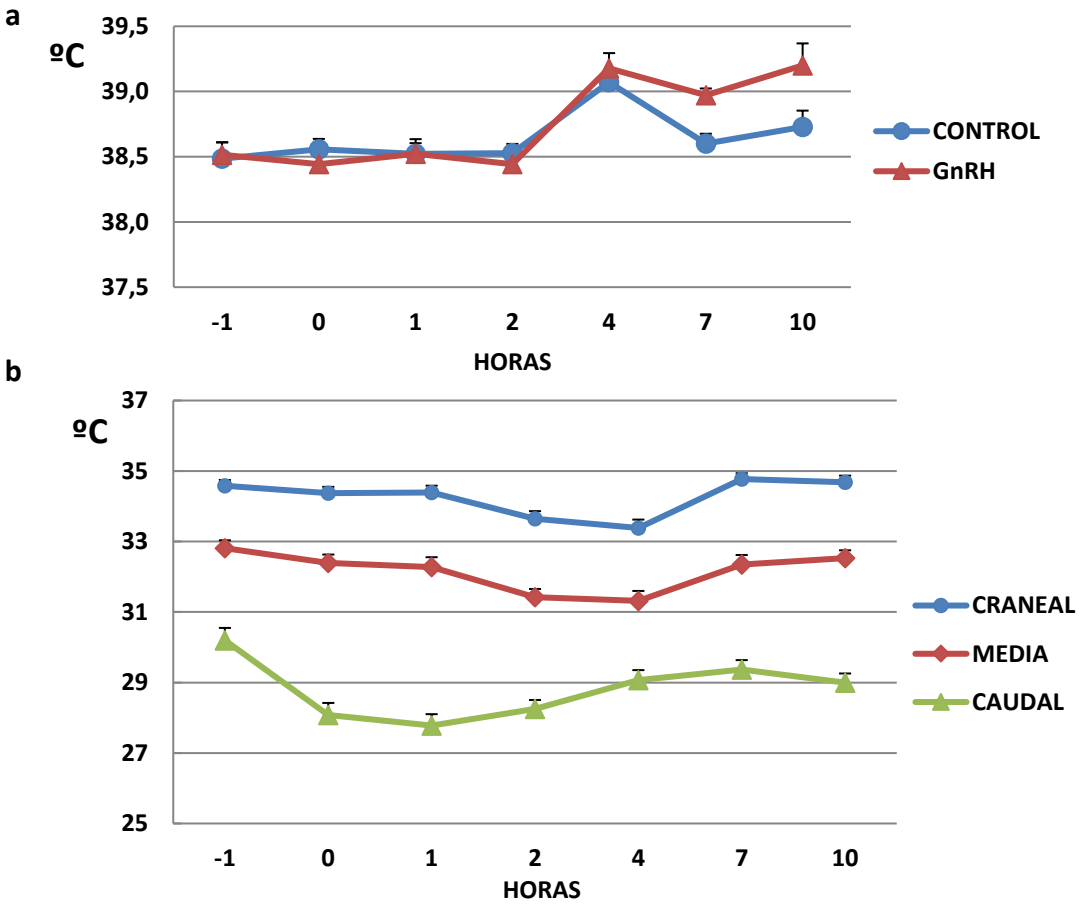

Figura 8. a. Temperatura rectal de ambos grupos. **b.** Temperaturas de superficie escrotal; datos agrupados de ambos grupos. Tomándose como hora 0 el comienzo del tratamiento.

6.2 Ecogenicidad testicular de los carneros de ambos grupos

Tal como se muestra en la Figura 9, a través de las mediciones de ecogenicidad testicular de ambos grupos (GnRH y control), se observó una diferencia entre los grupos que fue significativa a partir de las dos horas de comenzado el tratamiento ($p<0,0001$). La intensidad de pixeles a lo largo del tiempo en los animales tratados mostró una disminución ($p<0,0001$), la que comenzó luego de transcurrida una hora del inicio del tratamiento.

