

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**ROL DE LA EYACULACIÓN EN LA RESPUESTA DE ESTRÉS A LA
ELECTROEYACULACIÓN EN OVINOS**

por

Lourdes NÚÑEZ
Natalia HERNÁNDEZ
María LAGO

TESIS DE GRADO presentada
como uno de los requisitos para obtener el título
de Doctor en Ciencias Veterinarias
(Orientación Producción Animal)

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2018**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Lic. Florencia Beracochea

Segundo miembro (Tutor):

Dra. Aline Freitas de Melo

Tercer miembro:

Dr. Danilo Fila

Cuarto miembro:

Dr. Rodolfo Ungerfeld

Quinto miembro:

Dra. Silvia Abril-Sánchez

Fecha:

18/12/18

Autores:

Lourdes Núñez Cabrera

Natalia Hernández Techera

María Lago Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer enormemente a aquellas personas que de distintas formas fueron parte fundamental en la elaboración de nuestra tesis:

En primer lugar, a nuestra tutora la Dra. Aline Freitas de Melo por su colaboración, ayuda y dedicación en todo momento. Siempre motivándonos.

A nuestros co-tutores Rodolfo Ungerfeld y Silvia Abril Sánchez por ayudarnos de forma constante y ser parte fundamental en la preparación de la tesis.

Al Sr. Fernando Siqueira dueño del lugar y de los animales donde se realizó la parte práctica para tal estudio.

A todo el grupo de trabajo que brindó su ayuda en la recolección de datos en la parte práctica.

A la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, la que fue nuestra segunda casa todos estos años. A nuestros profesores por sus enseñanzas, a nuestros compañeros que son parte de esta etapa inolvidable.

Por último y especialmente a nuestras familias por el apoyo incondicional a lo largo de nuestra carrera, los que hicieron posible que hoy estemos acá. Y a nuestros amigos por estar presentes y acompañarnos siempre.

Todos ellos fueron parte esencial para nosotras.

¡Muchas gracias!

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Métodos de colección de semen.....	10
2.2 Respuesta de estrés.....	11
2.2.1 Estrés.....	11
2.2.2 Fisiología del estrés.....	12
2.3 Respuestas fisiológicas indicadoras de estrés a la electroeyaculación... 13	
2.4 Fisiología de cortejo y cópula.....	14
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo general	16
4.2 Objetivos específicos.....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1 Local de estudio, animales y manejo.....	17
5.2 Procedimientos relacionados a la EE.....	17
5.3 Obtención de muestras sanguíneas.....	17
5.4 Parámetros fisiológicos.....	17
5.5 Cortisol.....	18

5.6	Parámetros hematológicos.....	18
5.7	Parámetros bioquímicos.....	18
5.8	Análisis estadístico.....	18
6.	RESULTADOS.....	19
6.1	Cortisol.....	19
6.2	Frecuencia cardíaca.....	19
6.3	Temperatura rectal.....	20
6.4	Glóbulos blancos.....	21
6.5	Hematocrito.....	21
6.6	Proteínas totales.....	22
6.7	Albumina.....	23
6.8	Glucosa.....	23
6.9	Creatina quinasa.....	24
6.10	Vocalizaciones.....	25
7.	DISCUSIÓN.....	26
8.	CONCLUSIONES.....	28
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	29

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Figura 1. Concentración de cortisol antes y después de la EE.....	19
Figura 2. Frecuencia cardíaca antes y después de la EE.....	20
Figura 3. Temperatura rectal antes y después de la EE.....	20
Figura 4. Concentración de glóbulos blancos antes y después de la EE.....	21
Figura 5. Hematocrito antes y después de la EE.....	22
Figura 6. Proteínas totales antes y después de la EE.....	22
Figura 7. Concentración de albúmina antes y después de la EE.....	23
Figura 8. Concentración de glucosa antes y después de la EE.....	24
Figura 9. Creatina quinasa antes y después de la EE.....	25

RESUMEN

En rumiantes existen varios métodos de colección de semen, el más utilizado en ovinos es la vagina artificial, siendo la alternativa más frecuente la electroeyaculación (EE). Esta última es una técnica ampliamente usada para coleccionar semen, pero genera una marcada respuesta de estrés. Dado que la propia eyaculación desencadena respuestas similares, el objetivo de esta tesis fue discriminar la respuesta provocada por la eyaculación de aquella provocada por la EE utilizando carneros y ovejas, ya que estas últimas no eyaculan. Para esto se utilizaron 10 carneros y 10 ovejas de raza Texel, los cuales fueron electroeyaculados durante de la estación no reproductiva. Se les coleccionaron muestras de sangre para medir la concentración de cortisol, cantidad de glóbulos blancos (GB), el hematocrito (Hto), las proteínas totales (PT), la albumina, la glucemia, y la creatina quinasa (CK), y se midieron la frecuencia cardíaca (FC) y la temperatura rectal (TR), además de registrar el número de vocalizaciones emitidas. Se registró un aumento en la concentración del cortisol, glucemia, TR, concentración de CK ($p < 0,0001$) y GB ($p = 0,01$), tanto en ovejas como en carneros. En todos estos parámetros –excepto en los GB- se observó un mayor aumento en ovejas que en carneros (cortisol: $p < 0,0001$; glucemia: $p = 0,001$; TR: $p = 0,0015$; CK: $p = 0,05$). La FC ($p < 0,0001$) y Hto ($p = 0,02$) decrecieron en ambos sexos luego de la EE. Un mayor número de carneros que de ovejas vocalizaron durante la EE ($p = 0,009$). Teniendo en cuenta estos indicadores de estrés, se demostró que la EE provocó una mayor respuesta al estrés en ovejas que en carneros, por lo que se concluyó que la eyaculación no contribuye significativamente en los cambios inducidos por la EE, por lo que estos son indicadores confiables de la respuesta de estrés.

SUMMARY

In ruminants, there are several methods of collection of semen: the most widely used in sheep is the artificial vagina, and the more frequently used alternative is electroejaculation (EE). The latter is a widely used technique to collect semen, but it generates a stress response. Since the ejaculation itself triggers similar responses, the objective of this thesis was to discriminate the response provoked by the ejaculation from that provoked by the EE using rams and sheep, as the latter cannot ejaculate. For this, 10 rams and 10 Texel ewes were electroejaculated outside the breeding season. Blood samples were collected to measure cortisol concentration, white blood cell count (GB), hematocrit (Hto), total protein (PT), albumin, glycemia and creatine kinase (CK) concentrations, and the heart rate (HR) and rectal temperature (TR), in addition to the number of vocalizations emitted. It was observed in both, ewes and rams, an increase in cortisol concentration, glycemia, TR, CK concentration ($p < 0.0001$) and GB ($p = 0.01$). In all these parameters -except in GB- a greater increase was observed in sheep than in rams (cortisol: $p < 0.0001$, glycemia: $p = 0.001$, TR: $p = 0.0015$, CK: $p = 0.05$). HR ($p < 0.0001$) and Hto ($p = 0.02$) decreased in both sexes after EE. A greater number of rams than ewes vocalized during the EE ($p = 0.009$). Taking into account these stress responses, it was shown that EE provoked a greater response to stress in ewes and rams, but ejaculation was not related to the changes induced by EE, so all these indicators are reliable as to the stress response.

1. INTRODUCCIÓN

En rumiantes existen distintas formas de colección de semen. En la especie ovina, el método utilizado más frecuentemente es la vagina artificial (VA) (Ungerfeld, 2003), pero en carneros que se niegan a servir en una VA debido a la falta o disminución de la libido (Rasbech, 1993); en animales que se encuentran fuera de la temporada de reproducción (Abril-Sánchez, 2017), o en animales silvestres, la electroeyaculación (EE) representa la única posibilidad de obtención de semen (Morrell, 2011). La EE genera una marcada respuesta de estrés en carneros y toros evidenciada a través de cambios hematológicos, bioquímicos (Stafford y col., 1996; Damián y Ungerfeld, 2011), en la frecuencia cardíaca y respiratoria, pulso, temperatura rectal (TR) y concentración de cortisol (Stafford y col., 1996; Damián y Ungerfeld, 2011). Además, se ha determinado que existe un incremento de la creatina quinasa (CK) (Damián y Ungerfeld, 2011), que es un indicador de daño muscular cardíaco y esquelético (Akatas y col., 1993); incrementos de las concentraciones de proteínas totales (PT) y de la glucosa, y una disminución del hematocrito (Hto), hemoglobina (Hb), eritrocitos y fosfatasa alcalina en respuesta a la EE en carneros (Damián y Ungerfeld, 2011). Además, la EE produce dolor y riesgo de daño térmico y electrolítico en la mucosa rectal (Brindley, 1981). Las respuestas negativas a la EE han sido asociadas con la emisión de vocalizaciones en toros (Falk y col., 2001, Whitlock y col., 2012) y en carneros (Damián y Ungerfeld, 2011), que han sido consideradas como un indicador confiable de dolor (Damián y Ungerfeld, 2010; Mejdell y col., 2017; Ungerfeld y col., 2017). Por lo tanto, la EE afecta el bienestar de los animales (Orihuela, 2014).

