

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EVALUACIÓN DE SEMEN EN CORDEROS, BORREGOS Y CARNEROS MERINO
AUSTRALIANO A CAMPO Y EN EQUIPO COMPUTARIZADO DE ANÁLISIS DE
SEMEN**

“por”

**Valentín SILVA CASTRO
Facundo José FASSANA STIRLING**

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

MODALIDAD: Caso clínico

**SALTO
URUGUAY
2017**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dr. Alejandro Benech

Segundo miembro (Tutor):

QF. Silvia Sterla

Tercer miembro:

Dr. Luis Cal

Cuarto miembro:

Lic. Oscar Irabuena

Fecha:

15/ 09/2017

Autores:

Valentín Silva Castro

Facundo Fassana Stirling

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a nuestras familias por su apoyo permanente e incondicional.

A nuestra tutora Q. F. Silva Sterla por su gran disposición y compromiso desde el comienzo de este trabajo.

Al Lic. Oscar Irabuena por compartir su experiencia en cuanto al rubro aplicándola en este trabajo.

A nuestros amigos, tanto los de la infancia como los conocidos a lo largo de toda esta etapa.

A Bruno Fonseca por la buena voluntad a lo largo de la realización del trabajo estadístico.

A la familia Rodríguez Grasso por permitirnos realizar este ensayo en su establecimiento.

Al Ing. Agr. Daniel Fernández Abella por su contribución y ayuda.

A Biblioteca y sus funcionarios por su amabilidad y contribución en este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	5
RESUMEN.....	7
SUMMARY.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVOS	32
➤ Objetivo general.....	32
➤ Objetivos específicos.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
➤ Localización del ensayo	32
➤ Trabajo de campo	33
➤ Análisis de estadístico.....	35
RESULTADOS	37
DISCUSIÓN.....	57
CONCLUSIONES.....	60
BIBLIOGRAFÍA.....	61

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

Cuadro 1. Determinación de la concentración espermática a través del color del eyaculado.....	23
Cuadro 2. Clasificación de la motilidad espermática.....	24
Cuadro 3. Grados de movilidad en masa e individual	25
Cuadro 4. Coloración Eosina/ Nigrosina.....	27
Cuadro 5. Escala de componentes que conforman el índice de calidad espermática (I.C.E.).....	28
Cuadro 6. P-valor de prueba Kolmogórov-Smirnov de igualdad de distribución, para variable CC.....	37
Cuadro 7. P-valor de prueba t de igualdad de medias, para variable CE.....	38
Cuadro 8. P-valor de prueba t de igualdad de media, variable Volumen.....	40
Cuadro 9. P-valor de prueba t de igualdad de media, variable VCL.....	47
Cuadro 10. P-valor de prueba t de igualdad de media, variable VSL.....	47
Cuadro 11. P-valor de prueba t de igualdad de media, variable VAP.....	48
Cuadro 12. P-valor de prueba t de igualdad de media, variable LIN.....	48
Cuadro 13. P-valor de prueba t de igualdad de media, variable STR.....	48
Cuadro 14. P-valor de prueba t de igualdad de media, variable VCL.....	49
Cuadro 15. P-valor de prueba t de igualdad de media, variable VSL.....	49
Cuadro 16. P-valor de prueba t de igualdad de media, variable VAP.....	49
Cuadro 17. P-valor de prueba t de igualdad de media, variable LIN.....	50
Cuadro 18. P-valor de prueba t de igualdad de media, variable STR.....	50