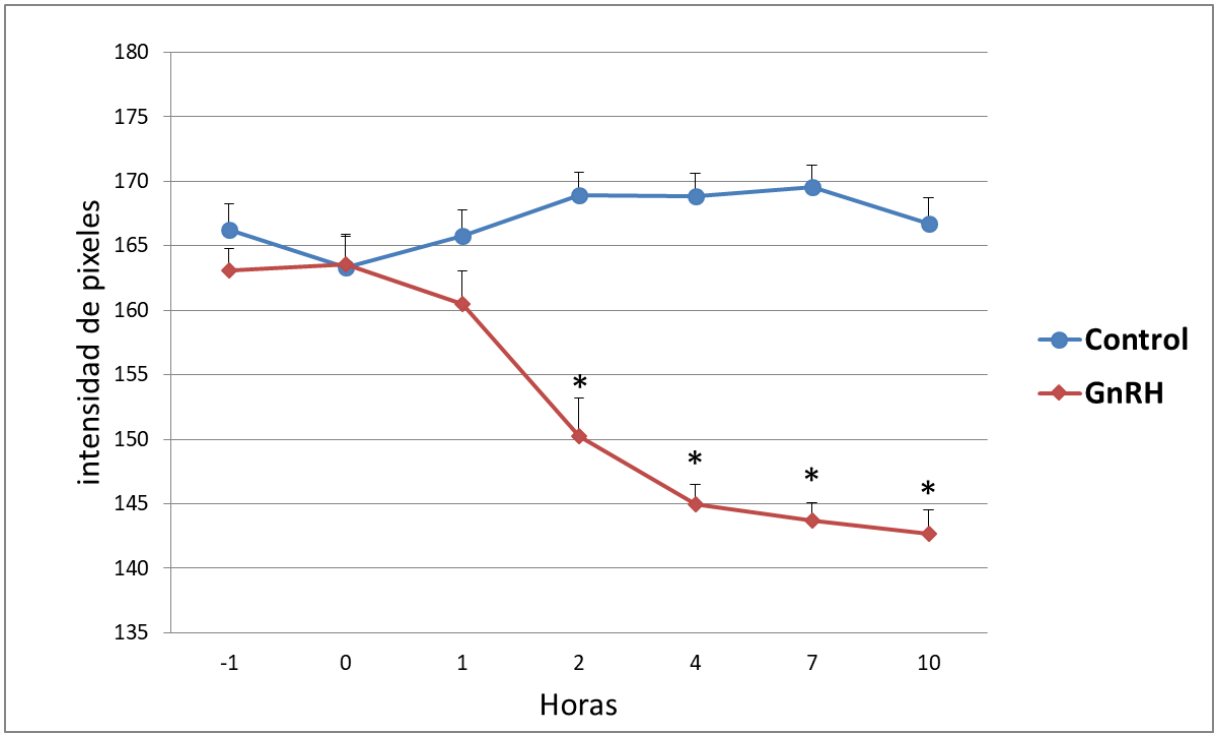

Figura 9. Intensidad de pixeles de las ultrasonografías testiculares de ambos grupos. Tomándose como hora 0 el comienzo del tratamiento. * Indica diferencias significativas entre grupos ($p<0,0001$).