Por otra parte, el cortejo, la monta y la eyaculación desencadenan aumentos en la concentración de cortisol en toros (Borg y col., 1991), aumento en la frecuencia cardíaca (FC) en carneros (Orihuela y col., 2016), frecuencia respiratoria (FR) en monos (Slob y col., 1986) y hematocrito (Hto) en caballos (Hatazoe y col., 2012). El aumento de estos parámetros es similar al que ocurre durante la respuesta a la EE, por lo que ambos efectos quedan superpuestos, y, por tanto, no es posible discriminar cuánto de los cambios reportados es atribuible exclusivamente a la EE y cuánto es generado por la eyaculación en sí misma. Considerando lo anterior, se plantea discriminar la respuesta inducida por la eyaculación de la respuesta de estrés inducida por la EE. Para esto es útil comparar la respuesta de estrés generada por la EE en carneros con animales que no puedan eyacular; en este sentido las ovejas son un modelo experimental interesante. En este marco, es importante comparar la respuesta a la EE en carneros y ovejas fuera de la estación reproductiva para evitar la influencia de los esteroides sexuales en la respuesta al estrés, ya que estas hormonas regulan la liberación de ACTH y cortisol, interfiriendo en la respuesta al estrés (Handa y col, 1994).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Métodos de colección de semen

En la especie ovina, el método de elección más frecuente para coleccionar semen es la VA (Ungerfeld, 2003). La VA, más allá de sus diferentes tipos y modelos, está constituida por un tubo externo rígido o semirrígido de vidrio, ebonita, metal o caucho, de 15 a 20 cm de largo por 6 a 8 cm de diámetro. A través de este tubo se hace pasar otro tubo de goma o látex de menor diámetro, pero algo más largo y cuyos extremos se fijan a los dos extremos rígidos, dejando entre ambos tubos un espacio vacío. En uno de los orificios se coloca una válvula a través de la cual se introduce agua templada, de tal forma que la temperatura en el interior sea de entre 40 y 46 °C (Durán del Campo, 1993). En uno de los extremos se introduce una copa de vidrio en la que se colecta el semen. El otro extremo de la vagina se puede lubricar con glicerina o vaselina (Duran del Campo, 1993). La presión se puede aumentar mediante presión de aire (Morrell, 2011). En relación al uso de VA en carneros, la colección de semen por medio de este método se asemeja al servicio natural, pero se necesita entrenar a los animales previamente (Terril, 1940; Gil, 2003). En algunas especies que están acostumbradas al manejo es posible obtener semen por lavado vaginal luego de la monta natural, pero en este caso los espermatozoides quedan expuestos a secreciones vaginales que disminuyen la supervivencia espermática (Gil, 2003).

En otras especies, como en algunas de las especies no domésticas, la EE representa la única posibilidad para la colección seminal (Morrell, 2011), siendo recomendado también en carneros en los que la colección con VA no se puede aplicar debido a la falta o disminución de libido o que se encuentren fuera de la temporada de cría (Rasbech, 1993; Abril-Sánchez y col., 2017). La EE en animales domésticos fue reportada por primera vez en 1936 (Dziuk y col, 1954; Marder, 1954). Esta técnica se basa en la introducción de una sonda con electrodos en el recto para estimular eléctricamente a los nervios relacionados con la eyaculación. Durante la EE, el voltaje se aumenta de manera paulatina con pulsos de estimulación rítmicos (Hafez y Hafez, 2002). En el caso del carnero, frecuentemente se posiciona el animal en decúbito lateral, sujetándolo fuertemente, dado que los miembros posteriores reaccionan violentamente por estímulo de los nervios obturador y ciático (Durán del Campo, 1993). El pene debe ser extraído del prepucio y envuelto en una gasa antes de comenzar el estímulo eléctrico, para luego ser introducido en la copa recolectora de semen. La extracción del pene se logra con facilidad si se hace sentar al animal sobre su grupa y se le extiende hacia adelante en forma de arco (Duran del Campo, 1993).

La calidad del semen obtenido mediante EE es similar a la obtenida por masaje rectal en machos cabríos (Abril-Sánchez y col, 2017). La concentración de espermatozoides es mayor en muflones a los que se les aplicó EE que con el masaje rectal (Ungerfeld y col, 2015). Sin embargo, la concentración fue menor cuando se colectó semen de carneros con EE que con VA (Marco-Jiménez y col., 2008).

En relación a las características de los espermatozoides tras la congelación y descongelación se observó un mayor número de espermatozoides estables y

funcionales en el semen recogido por EE que por VA (Marco-Jiménez y col, 2005). El volumen del eyaculado y la cantidad de PT del plasma seminal fue similar cuando se colectó semen de carneros con VA o EE (Marco-Jiménez y col., 2008), y la secreción de las glándulas anexas fue mayor con esta última (Gil, 2003). Si no se restringe el acceso al agua previo a la colecta de semen mediante EE, la posibilidad de contaminación con orina es mayor (Gil, 2003).

Una alternativa a la EE es el método de masaje guiado por ultrasonido transrectal de las glándulas sexuales accesorias (TUMASG), el que ha sido aplicado de manera efectiva en la especie Arruí (Santiago-Moreno y col., 2013). Este método consiste en realizar una ecografía transrectal, para la examinación y masaje de las glándulas bulbouretrales, las vesículas seminales y ampolla del conducto deferente para favorecer la expulsión de los espermatozoides. Simultáneamente se realiza un masaje manual del pene, zona perineal y pélvica de la uretra para transportar el semen a través de la uretra hasta el tubo de recolección (colector de vidrio graduado). El procedimiento finaliza cuando se observa mediante la ecografía el vaciado completo de las glándulas accesorias (Ungerfeld y col., 2015). En los casos en los que no se llega a un eyaculado sólo con el masaje de las glándulas accesorias, se puede usar la aplicación de estímulos eléctricos (0,2 mA durante 6-8 s) por medio de un electroeyaculador (Ungerfeld y col., 2015). En este sentido realizó un estudio con muflones anestesiados, con la administración previa de oxitocina antes de realizar el TUMASG para acortar el procedimiento y evitar el uso de la EE (Ungerfeld y col., 2016), ya que el tratamiento con oxitocina estimula el transporte de esperma hacia el conducto deferente, y por lo tanto en la eyaculación de los carneros (Nicholson y col., 1999).

2.2 Respuesta de estrés

2.2.1 Estrés

El estrés es el conjunto de fenómenos biológicos no específicos causados por la acción de factores o agentes potencialmente nocivos o dañinos sobre el organismo, los cuales, en determinadas circunstancias, son capaces de provocar fenómenos patológicos (Martínez, 2016). También puede ser definido como la acción de estímulos nerviosos y emocionales provocados por el ambiente sobre los sistemas nervioso, endocrino, circulatorio y digestivo de un animal, produciendo cambios medibles en los niveles funcionales de estos sistemas. En especial, el estrés altera la homeostasis interna induciendo cambios en la actividad del sistema nervioso autónomo y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenocortical (HPA) (Damián, 2011). En cualquiera de los casos, el sistema nervioso central percibe una amenaza y desarrolla una respuesta que consiste en una combinación de cuatro respuestas generales de defensa biológica para restablecer la homeostasis (Damián, 2011): la comportamental, y las del sistema nervioso autónomo, inmune y neuroendocrino (Romero y col., 2011).

2.2.2 Fisiología del estrés

La respuesta de estrés involucra la activación del sistema nervioso simpático (SNS) del sistema nervioso autónomo (Damián, 2011). Al activarse el SNS, se libera adrenalina y noradrenalina en la médula adrenal y se genera una respuesta rápida en el organismo. Estas catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) ponen al animal en estado de alerta, preparándolo para luchar o huir, provocando un aumento de la FC y del gasto cardíaco, vasoconstricción periférica, hiperglucemia, midriasis e hiperventilación (Romero y col., 2011). Cuando un estresor (estímulo que genera una respuesta de estrés) es percibido, el hipotálamo secreta la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), la cual estimula la liberación de la hormona adenocorticotrófica (ACTH) por parte de la hipófisis. El animal responde a factores estresantes al liberar ACTH por parte de la glándula pituitaria anterior, glucocorticoides de la corteza suprarrenal, epinefrina desde la médula suprarrenal y norepinefrina por los nervios simpáticos (Axelrod y Reisine, 1984). La ACTH estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides, principalmente el cortisol (en ovinos) desde la corteza adrenal. En circunstancias normales, solo el 10 % del cortisol circulante es libre y activo. El 90 % del cortisol plasmático está unido a proteínas, de las cuales el 70% son globulinas de unión a corticosteroides y albúmina (Granger y col., 2009). Sin embargo, se ha reportado que las concentraciones de cortisol libre alcanzan del 20 al 30% durante la respuesta al estrés (Rijnberk y Mol, 1997).

El cortisol estimula diferentes vías metabólicas como la gluconeogénesis (aumentando la síntesis de enzimas implicadas en la conversión de aminoácidos, glicerol y lactato en glucosa), la lipólisis y la proteólisis en el hígado, generando un aumento de concentraciones de glucosa sanguínea (Romero y col., 2011). La gluconeogénesis en el músculo esquelético está regulada por la actividad de la enzima glucógeno fosforilasa; la activación de dicha enzima está controlada por altos niveles de catecolaminas, por la contracción muscular o por ambos actuando en conjunto (Tarrant, 1989). La respuesta neuroendocrina de estrés presenta un proceso de retroalimentación negativa, por lo que el cortisol actúa sobre el hipotálamo y la hipófisis disminuyendo la producción de CRH y ACTH (Romero y col., 2011). Diversos estudios demostraron que las hembras reaccionan a los factores estresantes físicos y psicológicos con una mayor respuesta de cortisol en comparación con los machos (Le Mevel y col., 1979; Brett y col., 1983).

La testosterona puede inhibir la respuesta del cortisol y ACTH en situaciones estresantes actuando directamente sobre sitios neurales o hipofisarios (Handa, 1994). La presencia de estrógenos produce un aumento del cortisol basal y secreción de ACTH, esto fue demostrado en un estudio que se realizó en ratas ovariectomizadas, a las que se les administró una cápsula con estradiol y luego fueron sometidas a un factor estresante (choque de pies a 1,0 mA) (Burgess y Handa, 1992). La presencia de progesterona mitiga la respuesta al estrés durante manejos estresantes en las ovejas (Freitas de Melo y Ungerfeld, 2016). Un estudio realizado por Van Lier y col. (1998) demostró que luego de administrar ACTH a ovejas y machos, las hembras mostraban niveles más altos de cortisol que los carneros.

Según Moberg (1996), los cambios fisiológicos asociados con la respuesta de estrés pueden ser medidos a partir de cambios en las concentraciones sanguíneas de cortisol, glucosa, β -hidroxibutirato, volumen globular aglomerado y CK. Estas determinaciones permiten determinar la presencia y/o magnitud de la respuesta de estrés y son conocidas como indicadores de estrés.

2.3 Respuestas fisiológicas indicadoras de estrés a la electroeyacuación

La EE es una técnica ampliamente utilizada para colectar semen en rumiantes (Damián y Ungerfeld, 2011). Sin embargo, esta técnica genera una marcada respuesta de estrés evidenciada a través de cambios en la FC y FR, pulso, TR y concentración de cortisol en carneros y toros (Stafford y col., 1996; Damián y Ungerfeld, 2011). Según Mosure y col. (1998), luego de la EE ocurre un aumento de la FC debido a la combinación de la contracción muscular y del dolor. En un estudio realizado en venados de campo sometidos a la EE bajo anestesia general se vio un aumento de la FC y del pulso durante la aplicación de la misma, indicando que esta respuesta puede estar asociada a la presencia de dolor y a los estímulos eléctricos durante la EE (Fumagalli y col., 2011). En otro estudio realizado en muflones, la FC aumentó durante los procedimientos de EE y disminuyó al final, pero no volviendo a sus valores iniciales (Ungerfeld y col., 2015). Además, ocurrió un aumento de la actividad cardíaca inducido por el estímulo eléctrico y una contracción muscular intensa de las extremidades posteriores, provocando un incremento de la CK (Damián y Ungerfeld, 2011), indicando daño de la musculatura cardíaca y esquelética (Akatas y col., 1993). Además del aumento de la CK, también existe un incremento de la concentración de cortisol, glucemia y de PT en sangre, así como una disminución del Hto, Hb, eritrocitos y fosfatasa alcalina asociados a la EE (Damián y Ungerfeld, 2011; Fidan y col., 2017). En otro estudio realizado en carneros Merino los niveles de glóbulos blancos (GB) y de Hb aumentaron significativamente luego de la EE (Fidan y col., 2017). Estos cambios en los niveles de GB podrían explicarse por los efectos de las catecolaminas en la contracción del bazo durante el procedimiento de EE como respuesta al estrés (Fidan y col., 2017).

Orihuela (2009a) mostró que el estímulo eléctrico durante la EE induce incrementos en la concentración del cortisol en carneros, mientras que la manipulación, incluyendo la inserción de la sonda no contribuye a este efecto. En un estudio realizado en cabras criollas del sexo masculino que fueron sometidos a EE, la concentración sérica de cortisol aumentó después de la misma (Ortiz de Montellano y col., 2007). Además, la EE produce dolor y riesgo de daño térmico y electrolítico en la mucosa rectal (Brindley, 1981). En el venado de campo se vio que la temperatura rectal disminuyó luego de la EE, pero es muy probable que sea debido a la sedación a los que fueron sometidos con xilacina, lo cual se sabe que puede inducir hipotermia (Fumagalli y col., 2011). Las respuestas negativas a la EE han sido asociadas con la emisión de vocalizaciones en toros (Falk y col., 2001; Whitlock y col., 2012) y carneros (Damián y Ungerfeld, 2011), las que han sido consideradas como un indicador confiable de dolor (Damián y Ungerfeld, 2010). Watts y Stookey (2000) también indicaron que el número, duración

y característica de las vocalizaciones son indicadoras de dolor. La frecuencia y duración de las vocalizaciones durante la EE se asocia al número de pulsos en los que el carnero eyacula (Damián y Ungerfeld, 2011), siendo más útiles que el cortisol y la FC para indicar dolor (Watts y col., 1999). Cuando la intensidad del estímulo eléctrico es severa, los toros vocalizan, luchan y se echan (Falk, 2001). También se observó que luego de la EE disminuye la concentración sérica de testosterona (Damián y Ungerfeld, 2011), debido a que los esteroides adrenales inhiben indirectamente la función endocrina testicular, actuando a nivel hipotalámico o pituitario suprimiendo la secreción de LH (Juniewicz y col., 1987).

La EE produce estrés en los animales y por lo tanto atenta contra su bienestar (Orihuela, 2014), por lo que se han evaluado técnicas alternativas como el masaje transrectal (Palmer, 2005). Las características del semen colectado mediante EE fueron similares a las colectadas con el masaje transrectal de glándulas accesorias en machos cabríos (Abril-Sánchez y col., 2017). En el caso de ser indispensable la aplicación de EE, algunos autores recomiendan asociarla con algún tratamiento anestésico para reducir los efectos estresantes en el animal (Orihuela, 2014). Por ejemplo, la aplicación de xilacina al 2 % previo a la EE, además de disminuir el dolor, induce eyaculados con mayor volumen, concentración espermática y porcentaje de espermatozoides vivos, que aquellos que se obtienen sin el uso de este tranquilizante (Ulloa, 2017). En un estudio realizado en machos cabríos sedados con xilacina y ketamina antes de la EE, se vio una disminución de la respuesta al estrés, mejorando la calidad del semen recogido, además de que vocalizaron menos, lo que demuestra una disminución del dolor (Abril-Sánchez y col., 2018). Por el contrario, la reducción del dolor, atribuible a la anestesia epidural con lidocaína no resultó significativa (Palmer, 2005).

La respuesta a la EE puede verse influenciada por la técnica del operador, por lo que los operadores de equipos de EE deben esforzarse por aplicar la estimulación eléctrica lo más suavemente posible. Una vez que la sonda está en su lugar, la estimulación eléctrica se aplica cuidadosamente mientras se observa la respuesta del animal, y una vez que hay una indicación de que el mismo ha sentido la estimulación, como una ligera contracción de los músculos de la extremidad posterior, la estimulación puede ser eliminada, previamente se produce la protrusión del pene, seguida de la erección y finalmente la colección de semen (Palmer, 2005).

2.4 Fisiología del cortejo y cópula

La cópula se inicia desde el acercamiento del carnero y termina con la eyaculación; la misma está compuesta por determinadas unidades de conducta: acercamiento, contacto naso-vaginal, flehmen, elevación de la extremidad anterior, topetear, descanso de barbilla y monta (Odagiri, 1995). El cortejo involucra el comportamiento de búsqueda de pareja, donde se establece el vínculo entre determinado macho y una o varias hembras en celo. Cuando un carnero es introducido a un grupo de hembras, este comienza la búsqueda para determinar cuáles hembras están en celo (Ungerfeld, 2003). El carnero dedica un tiempo considerable olfateando los genitales y la orina de

la oveja (Bland y Jubilan, 1987). En respuesta a la orina de las hembras, los machos realizan el comportamiento de flehmen. El flehmen facilita la introducción de feromonas sexuales hacia el órgano vomero-nasal (Schneider, 1930). La postura de flehmen puede ser retenida solo momentáneamente o puede persistir hasta 2 min (Banks, 1964). Luego, la región del flanco de la oveja es físicamente golpeada por el hombro o la cabeza del carnero y posteriormente ocurre la monta (Bernon y Shrestha, 1984). Durante la monta, se produce la erección del pene y se acompaña de oscilaciones pélvicas, que continúan después de que se ha realizado la intromisión. La eyaculación puede detectarse conductualmente por un empuje especialmente profundo y siempre es seguido por el desmontaje (Banks, 1964). En carneros, la cópula dura de 2 a 3 seg, y en el segundo o tercer intento el macho eyacula. El carnero eyacula unas 10 veces antes de saciarse, pudiendo llegar a 30 o 40 eyaculaciones (Ungerfeld, 2003).