7. DISCUSIÓN

7.1 Efecto de GnRH sobre las temperaturas

Con respecto a las temperaturas, no se observaron cambios relacionados con la administración de GnRH. El ligero aumento (aproximadamente 0,5ºC) de la temperatura rectal se observó a la hora 4, el que coincidió con el muestreo con la mayor temperatura ambiental (13:00 h), y no estuvo relacionado con el tratamiento. No se observaron cambios en la temperatura de la superficie del escroto entre ambos grupos. Si bien se registraron algunas variaciones a lo largo del tiempo en algunas zonas de la superficie escrotal (sobre todo en zona caudal), dichas diferencias no se correlacionan a ningún evento fisiológico ni ambiental. Una posible explicación es el instrumento utilizado para dicha medición, que no tiene una precisión adecuada como por ejemplo la cámara termográfica infrarroja. Por lo que sería interesante evaluar a través de una cámara termográfica, si existen cambios en la temperatura tras la administración de GnRH. Ya que existen reportes de aumentos de temperatura escrotal asociados a una única dosis de GnRH (Gábor et al., 1998), quienes utilizaron diferentes análogos, dosis y vías de administración con respecto a nuestro ensayo, lo que pudo afectar los resultados. Se describen aumentos de temperatura escrotal (medido con termómetro láser) en carneros asociados con disminución en la intensidad de píxeles, los cuales fueron detectados posterior a la actividad sexual (Ungerfeld y Fila, 2012). Este aumento en la temperatura escrotal fue acompañado con aumento en temperatura rectal y perineal. Lo que puede indicar que los aumentos en la temperatura escrotal están relacionados a la actividad física propiamente dicha y no asociado a cambios en la irrigación testicular. Por otra parte, recientemente se ha reportado la administración de buserelina en carneros con aumento en las concentraciones de testosterona sin detección de cambios en la temperatura escrotal, medida por termografía (Ungerfeld et al., 2023).

7.2 Efecto de GnRH sobre la ecogenicidad testicular

En este experimento hemos demostrado que tras las múltiples administraciones de dosis bajas de GnRH, se produjo una reducción progresiva de la ecogenicidad del parénquima testicular. Dicha disminución de la ecogenicidad ocurre como consecuencia de una menor intensidad de píxeles (Evans et al., 1996). Esta respuesta fue rápida, ya que las diferencias entre animales tratados y control eran evidentes incluso 1 h después de la primera administración de GnRH.

Como lo describen Midgley, et al. (1997) cada uno de los pulsos episódicos de GnRH se asocia directamente con un pulso posterior de LH en el plasma, que se produce en pocos minutos. En nuestro estudio, se administraron dosis continuas de GnRH en busca de producir un estímulo de secreción continua de LH sin provocar picos de esta. Dado que en el presente estudio se utilizaron las mismas dosis que Tasende et al. (2002), quienes determinaron las concentraciones de LH, es esperable la ausencia de picos de dicha hormona, a pesar de no haber evaluado su concentración.

Como ya se mencionó anteriormente, existe una alta correlación entre el aumento de LH y la secreción de T por lo cual consideramos que hubiera sido de gran importancia la medición de esta última para evaluar la respuesta endocrina de la GnRH administrada. Si bien no hemos encontrado artículos que evalúen los efectos de la GnRH en machos a dosis tan bajas como la utilizada en nuestro ensayo, existen trabajos posteriores al nuestro que respaldan esta teoría. Se ha reportado aumento del FST tras la administración de buserelina, medido por ultrasonografía Doppler (El-Shalofy y Hedia, 2021). Al igual que Samir et al. (2015) quienes describen incremento del FST por administración de GnRH evaluado a través del mismo método. Ambos trabajos describen la acción indirecta de la GnRH, a través del estímulo de la secreción de LH y a su vez de T, refiriendo a una alta correlación positiva entre las concentraciones de T y el FST. También se ha descripto un aumento de la perfusión testicular (registrada por ultrasonografía Doppler) luego de la administración de hCG con una correlación significativa con la concentración de T (Pozor, 2007). Vale destacar el valor de la ultrasonografía Doppler que en la actualidad es una de las técnicas más sencillas y precisas para estimar el FST (Velasco y Ruiz, 2021), con la cual no contábamos en el momento de nuestro ensayo. La reducción de la ecogenicidad testicular (intensidad de píxeles) podría deberse al mayor flujo sanguíneo en los tejidos testiculares después del tratamiento (El-Shalofy, Shahat y Hedia, 2022; Samir et al., 2023). Los aumentos en la perfusión sanguínea pueden provocar aumentos en los fluidos intratesticulares que, a su vez, reducen la intensidad de los píxeles de la ecotextura (Samir et al., 2023). Por el contrario, Samir et al. (2023) describen dicha reducción de píxeles sin cambios significativos en las concentraciones de T y la vinculan a aumentos de E2 y NO provocados por una única administración de FSH de acción prolongada. Una de las razones que explicaría por qué obtuvimos una respuesta en la mitad del tiempo que Samir et al. (2015) (1 h y 2 h respectivamente) es la vía intravenosa que utilizamos en comparación con la administración intramuscular en el otro estudio. Además, en ambos estudios se utilizaron diferentes análogos de GnRH.