El apareamiento y la eyaculación desencadenan aumentos en la concentración de cortisol en toros, habiendo una relación positiva entre la cantidad y frecuencia de montas y el aumento del cortisol (Borg y col., 1991). También existe un aumento en la FC en carneros, durante la excitación sexual, alcanzando a un máximo pico después de la eyaculación (Orihuela y col., 2016); también hay aumentos de la FR en monos (Slob y col., 1986) y del Hto en caballos (Hatazoe y col., 2012). El aumento de estos parámetros es similar al que ocurre durante la respuesta a la EE, por lo que ambos efectos quedan superpuestos, y, por tanto, no es posible saber cuánto de los cambios reportados es atribuible exclusivamente a la EE y cuánto es generado por la eyaculación en sí misma. El estudio realizado por Slob (1986) en hembras y machos de la especie Macaco rabón, demostró que las fluctuaciones en la FC eran mucho mayores en los machos que en las hembras. Esta diferencia puede ser causada por el mayor esfuerzo muscular por parte del macho durante el cortejo y la cópula.

3. HIPÓTESIS

La eyaculación no contribuye significativamente a la respuesta de estrés provocada por la EE en ovinos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Comparar la respuesta de estrés a la EE entre carneros y ovejas a los efectos de discriminar la respuesta provocada por la eyaculación de aquella provocada por la EE.

4.2 Objetivos específicos

Determinar si existen diferencias en la respuesta a la EE de carneros y ovejas en:

- la concentración de cortisol
- la frecuencia cardíaca
- la temperatura rectal
- la cantidad de glóbulos blancos
- el hematocrito
- las proteínas totales
- la albúmina
- la glucemia
- la creatina quinasa
- el número de vocalizaciones

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Local de estudio, animales y manejo

El estudio se realizó en un establecimiento privado del departamento de Rocha, Uruguay (34° 28' S / 57° 51' O) durante noviembre, utilizando 10 ovejas y 10 carneros de raza Texel.

5.2 Procedimientos relacionados a la EE

A todos los animales se les aplicó la EE en el mismo día. Antes de realizar la EE, los carneros y ovejas fueron asignados en diferentes corrales de aproximadamente 6 X 6 m cada uno. Los animales fueron movidos individualmente a un tercer corral (2 X 3 m aproximadamente), alternando entre géneros, donde se procedió a realizar la EE, la misma se realizó con el animal de pie e inmovilizado. La sonda rectal que se utilizó presentaba tres electrodos longitudinales recubiertos con gel de carboximetilcelulosa. Los carneros y ovejas fueron estimulados con 10 pulsos de 3 V, seguidos por 10 pulsos de 4 V, terminando antes en los carneros que eyaculaban. Cada pulso se aplicó durante 3 s, con periodos de descanso del mismo tiempo. Los carneros necesitaron $11,0 \pm 2,4$ pulsos (media \pm EEM) para comenzar la eyaculación. Durante la EE también se registró el número de vocalizaciones emitidas.

5.3 Obtención de muestras sanguíneas

Las muestras de sangre fueron colectadas mediante punción de la vena yugular antes (AEE) y después (DEE) de la EE, así como a los 10, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 min. Las muestras para las mediciones de los parámetros bioquímicos (PT, albúmina y CK) y hormonales (cortisol) se recolectaron en tubos sin anticoagulante. Para los análisis de glucemia se colectaron las muestras en tubos con heparina e yodoacetato (Eurotubo, Deltalab, Rubi, España). Las muestras de sangre quedaron a temperatura ambiente durante 1 h, se centrifugaron (1500 rpm, 20 min) y seguidamente se congelaron a -20 °C hasta su análisis. Para los análisis hematológicos (leucocitos, hematocrito) la sangre se recolectó en tubos con anticoagulante EDTA (Eurotubo, Deltalab, Rubi, España).

5.4 Parámetros fisiológicos

Se registró la frecuencia cardíaca en los tiempos AEE, DEE, 10 y 30 min y la temperatura rectal en los tiempos AEE, 10 y 30 min.

5.5 Cortisol

La medición del cortisol se realizó en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, con las muestras colectadas en los tiempos: AEE, DEE, 10; 20; 30; 45; 60 y 90 min. Para ello, se utilizó un kit de radioinmunoanálisis de fase sólida (Cisbio Bioassays, Parc Marcel Boiteux, Francia). La sensibilidad al análisis fue de 11,8 nmol/L y el coeficiente de variación intraensayo fue de 15,33 % para el control bajo, 11,25 % para el control medio y 5,06 % para el control alto.

5.6 Parámetros hematológicos

La evaluación de los parámetros hematológicos se realizó AEE, DEE, a los 30 y 120 min. El análisis incluyó los parámetros de línea celular blanca y HCT mediante un analizador automatizado de células (Humacount 30TS, Weisbaden, Alemania).

5.7 Parámetros bioquímicos

Las PT se midieron mediante la técnica de Biuret (Bio-Systems, Barcelona, España). La albúmina, glucosa y CK se evaluaron utilizando un kit comercial (Bio-Systems, Barcelona, España). Las determinaciones fueron realizadas en los tiempos: AEE, DEE, 30 y 120 min para la glucosa y CK; y en los tiempos: AEE, DEE, 30; 60 y 120 min para las PT y albúmina.

5.8 Análisis estadístico

Se registró presencia/ausencia de vocalizaciones y se compararon entre géneros usando el test de Fisher. El resto de las variables fueron comparadas por un ANOVA para mediciones repetidas, considerando el género, el tiempo relativo al pulso eléctrico y la interacción entre ellos como efectos principales. Los datos son presentados como media \pm EEM.

6. RESULTADOS

6.1 Cortisol

La concentración de cortisol varió en el tiempo ($p < 0,0001$), aumentando hasta llegar a un máximo a los 30 min en el caso de las ovejas y entre los 10-30 min en los carneros. La concentración de cortisol fue mayor en las ovejas, en relación a los carneros ($p < 0,001$). Hubo interacción grupo por tiempo ($p = 0,0002$). En los carneros, a los 60 min el cortisol volvió a su valor inicial, pero en las ovejas nunca lograron llegar al valor inicial (Figura 1).

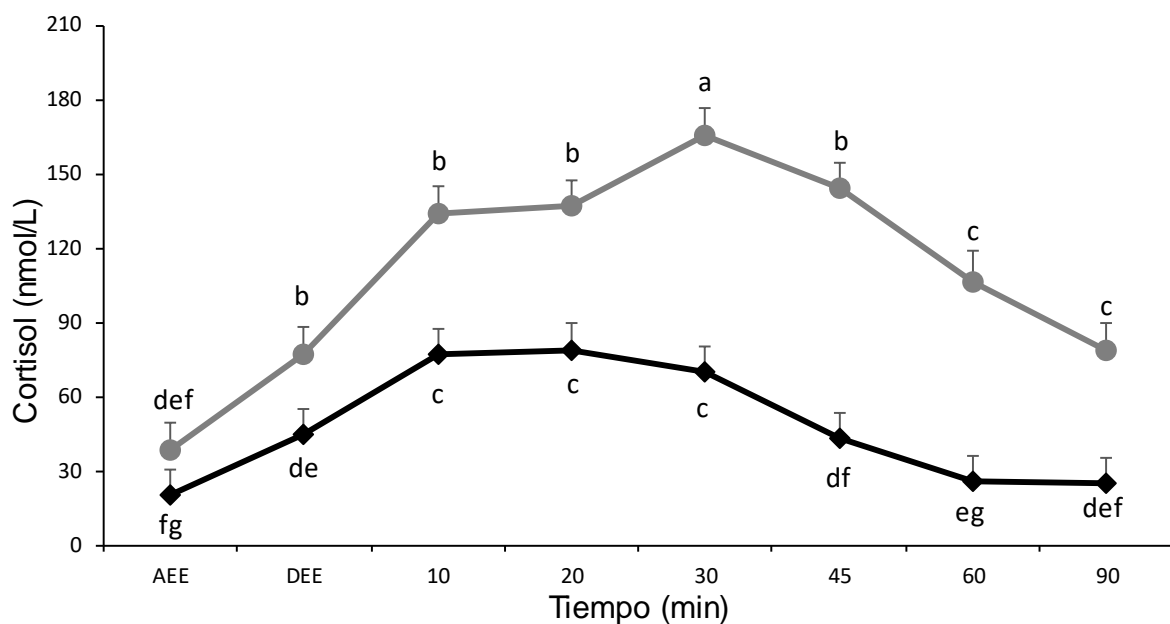


Figura 1. Concentración de cortisol de ovejas (-●-) y carneros (-◆-) de muestras colectadas AEE, DEE, 10; 20; 30; 45; 60 y 90 min (media \pm EEM). Diferentes letras indican diferencias grupo por tiempo.

6.2 Frecuencia cardíaca

La FC tuvo variación en el tiempo ($p < 0,0001$): se mantuvo estable hasta inmediatamente después de la EE y luego decreció, no llegando a los valores iniciales. No hubo diferencias significativas entre machos y hembras ($p = 0,5$). No hubo interacción grupo y tiempo ($p = 0,9$) (Figura 2).

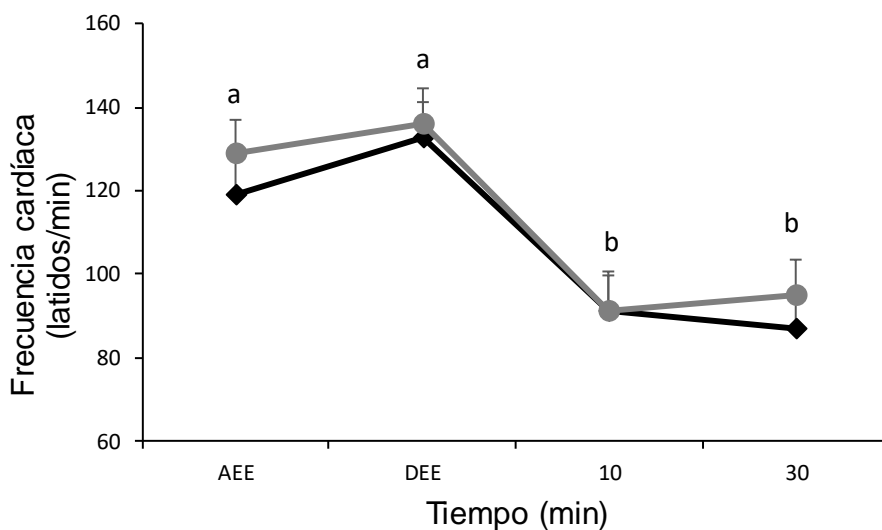


Figura 2. FC de ovejas (●) y carneros (◆) AEE, DEE, a los 10 y 30 min (media ± EEM). Las letras indican diferencias en el tiempo.

6.3 Temperatura rectal

La TR tuvo variación en el tiempo ($p < 0,0001$), alcanzando un pico máximo a los 30 min luego de la EE. Las hembras tuvieron una mayor temperatura rectal que los machos ($p = 0,0015$). No hubo interacción grupo por tiempo ($p = 0,8$) (Figura 3).

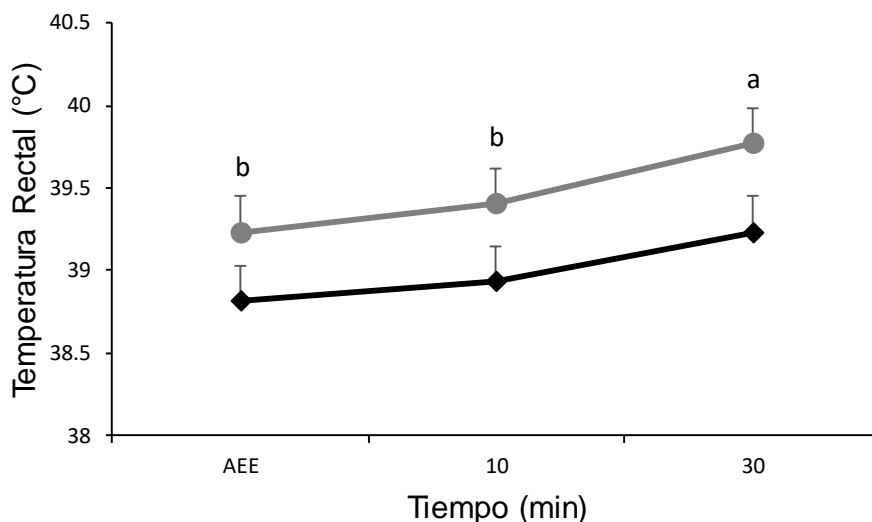


Figura 3. TR de ovejas (●) y carneros (◆) AEE, a los 10 y 30 min (media ± EEM). Las letras indican diferencias en el tiempo.

6.4 Glóbulos blancos

El conteo de GB, tuvo variación en el tiempo ($p = 0,01$), observándose el máximo conteo en ambos grupos a los 120 min luego de la EE. La cantidad de GB fue mayor en carneros que en ovejas ($p = 0,02$). Hubo interacción grupo por tiempo: aunque en los carneros no hubo variación en el tiempo, en las ovejas disminuyó luego de la EE y luego comenzó a aumentar hasta los 120 min ($p = 0,04$). (Figura 4).

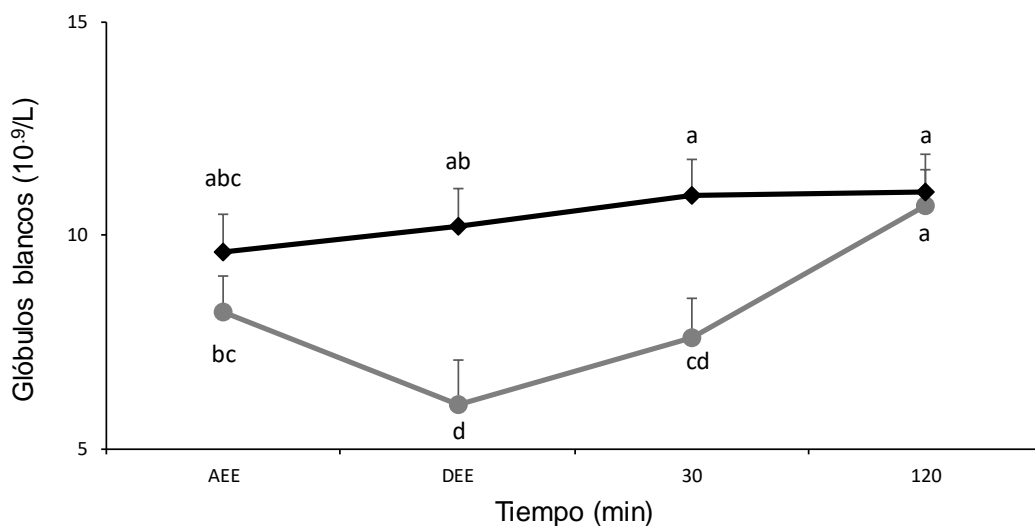


Figura 4. Contaje de GB de ovejas (-●-) y carneros (-◆-) de muestras colectadas AEE, DEE, a los 30 y 120 min (media \pm EEM). Diferentes letras indican diferencias grupo por tiempo.

6.5 Hematocrito

El Hto varió con el tiempo ($p = 0,02$), decreciendo en ambos grupos hacia los 120 min. No hubo diferencias entre carneros y ovejas ($p = 0,4$). No hubo interacción grupo por tiempo ($p = 0,7$) (Figura 5).

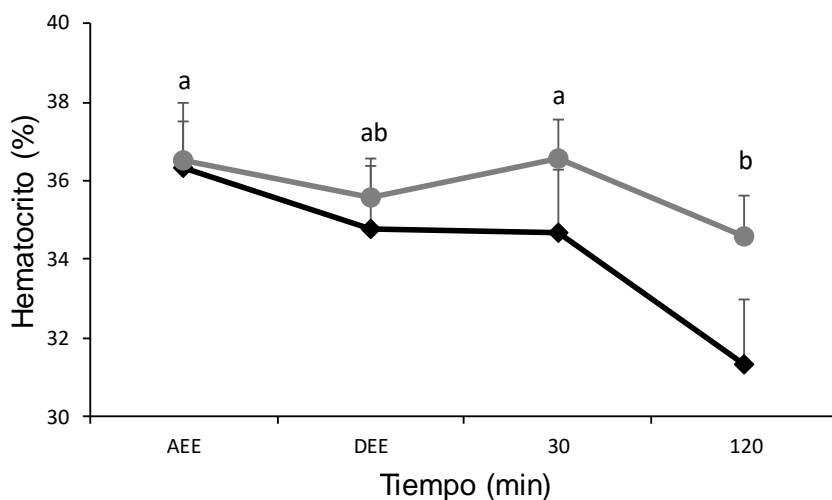


Figura 5. Porcentaje de Hto de ovejas (-●-) y carneros (-◆-) de muestras colectadas AEE, DEE, a los 30 y 120 min (media ± EEM). Las letras indican diferencias en el tiempo.

6.6 Proteínas totales

La concentración de PT tendió a variar en el tiempo ($p = 0,09$), llegando a la mínima concentración para el caso de las ovejas a los 30 min luego de la EE y a los 120 min llegando casi a sus valores iniciales, en el caso de los carneros tuvo su mínima concentración a los 60 min luego de la EE, aumentando a los 120 min, pero no retomando a sus valores iniciales. No presentó diferencias entre carneros y ovejas ($p = 0,2$). No hubo interacción grupo por tiempo ($p = 0,8$) (Figura 6).