La regulación del flujo sanguíneo testicular es un proceso complejo en el cual existen muchos factores responsables de dicho control y aún no está completamente identificado. Por lo que es posible que uno de los tantos mecanismos de regulación de la hemodinámica testicular sea mediada por LH a través de la T. A pesar de que la cantidad de líquido no se puede medir mediante ultrasonido, las diferencias observadas en paralelo entre ambos grupos podrían indicar que los carneros tratados con GnRH tenían mayor irrigación del parénquima testicular que los machos no tratados.

Tras todo lo estudiado creemos de gran utilidad investigaciones adicionales de la acción de la GnRH sobre la hemodinámica testicular. Estos cambios en la circulación testicular pueden resultar en una mejora en el potencial de fertilidad en los carneros, especialmente durante la temporada no reproductiva, a través de influencias positivas sobre el FST y a su vez sobre la espermatogénesis.

8. CONCLUSIÓN

En nuestro diseño experimental no se observaron cambios asociados al tratamiento con GnRH sobre la temperatura rectal, perineal y escrotal.

Las múltiples dosis bajas de GnRH disminuyeron la ecogenicidad del parénquima testicular de carneros, lo que podría deberse a un aumento del fluido testicular.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad, N., Noakes, D.E., y Subandrio, A.L. (1991). B-mode real time ultrasonographic imaging of the testis and epididymis of sheep and goats. *Veterinary Record*, 128(21), 491-496.

Aitken, R.J. (1999). The Amoroso Lecture. The human spermatozoon–a cell in crisis? *Journal Reproduction and Fertility*, 115(1), 1-7.

Arendt, J. (1998). Melatonin and pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Review of Reproduction*, 3, 13-22.

Assmus, M., Svechnikov, K., Von Euler, M., Setchell, B., Sultana, T., Zetterström, C., … Söder, O. (2005). Single subcutaneous administration of chorionic gonadotropin to rats induces a rapid and transient increase in testicular expression of pro-inflammatory cytokines. *Pediatric Research*, 57(6), 896-901.

Bergh, A., Damber, J.E., Lieu, L., y Widmark, A. (1992). Does follicle-stimulating hormone or pregnant mare serum gonadotrophin influence testicular blood flow in rats? *International Journal Andrology*, 15, 365-371.

Bergh, A., Damber, J.E., y Widmark, A. (1990). A physiological increase in LH influence vascular permeability in the rat testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 89, 23-31.

Bielli, A. (2002). Regulación hormonal de la función reproductiva en el macho., En R. Ungerfeld, *Reproducción en los Animales Domésticos* (Vol. 1, pp.79-92). Montevideo: Melibea.

Brito, L. F., Silva, A.E., Barbosa, R.T., Unanian, M.M., y Kastelic, J.P. (2003). Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in Bos Indicus X Bos Taurus bulls. *Animal Reproduction Science*, 79, 1-15.

Cardellino, R. (2008, marzo). Una posibilidad cierta para Uruguay. *El País Agropecuario*. Recuperado de http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/10834/1/157.pdf

Cardellino, R. (2018, mayo). El mercado de la lana y su efecto en la producción ovina uruguaya. *El País Agropecuario*, 22-24.

Carnevale, E.M., Checura, C.M., Coutinho, M.A., Adams, G.P., y Pierson, R.A. (2002). Use of computer-assisted image analysis to determine the interval before and after ovulation. En *Proceedings of the annual convention of American Association of Equine Practitioners* (Vol. 48, pp.48-50). Orlando: AAEP.

Castrillejo, A. (1990). Relevamiento clínico de aptitud reproductiva en carneros. *Veterinaria*, 26(108), 12-19.