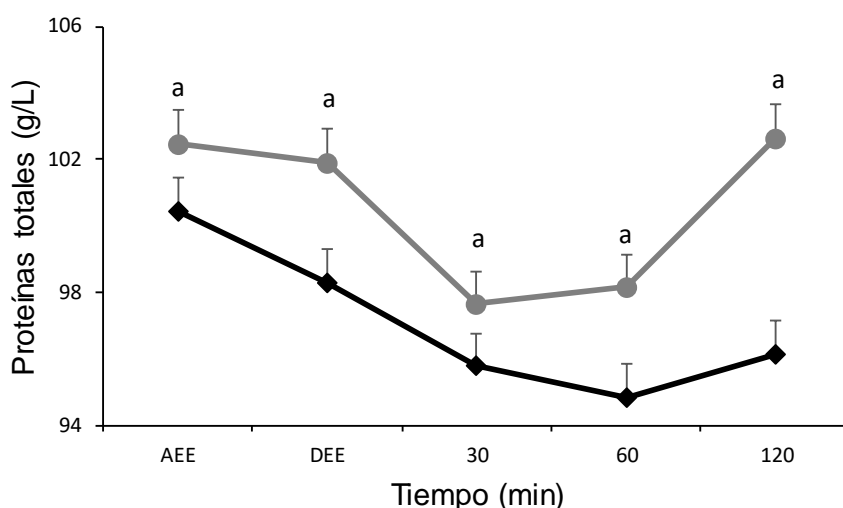


Figura 6. PT en ovejas (-●-) y carneros (-◆-) de muestras colectadas AEE, DEE, a los 30; 60 y 120 min (media ± EEM). Las letras indican una tendencia a variar en el tiempo.

6.7 Albúmina

La concentración de albúmina tendió a variar en el tiempo ($p = 0,1$). No se observó diferencias entre carneros y ovejas ($p = 0,3$). No hubo interacción grupo por tiempo ($p = 0,4$) (Figura 7).

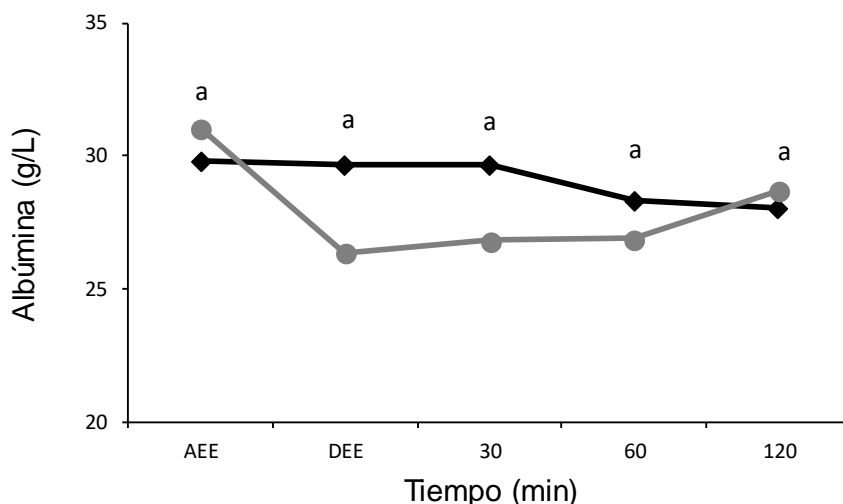


Figura 7. Concentración de albúmina en ovejas (-●-) y carneros (-◆-) de muestras colectadas AEE, DEE, a los 30; 60 y 120 min (media \pm EEM). Las letras indican una tendencia a variar en el tiempo.

6.8 Glucosa

La glucemia varió con el tiempo ($p < 0,0001$): luego de la EE la glucemia aumentó en ovejas hasta los 120 min, y en los carneros aumentó hasta los 30 min y luego permaneció estable hasta los 120 min. Los valores de las ovejas fueron mayores que los de los carneros ($p = 0,001$). Hubo interacción grupo por tiempo: en los carneros la glucemia se mantuvo estable a partir de los 30 min, pero en las ovejas siguió aumentando hasta los 120 min ($p = 0,01$) (Figura 8).

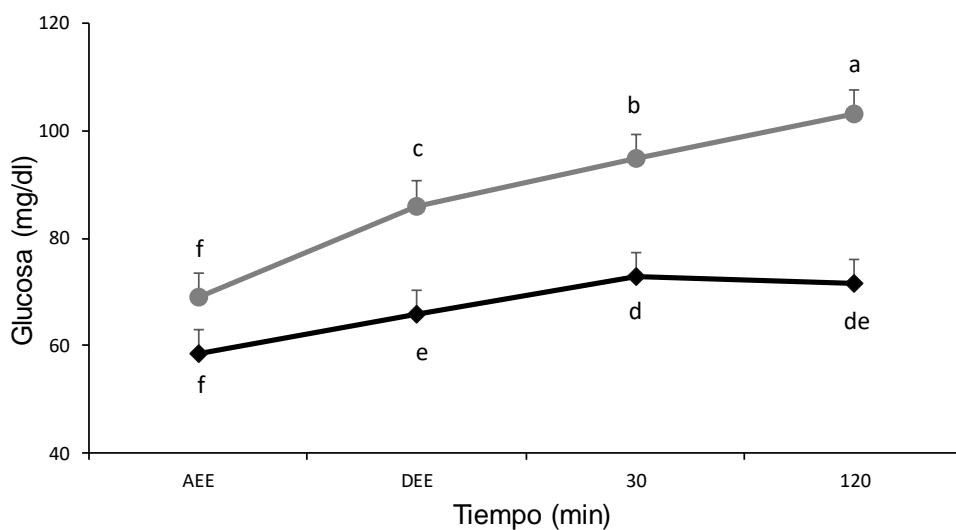


Figura 8. Glucosa en sangre de ovejas (●) y carneros (◆) de muestras colectadas AEE, DEE, a los 30 y 120 min (media \pm EEM). Diferentes letras indican diferencias grupo por tiempo.

6.9 Creatina quinasa

La concentración de CK varió con el tiempo ($p < 0,0001$), aumentando a los 120 min luego de la EE. Los valores de las ovejas fueron mayores que los de los carneros ($p = 0,05$). Hubo interacción grupo por tiempo: en las ovejas aumentó a partir de los 30 min luego de la EE hasta los 120 min, en los carneros aumentó luego de los 30 min hasta los 120 min luego de la EE, pero en menor medida ($p = 0,004$) (Figura 9).

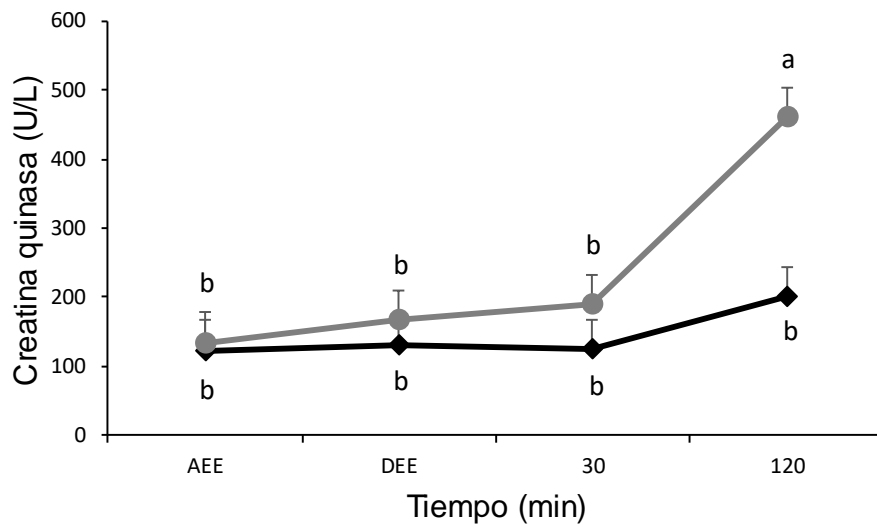


Figura 9. Concentración de CK de ovejas (-●-) y carneros (-◆-) de muestras colectadas AEE, DEE, a los 30 y 120 min (media ± EEM). Diferentes letras indican diferencias grupo por tiempo.

6.10 Vocalizaciones

En cuanto a las vocalizaciones, más carneros vocalizaron que ovejas durante la EE (7/10 vs 1/10) respectivamente ($p = 0,009$).

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta tesis confirman la hipótesis planteada: si bien se sabe que el cortejo, la cópula y la eyaculación generan respuestas similares a la respuesta de estrés, como aumentos en la FC y en la concentración de cortisol (Orihuela y col., 2009a; Orihuela y col., 2016), las ovejas presentaron una mayor respuesta al estrés a la EE que los carneros. Esto significa que la eyaculación no contribuyó significativamente a la respuesta de estrés durante la EE. Para explicar por qué las ovejas tuvieron una mayor respuesta que los carneros en varios parámetros se debe tener en cuenta que en las ovejas se estandarizó la cantidad de pulsos aplicados, siendo finalmente mayor que en los carneros. Además, puede haber una influencia del sexo en la respuesta al estrés: las ovejas secretan más cortisol que los carneros como respuesta a la ACTH (Van Lier y col., 2003). La mayor secreción de cortisol en las ovejas puede explicar las mayores concentraciones de glucosa dado que el cortisol estimula la gluconeogénesis (aumentando la síntesis de enzimas implicadas en la conversión de aminoácidos, glicerol y lactato en glucosa), la lipólisis y la proteólisis en el hígado, generando un aumento de la glucemia (Romero y col., 2011). La disminución de GB en las ovejas durante la EE, puede ser debida a que las hembras tienen una mayor sensibilidad al estrés que los machos, lo que fue demostrado en ratas (Dhabhar y col., 2012).