Červeny, C., König, H.E., y Liebich, H.G. (2005). Órganos genitales masculinos. En H.E. König y H.G. Liebich, *Anatomía de los Animales Domésticos* (V. 2, pp. 119-134). Buenos Aires: Panamericana.

Chandolia, R.K., Honaramooz, A., Omeke, B.C., Pierson, R., Beard, A.P., y Rawlings, N.C. (1997). Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. *Theriogenology,* 48(1), 119-132.

Chenault, J.R., Kratzer, D.D., Rzepkowski, R.A., y Goodwin, M.C. (1990). LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. *Theriogenology,* 34(1), 81-98.

Coulter, G., y Bailey, D. (1988). Effects of ultrasonography on the bovine testis and semen quality. *Theriogenology,* 30(4), 743-749.

Dahl, E.V., y Herrick, J.F. (1959). A vascular mechanism of maintaining testicular temperature by counter-current exchange. *Surgery Ginecology and Obstetrics,* 108, 697-705.

Damber, J.E., Bergh, A., Fagrell, B., Lindahl, O., y Rooth, P. (1986). Testicular microcirculation in the rat studied by videophotometric capillaroscopy, fluorescence microscopy and laser Doppler flowmetry. *Acta Physiolologica Scandinavica,* 126, 371-376.

De Barbieri, I., Blumetto, O., Navajas, E., Luzardo, S., Montossi, F., y Ciappesoni, G. (2022) *Valorización de la producción ovina: animales, personas y ambiente. Actualización de la producción ovina* (pp. 32-37). Bariloche: Instituto Nacional Tecnología Agropecuaria.

Domínguez, Z. (2006). Los prostanoides, una revolución autacoide. *Anales Venezolanos de Nutrición,* 19(2), 74-84.

Dyce, K.M., Sack, W.O., y Wensing, C.J.G. (2010). Pelvis y órganos reproductores de los rumiantes. En K.M, Dyce, *Anatomía veterinaria* (pp. 698-727). México: Manual Moderno.

El-Shalofy, A.S., Shahat, A.M., y Hedia, M.G. (2022). Effects of melatonin administration on testicular hemodynamics, echotexture, steroids production, and semen parameters during the non-breeding season in Ossimi rams. *Theriogenology*, 184, 34-40.

El-Shalofy, A.S., y Hedia, M.G. (2021). Effects of buserelin administration on testicular blood flow and plasma concentrations of testosterone and estradiol-17β in rams. *Domestic Animal Endocrinology*, 77, 1-6.

Evans, A.C.O., Pierson, R.A., Garcia, A., McDougall, L.M., Hrudka, F., y Rawlings, N.C. (1996). Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. *Theriogenology,* 46, 345-357.

Fawcett, D.W., Neaves, W.B., y Flores, M.N. (1973). Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction*, 9, 500-532.

Fraser, H.M., y Lincoln, G.A. (1980). Effects of chronic treatment with an LHRH agonist on the secretion of LH, FSH and testosterone in the ram. *Biology of Reproduction*, 22, 269-276.

Freitas Rocha, E., Freitas Francelino Dias, R., Galvão de Souza, J., Soares dos Santos, J.R, de Assis Silva, G. Barbosa Roberto, J.V., … Ayres de Menezes, D.J. (2018). Scrotum bipartite in sheep as a parameter indicative of adaptation to semi-arid climates: A thermographic and reproductive study. *Theriogenology*, 121, 91-96.

Gábor, G., Sasser, R.G., Kastelic, J.P., Coulter, G.H., Everson, D.O., Falkay, G., … Szasz, Jr. F. (1998). Endocrine and thermal responses to GnRH treatment and prediction of sperm output and viability in Holstein-Friesian breeding bulls. *Theriogenology*, 50, 177-183.

Giffin, J., Franks, S., Rodriguez-Sosa, J., Hahnel, A., y Bartlewski, P. (2009). A study of morphological and haemodynamic determinants of testicular echotexture characteristics in the ram. *Experimental Biology and Medicine*, 234, 794-801.

Ginther, O.J. (1986). Introduction. En *Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare* (pp.1-7). Cross Plains: Equiservices.

Gómez-Brunet, A., Santiago-Moreno, J., Toledano-Oraz, A., y López-Sebastián, A. (2012). Reproductive seasonality and its control in Spanish sheep and goats. *Tropical and Subtropical Agroecosystems,* 15(S1), S47-S70.

Hafez, E.S.E. (1952). Studies on the breeding season and reproduction of the ewe. *Journal of Agricultural Science*, 42, 189-265.

Hedia, M.G., y El-Belely, M.S. (2021). Testicular morphometric and echotextural parameters and their correlation with intratesticular blood flow in Ossimi ram lambs. *Large Animal Review*, 27, 77-82.

Herwig, R., Tosun, K., Pinggera, G. M., Soelder, E., Moeller, K. T., Pallwein, L., … Illmensee, V. (2004). Tissue perfusion essential for spermatogenesis and outcome of testicular sperm extraction (TESE) for assisted reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 21(5), 175-180.

Intaglietta, M. (1981). Vasomotion activity, time-dependent fluid exchange and tissue pressure. *Microvascular Research*, 21, 153-164.

Kastelic, J.P., Cook, R.B., y Coulter, G.H. (1996). Contribution of the scrotum and testes to scrotal and testicular thermoregulation in bulls and rams. *Journal of Reproduction and Fertility,* 108, 81-85.

Kastelic, J. P., Rizzoto, G., y Thundathil, J. (2018). Review: Testicular vascular cone development and its association with scrotal thermoregulation, semen quality and sperm production in bulls. *Animal*, 12(S1), S133-S141.

Kay, G.W., Grobbelaar, J.A.N., y Hattingh, J. (1992). Effect of surgical restriction of growth of the testicular artery on testis size and histology in bulls. *Journal of Reproduction and Fertility*, 96(2), 549-553.

Liepa, L., Bruveris, Z., Mangale, M., Duritis, I., Antane, V., y Auzans, A. (2014). The biopsy of boar testes using ultrasonographic examination. *Macedonian Veterinary Review*, 37(1), 69-74.

Matteo, M., Cicinelli, E., Sciorsci, R.L., Grandone, E., Cardo, G., Colaizzo, D., … Greco, P. (2006). Expression and hormonal modulation of the thromboxane A2 receptor gene in mammalian testicular arteries. *Fertility and Sterility*, 85(1), 1276-1280.

McLeod, B.J., Haresign, W., y Lamming, G.E. (1982). Response of seasonally anoestrous ewes to small-dose multiple injections of Gn-RH with and without progesterone pretreatment. *Journal of Reproduction and Fertility*, 65, 223-230.

Megías Pacheco, M., Molist García, P., y Pombal Diego, M.A. (2017). *Atlas de histología vegetal y animal*. Vigo: Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Facultad de Biología, Universidad de Vigo. Recuperado de https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/reproductor-tubulos.php

Midgley Jr., A.R., McFadden, K., Ghazzi, M., Karsch. F.J., Brown, M.B., Mauger, D.T., y Padmanabhan, V. (1997). Nonclassical secretory dynamics of LH revealed by hypothalamo–hypophyseal portal sampling of sheep. *Endocrine*, 6(2), 133-143.

Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2022a). *Anuario Estadístico Agropecuario 2022*. Montevideo: DIEA. Recuperado de https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2022/O_MGAP_Anuario_estad%C3%ADstico_%202022-DIGITAL.pdf

Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2022b). *Datos Preliminares basados en la Declaración Jurada de Existencias DICOSE-SNIG 2022*. Recuperado de https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/datos-preliminares-basados-declaracion-jurada-existencias-dicose-snig-2022

Ortmann, O., Weiss, J.M., y Diedrich, K. (2002). Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH agonists: mechanisms of action. *Reproductive BioMedicine*, 5(1), 1-7.