El resto de las variables (FC, TR, Hto y PT) también fueron modificadas por la EE tanto en ovejas como en carneros, lo que significa que el procedimiento por sí mismo fue altamente estresante independientemente de la eyaculación. La CK aumentó luego de los 30 min post EE, lo que puede ser consecuencia del daño muscular provocado, ya que la EE provoca una contracción muscular intensa de las extremidades posteriores (Akatas y col., 1993; Damián y Ungerfeld, 2011). Otras variables como la FC, albúmina, PT y Hto fueron mayores antes de realizar la EE, lo que probablemente haya sido consecuencia del manejo previo de los animales (movimiento y encierro de los animales en los corrales), aunque también variaciones en las PT en sangre y disminución del Hto han sido asociado al uso de la EE (Damián y Ungerfeld, 2011; Fidan y col., 2017). El aumento de la TR luego de la EE pudo ser debida a que la EE, causa un daño térmico en la mucosa rectal (Brindley, 1981). La variación de la albúmina puede ser debido a que el cortisol puede regular su síntesis por parte del hígado (Gabay y Kushner, 1999): una vez que se produce una respuesta de estrés, la concentración de albúmina tiende a disminuir, pero estos cambios puede variar entre diferentes especies (Petersen y col., 2004).

A pesar que en nuestro estudio las ovejas mostraron una mayor respuesta al estrés, más carneros que ovejas vocalizaron. Las vocalizaciones durante el procedimiento de EE han sido asociadas como una respuesta negativa al uso de la misma (Falk y col., 2001; Whitlock y col., 2012; Damián y Ungerfeld, 2011), las que han sido consideradas como un indicador confiable de dolor (Watts y Stookey, 2000; Damián y Ungerfeld, 2010).

El hecho de que la EE provoque un cambio en diferentes indicadores de estrés en ovejas y carneros indica que este procedimiento es estresante, por lo que es importante considerar técnicas alternativas que reduzcan el estrés a la EE. Una de ellas es el método de masaje guiado por ultrasonido transrectal de las glándulas sexuales accesorias (TUMASG) (Santiago-Moreno y col., 2013; Ungerfeld y col., 2015), ya que puede no requerir la aplicación de estímulos eléctricos o si lo requiere, es en menor cantidad que la EE (Ungerfeld y col., 2016; Abril-Sánchez y col., 2017), siendo por tanto menos dolorosa y estresante. Otra alternativa sería la sedación de los animales previo a la EE, ya que se observó una reducción del 35 % en la concentración del cortisol al realizar la EE en carneros anestesiados en comparación con los que no fueron anestesiados (Orihuela y col., 2009b). Además, en un estudio realizado en venados de campo electroeyaculados bajo anestesia, la concentración de cortisol no sufrió cambios (Fumagalli y col., 2011), lo que es importante porque el cortisol es un indicador confiable de estrés.

8. CONCLUSIONES

En síntesis, la eyaculación no contribuyó significativamente en la respuesta al estrés provocada por la EE. Por lo tanto, los indicadores utilizados en carneros reflejan en forma confiable el estrés provocado por el uso de esta técnica. La EE es un procedimiento que afecta el bienestar animal, por lo que éste debe ser asociado con tratamientos o manejos que reduzcan el estrés.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abril-Sánchez S, Crosignani N, Freitas-de-Melo A, Terrazas A, Damián JP, Beracochea F, Silveira P, Ungerfeld R (2018). Sedation or anaesthesia decrease the stress response to electroejaculation and improve the quality of the collected semen in goat bucks. *Animal* 12(12): 2598- 2608.
2. Abril-Sánchez S, Freitas de Melo A, Beracochea F, Damian JP, Giriboni J, Moreno JS, Ungerfeld R (2017). Sperm collection by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands is less stressful than electroejaculation without altering sperm characteristics in conscious goat bucks. *Theriogenology*; 98: 82-7.
3. Akatas M, Auguste D, Lefebvre HP, Toutain PL, Braun JP (1993). Creatine kinase in the dog: a review. *Vet Res Commun* 17: 353-369.
4. Axelrod J, Reisine TD (1984). Stress hormones: Interaction and regulation. *Science*. 224:452- 459.
5. Banks EM (1964). Some Aspects of Sexual Behavior in Domestic Sheep, *Ovis aries*. *Behaviour* 23: 249-278.
6. Bernon DE, Shrestha JN (1984). Sexual activity patterns in rams. *Can J Comp Med* 48 (1): 42- 46.
7. Bland KP, Jubilan BM (1987). Correlataion of flehmen by male sheep with female behavior and oesttrus. *Anim Behav* 35 (3): 735-738.
8. Borg KE, Esbenshade KL, Johnson B.H (1991). Cortisol, growth hormone, and testosterone concentrations during mating behavior in the bull and boar. *Animal Science* 69 (8): 3230- 3240.
9. Brett LP, Chong GS, Coyle S, Levine S (1983). The pituitary-adrenal response to novel stimulation and ether stress in young adult and aged rats. *Neurobiol. Aging* 4:133-138.
10. Brindley GS (1981). Electroejaculation: its technique, neurological implications and uses. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 44:9-18.
11. Burgess LH, Handa RJ (1992). Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor mediated function in female rats. *Endocrinology* 13 1:1261-1269.
12. Cameron RD (1977). Semen collection and evaluation in the ram. The effect of method of stimulation on response to electroejaculation. *Aust Vet J*; 53:380–383.
13. Cochran RC, Judy JK, Parker CF, Hallford DM (1985). Prefreezing and post-thaw semen characteristics of five ram breeds collected by electroejaculation. *Theriogenology*; 23:431–440.

- 14.** Dhabhar FS, Malarkey WB, Neri E, Mc Ewen BS (2012). Stress-induced redistribution of immune cells—From barracks to boulevards to battlefields: A tale of three hormone-Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology*, 37:1345-1368.
- 15.** Damian JP, Ungerfeld R (2011). The stress response of frequently electroejaculated ram to electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural parameters. *Reprod. Domest. Anim.* 46:646-650.
- 16.** Damian JP, Ungerfeld R (2010). Vocalizations are reliable indicators of pain during electroejaculation in rams. *Proc of the 44th Conger Int Soe Appl Ethol (ISAE)*. August 3-7, Uppsala, Sweden.
- 17.** Durán del Campo A (1993). Manual práctico de reproducción e inseminación artificial en ovinos. Montevideo, Ed. Agropecuaria hemisferio sur, 200 p.
- 18.** Dziuk PJ, Graham EF, Donker JD, Marion GB, Petersen WE (1954). Some observations in collection of semen from bulls, goats, boars and rams by electrical stimulation. *Vet Med* 49:455- 458.
- 19.** Falk AJ, Waldner CL, Cotter BS, Gudmundson J, Barth AD (2001). Effects of epidural lidocaine anesthesia on Bulls during electroejaculation. *Can Vet J*; 42:116-120.
- 20.** Fidan A, Yeni D, Avdatek F, Özçınar Ü, Hazman Ö (2017). Changes in oxidative stress markers during electro-ejaculation procedure in merino rams. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 68(3): 479-486.
- 21.** Freitas de Melo A, Ungerfeld R (2016). Progesterona y respuesta de estrés: mecanismos de acción y sus repercusiones en rumiantes domésticos. *Revisión. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 7:185-199.
- 22.** Fumagalli F, Villagrán M, Damian JP, Ungerfeld R (2011). Physiological and Biochemical Parameters in Response to Electroejaculation in Adult and Yearling Anesthetized Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus*) Males; *Reprod Dom Anim* 47, 308–312; doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01859.x ISSN 0936-6768
- 23.** Gabay C, Kushner I (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New Engl. J. Med.* 340: 448-454.
- 24.** Gil J, Ungerfeld R (2003). *Reproducción de los animales domésticos*. Montevideo, Ed. Melibdea, v.2.
- 25.** Granger DA, Hibel LC, Fortunato CK, Kapelewski CH (2009). Medication effects on salivary cortisol: tactics and strategy to minimize impact in behavioral and developmental science. *Psychoneuroendocrinology* 34(10):1437-48.
- 26.** Gunn RMC (1936). Fertility in sheep. Artificial production of seminal ejaculation and the characters of the spermatozoa contained therein. Melbourne, Council scientific and industrial research, 116 p.