Park, J.Y., Pillinger, M.H., y Abramson, S.B. (2006). Prostaglandin E2 synthesis and secretion: The role of PGE2 synthases. *Clinical Immunology*, 119, 229-240.

Parlevliet, J.M., Bevers, M.M., Van de Broek, J., y Colenbrander, B. (2001). Reproduction: Effect of GnRH and hCG administration on plasma LH and testosterone concentrations in normal stallions, aged stallions and stallions with lack of libido. *Veterinary Quarterly*, 23(2), 84-87.

Pierson, R.A., y Adams, G.P. (1995). Computer-assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bedfellows. *Theriogenology*, 43, 105-112.

Pozor, M.A. (2007). Evaluation of testicular vasculature in stallions. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 6, 271-277.

Ramos, J.F. (2023a). Alternativas de mejora para sistemas productores de lanas medias. *Ovinos Sul* (193), 4-7.

Ramos, J.F. (2023b). Campo extensivo. Transferencia de tecnología ¿Ganadería sin ovino? *Ovinos Sul* (193), 8-10.

Robertshaw, D., y Vercoe, J. (1980). Scrotal thermoregulation of the bull (Bos sp.). *Australian Journal of Agricultural Research,* 31, 401-407.

Robles, C.A. (2004). *Salud reproductiva del carnero*. Bariloche: INTA-EEA.

Romano, J.E., y Brinsko, S.P. (2013). Reproductive physiology of the male. En G.K. Bradley (Ed.), *Cunningham's textbook of veterinary physiology* (pp. 451-459). St Louis: Elsevier.

Ruckebusch, Y., Phaneuf, L.P., y Dunlop, R. (1994). Hormonas de la adenohipófisis. En *Fisiología de pequeños y grandes animales* (pp. 619-630). México: El Manual Moderno.

Rudolfsson, S.H., Johansson, A., Lissbrant, I.F., Wikström, P., y Bergh, A. (2003). Localized expression of angiopoietin 1 and 2 may explain unique characteristics of the rat testicular microvasculature. *Biology of Reproduction*, 69, 1231-1237.

Rudolfsson, S.H., Wikström, P., Jonsson, A., Collin, O. y Bergh, A. (2004). Hormonal regulation and functional role of vascular endothelial growth factor A in the rat testis. *Biology of Reproduction*, 70, 340-347.

Samir, H., El-Shalofy, A.S., y El-Sherbiny, H.R. (2023). Effects of a single dose of long-acting FSH on testicular blood flow, testicular echotexture, and circulating testosterone, estradiol, and nitric oxide in rams during the non-breeding season. *Domestic Animal Endocrinology*, 82, 1-8.

Samir, H., Mandou, A.S., Radwan, F., Ahmed, A.E., Momenah, M.A., Aldawood, N.A., … El-Sherbiny, H.R. (2023). Effect of acute Melatonin injection on metabolomic and testicular artery hemodynamic changes and circulating hormones in Shiba goats under sub-tropical environmental conditions. *Animals,* 13(11), 1-16.

Samir, H., Sasaki, K., Ahmed, E., Karen, A., Nagaoka, K., El Sayed, M., … Watanabe, G. (2015). Effect of a single injection of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and human chorionic gonadotropin (hCG) on testicular blood flow measured by color Doppler ultrasonography in male Shiba goats. *Journal of Veterinary Medical Science,* 77(5), 549-556.

Schanbacher, B.D., y Lunstra, D.D. (1977). Acute and chronic effects of gonadotropin releasing hormone on reproductive characteristics of rams during the nonbreeding season. *Journal of Animal Science*, 44(4), 650-655.

Seguin, B.E., Oxender, W.D., y Britt, J.H. (1977). Effect of human chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone on corpus luteum function and oestrous cycle duration in dairy heifers. *American Journal of Veterinary Research*, 38(8), 1153-1156.

Setchell, B.P. (1998). The Parkes Lecture. Heat and the testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 114(2), 179-194.

Setchell, B.P., y Sharpe, R.M. (1981). The effect of injected human chorionic gonadotrophin on capillary permeability, extracellular fluid volume and the flow of lymph and blood in the testes of rats. *Journal of Endocrinology*, 91, 245-254.

Sharpe, R.M. (1980). Temporal relationship between interstitial fluid accumulation and changes in gonadotropin receptor numbers and steroidogenesis in the rat testis. *Biology of Reproduction*, 22, 851-857.

Sharpe, R. M. (1983). Local control of testicular function. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, 68, 265-287.

Sharpe, R. M. (1984). Intratesticular factors Controlling testicular function. *Biology of reproduction*, 30, 29-49.

Singh, J., Adams, G., y Pierson, R. (2003). Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. *Animal Reproduction Science*, 78, 371-399.

Smith, M.J., y Jennes, L. (2001). Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction*, 122, 1-10.

Tasende, C., Meikle, A., Rodríguez-Piñón, M., Forsberg, M., y Garófalo, E.G. (2002). Estrogen and progesterone receptor content in the pituitary gland and uterus of progesterone-primed and gonadotropin releasing hormone-treated anestrous ewes. *Theriogenology,* 57(6), 1719-1731.

Toth, P., Li, X., Rao, Ch.V., Lincoln, S.R., Sanfilippo, J.S., Spinnato, J.A. II, y Yussman, J.A. (1994). Expression of functional human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptor gene in human uterine arteries. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 79, 307-315.

Ülker, H., Kanter, M., Gökdal, Ö., Aygün, T., Karakuş, F., Sakarya, M.E., … Reeves, J.J. (2005). Testicular development, ultrasonographic and histological appearance of the testis in ram lambs immunized against recombinant LHRH fusion proteins. *Animal Reproduction Science*, 86, 205-219.

Ungerfeld, R. (2002). Termorregulación testicular. En *Reproducción en los Animales Domésticos* (Vol.1, pp.113-118). Montevideo: Melibea.

Ungerfeld, R., Guerrero, M., Pinto-Santini, L., Giriboni, J., Pantoja, M., Fila, D., y Ackerman, S. (2023). Shearing rams in winter triggers an increase in testosterone basal concentrations and a greater response to a GnRH challenge, which are unrelated to scrotal temperature. *Animal-Science Proceedings*, 14, 431.

Ungerfeld, R., y Fila, D. (2012). Testicular Fluid Content and Scrotal Surface Temperature Increase with Rams Sexual Activity. *Reproduction in Domestic Animals,* 47, 56-58.

Ungerfeld, R., y Silva, L. (2004): Ewe effect: endocrine and testicular changes in experience adult and inexperienced young Corriedale rams used for the ram effect. *Animal Reproduction Science*, 80, 251-259.

Velasco, A., y Ruiz, S. (2021). New approaches to assess fertility in domestic animals: relationship between arterial blood flow to the testicles and seminal quality. *Animals*, 11(1), 12, 1-13.

Waites, G.M.H. (1962). The effect of heating the scrotum of the ram on respiration and body temperature. *Quarterly Journal of Experimental Physiology,* 47, 314-323.

Waites, G.M.H. (1970). Temperature regulation and the testis. En A.D. Johnson, W.R. Gomes y N.L. Vandemark (Eds.), *The testis* (pp. 241-279). New York: Academic Press.

Waites, G.M.H., y Moule, G.R. (1961). Relation of vascular heat exchange to temperature regulation in the testis of the ram. *Journal of Reproduction and Fertility,* 2(3), 213-224.

Widmark, A., Damber, J.E., y Bergh, A. (1986). Relationship between human chorionic gonadotrophin-induced changes in testicular microcirculation and the formation of testicular interstitial fluid. *Journal of Endocrinology,* 109(3), 419-425.

Wilhelmsson, L., Lindblom, B., Wikland, M., y Wigvist, N. (1981). Effects of prostaglandins on the isolated uterine artery from nonpregnant women. *Prostaglandins*, 22(2), 223-233.

Williams, R.G. (1949). Some responses of living blood vessels and connective tissue to testicular grafts in rabbits. *Anatomical Record*, 104, 147-161.