- 27.** Hafez ESE, Hafez B (2002). Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima ed. México. Ed. McGraw-Hill Interamericana, p. 519.
- 28.** Handa RJ, Nunley KM, Lorens SA, Louie JP, McGivern RF, Bollnow MR (1994). Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion in the male rat following novelty and foot shock stressors. *Physiol Behav* 1994;55:117-24.
- 29.** Hatazoe T, Kubota C, Fujiki M, Misumi K (2012). Mating Behavior Increases Workload of the Heart in Thoroughbred Stallions. *J Vet Med Sci* 74 (4): 423-428.
- 30.** Juniewicz PE, Johnson BH, Bolt DJ (1987). Effect of adrenal steroids on testosterone and luteinizing hormone secretion in the rams. *J Androl*; 8:190-196.
- 31.** Le Mevel JC, Abitbol S, Beraud G, Maneiy J (1979). Temporal changes in plasma adrenocorticotropin concentration after repeated neurotropic stress in male and female rats. *Endocrinology* 105:812-817.
- 32.** Lesniewska B, Miskowiak B, Nowak M, Malendowicz LK (1990). Sex differences in adrenocortical structure and function. XXVII. The effect of ether stress on ACTH and corticosterone in intact, gonadectomized, and testosterone- or estradiol replaced rats. *Res. Exp. Med.* 190:95-103.
- 33.** Marco-Jiménez F, Vicente JS, Viudes de Castro MP (2008). Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra ram. *Reprod Domest Anim*; 43:403-408.
- 34.** Marco-Jiménez F, Puchades S, Gadea J, Vicente JS, Viudes-De Castro MP (2005). Effect of semen collection method on the pre- and post- thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology*; 64:1756-1765.
- 35.** Marden WGR (1954). New advances in the electroejaculation of the bull. *J Dairy Sci* 37: 556- 561.
- 36.** Martínez JM (2016) *Patología y Clínica Bovina: recopilación de clases y relatos de la experiencia práctica de un veterinario de campo*, Buenos Aires, Ed. Inter-Médica, 702 p.
- 37.** Mejdell CM, Basic D, Boe KE (2017). A review on the use of electric devices to modify animal behavior and the impact on animal welfare. *VKM Report* p. 42.
- 38.** Moberg GP (1996). Stress and its measurement in domestic animals. A review of behavioural and physiological studies under field and laboratory situations. *Adv Vet Sci Comp Med*; 24:179-210.
- 39.** Morrell JM (2011). Artificial Insemination: Current and Future Trends. En: Manafi, M., Ed., *Artificial Insemination in Farm Animals*, InTech, Rijeka, 1-14.
- 40.** Mosure WL, Meyer RA, Gudmundson J, Barth AD (1988). Evaluation of possible methods to reduce pain associated with electroejaculation in Bulls. *Can Vet* 39:504-506.

41. Nicholson, HD, Parkinson TJ, Lapwood KR (1999). Effects of oxytocin and vasopressin on sperm transport from the cauda epididymis in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 117: 299–305.
42. Odagiri K, Matsuzawa Y, Yoshikawa Y (1995). Analysis of sexual behavior in rams (*Ovis aries*). *Exp Anim* 44(3):187-192.
43. Orihuela A, Omaña JC, Ungerfeld R (2016). Heart rate patterns during courtship and mating in rams and in estrous and nonestrous ewes (*Ovis aries*). *Journal of Animal Science*, 94: 556–562.
44. Orihuela A (2014). La conducta sexual del carnero. Revisión. *Rev Mex Cienc Pecuarias* 5 (1); 49-89.
45. Orihuela A, Aguirre V, Hernández C, Flores-Pérez I, Vázquez R (2009a) Breaking down the effect of electroejaculation on the serum cortisol response, heart and respiratory rates in hair sheep (*Ovis aries*). *J Anim Vet Adv.* 8:1968-1972.
46. Orihuela A, Aguirre V, Hernandez C, Flores-Perez I, Vazquez R (2009b). Effect of anesthesia on welfare aspects of hair sheep (*Ovis aries*) during electro-ejaculation. *J. Anim. Vet. Adv.* 8 (2): 305–308.
47. Ortiz de Montellano M, Galindo-Maldonado F, Cavazos-Arizpe EO, Aguayo-Arceo AM, Torres-Acosta JF, Orihuela A (2007). Effect of electroejaculation on the serum cortisol response of Criollo goats (*Capra hircus*). *Small Rumin Res*; 69:228–31.
48. Palmer CW (2005). Welfare aspects of theriogenology: investigating alternatives to electroejaculation of Bulls. *Theriogenology*; 64:469-479.
49. Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* 35: 163-187.
50. Pineda MH, Dooley MP (1991). Effect of method of seminal collection on the retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of rams. *Am J Vet Res*; 52:307–313.
51. Rasbech NO (1993). Artificial insemination. En: King, Ed. GJ. *Reproduction in domesticated animals*. New York, Elsevier, p. 365-383.
52. Rijnberk AD, Mol JA (1997). Adrenocortical function. En: Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.L. *Clinical biochemistry of domestic Animals*. 5th edition. San Diego, Academic Press, p. 553-570.
53. Romero M, Uribe-Velásquez L, Sánchez J (2011). Biomarcadores del estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne.
54. Santiago-Moreno J, Castaño C, Toledano-Díaz A, Esteso MC, López- Sebastián A, Guerra R (2013). Cryopreservation of aoudad (*Ammotragus lervia sahariensis*) sperm obtained by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands and electroejaculation. *Theriogenology* 79:383–91.

- 55.** Schneider KM (1930). Das Flehmen, pt I. Zool Gart 3:183-198.
- 56.** Slob AK, Groeneveld WH, Van der Werff Ten Bosch JJ (1986). Physiological changes during copulation in male and female stumptail macaques (*Macaca arctoides*). *Physiol. Behav* 38 (6): 891- 895.
- 57.** Stafford KJ, Spoorenberg J, West DM, Vermunt JJ, Petrie N, Lawoko CRO (1996). The effect of electro-ejaculation on aversive behaviour and plasma cortisol concentration in rams. *N Z Vet J*; 44:95-98.
- 58.** Tarrant PV (1989). Animal Behaviour and Environment in the Dark-Cutting Condition in Beef - A Review. *Irish Journal of Food Science and Technology* 13 (1): 1-21.
- 59.** Terrill C (1940). Comparison of Ram Semen Collection Obtained by Three Different Methods for Artificial Insemination. *Proc eerd Annu Mtg Am Soc Anim Prod*. Chicago, IL, pp. 201–207.
- 60.** Ungerfeld R, Casuriaga D, Giriboni J, Freitas de Melo A, Silveira P, Brandao FZ (2017). Administration of cloprostenol and oxytocin before electroejaculation in goat bucks reduces the needed amount of electrical stimulation without affecting seminal quality. *Theriogenology* 107:1-5. DOI: 10.1016.
- 61.** Ungerfeld R, Abril-Sánchez S, Toledano-Díaz A, Beracochea F, Castaño C, Giriboni J (2016). Oxytocin administration before sperm collection by transrectal ultrasonic-guided massage of the accessory sex glands in mouflons and bucks. *Anim Reprod Sci* 173:13e7.
- 62.** Ungerfeld R, López SA, Estes M, Pradiee J, Toledano-Díaz A, Castaño C, Labrador B, Santiago-Moreno J (2015). Physiological responses and characteristics of sperm collected after electroejaculation or transrectalultrasound-guided massage of the accessory sex glands in anesthetized mouflons (*Ovis musimon*) and Iberian ibexes (*Capra pyrenaica*). *Theriogenology* 87 (7): 1067- 1074.
- 63.** Ungerfeld R (2003). Reproducción de los animales domésticos. Montevideo, Ed. Melibea, v.1 291 p.
- 64.** Ulloa LA (2017). Respuesta del estrés al uso de electroeyaculador en carneros con y sin tranquilizante: evaluación de calidad seminal, congelabilidad y parámetros hormonales. Tesis Universidad de Cuenca, 44 p.
- 65.** Van Lier E, Pérez-Clariget R, Forsberg M (2003). Sex differences in cortisol secretion after administration of an ACTH analogue in sheep during the breeding and non-breeding season. *Animal Reproduction Science*, 79, 81–92.
- 66.** Van Lier E, Andersson H, Pérez-Clariget R, Forsberg M (1998). Effects of administration of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) on extragonadal progesterone levels in sheep. *Reproduction in Domestic Animals* 33: 55-59.

- 67.** Viau V, Meaney MJ (1991). Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 129:2503-2511.
- 68.** Watts JM, Stookey JM (2000). Vocal behaviour in cattle: the animal's commentary on its biological processes and welfare. *Applied Animal Behaviour Science*; 67:15–33.
- 69.** Watts JM, Stookey JM (1999). Effects of restraint and branding on rates and acoustic parameters of vocalization in beef cattle. *Appl Anim Behav Sci*; 62:125-135.
- 70.** Welsh TH, Johnson BH (1981). Influence of electroejaculation on peripheral blood concentrations of corticosteroids, progesterone, LH and testosterone in Bulls. *Arch Androl*; 7:245-250.
- 71.** Whitlock BK, Coffman EA, Coetzee JF, Daniel JA (2012). Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls. *Theriogenology* 78, 737–746.