FIGURAS

Figura 1. Guía práctica para realizar servicio en ovejas en celo natural.....	15
Figura 2. Diferentes técnicas de medición de la talla testicular.....	20
Figura 3. Conteo de la concentración espermática utilizando cámara de Neubauer – Thoma.....	26
Figura 4. Representación esquemática del espermatozoide de carnero.....	26
Figura 5. Principales anomalías morfológicas del semen de carnero.....	27
Figura 6. Parámetros de motilidad obtenidos por el CASA.....	30
Figura 7. Visualización de un campo en módulo de motilidad sistema ISASv1®.....	30
Figura 8. Visualización un campo módulo de concentración en sistema ISASv1®.....	31
Figura 9. Ubicación geográfica de departamento de Salto.....	33
Figura 10. Ubicación del establecimiento “El Totoral” en el departamento de Salto.....	33
Figura 11. Imagen del establecimiento “El Totoral”.....	33
Figura 12. Diagrama de cajas para CC en cada grupo, y en los 3 momentos estudiados en el Grupo1 (días 0, 106 y 231).....	37
Figura 13. Diagrama de cajas para CE en cada grupo, y en los 3 momentos estudiados en el Grupo 1 (días 0, 106 y 231).....	38
Figura 14. Intervalos de confianza para medias poblacionales para parámetro CE (cm).....	39

Figura 15. Diagrama de cajas para peso vivo en el Grupo 1 al comienzo y al final del estudio (días 0, y 231).....	39
Figura 16. Correlación entre CC y CE en cada grupo, y en los 3 momentos estudiados en Grupo 1 (días 0, 106 y 231).....	40
Figura 17. Intervalos de confianza para medias poblacionales para parámetro Volumen (mL).....	41
Figura 18. Intervalo de confianza para medias para parámetro concentración (millones spz/ mL).....	42
Figura 19. Intervalo de confianza para medias para parámetro producción de espermatozoides (millones spz/ eyaculado).....	42
Figura 20. Intervalo de confianza para las medias del parámetro ICE.....	43
Figura 21. Diagrama de dispersión de CC vs volumen.....	44
Figura 22. Diagrama de dispersión de CE vs ICE.....	44
Figura 23. Diagrama de cajas de porcentaje de espermatozoides con velocidad media para los cuatro grupos.....	46
Figura 24. Diagrama de cajas de Porcentaje de espermatozoides con velocidad lenta para los cuatro grupos.....	46
Figura 25. Diagrama de cajas de Porcentaje de espermatozoides con velocidad rápida para los cuatro grupos.....	47
Figura 26. Intervalos de confianza para variable índice de rectitud medio.....	49
Figura 27. Diagrama de dispersión de producción de spz vs espermatozoides móviles progresivos.....	51
Figura 28. Diagrama de dispersión de concentración vs spz con velocidad rápida.....	51
Figura 29. Diagrama de dispersión de Producción spz vs spz con velocidad rápida.....	52
Figura 30. Diagrama de dispersión de ICE vs % espermatozoides con velocidad rápida.....	52
Figura 31. Diagrama de dispersión de concentración vs espermatozoides con velocidad media.....	53
Figura 32. Diagrama de dispersión de ICE vs espermatozoides con velocidad media.....	53
Figura 33. Diagrama de dispersión Volumen vs VCL.....	54
Figura 34. Diagrama de dispersión de producción de espermatozoides vs velocidad curvilínea.....	55
Figura 35. Diagrama de dispersión de ICE vs velocidad promedio.....	55
Figura 36. Diagrama de dispersión de producción de espermatozoides vs velocidad promedio.....	56

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar diferencias en calidad seminal, utilizando métodos manuales y automatizados, en corderos, borregos y carneros Merino Australiano, con el fin de determinar su capacidad reproductiva. Se utilizaron 25 machos Merino Australiano, seleccionados por edad y aptitud reproductiva en los casos que correspondiere, conformándose 4 grupos homogéneos en CC. Grupo 1 corderos (n=6), Grupo 2 borregos (n=7), Grupo 3 carneros 4 y 6 dientes (n=6) y Grupo 4 carneros boca llena (n=6). Se realizó determinación de PV al inicio y al día 231 en Grupo 1. Al día 0 se determinó CC, CE y se extrajo semen, en todos los grupos, repitiéndose al día 106 y 231 en el Grupo 1. Se evaluó en forma manual volumen, color, motilidad, concentración, porcentaje de espermatozoides vivos y normales, calculándose ICE. Se evaluó en forma automatizada, utilizando ISASv1®, concentración, tipo de movimiento (estático, progresivo y no progresivo), velocidad de movimiento (estáticos, lentos, medios y rápidos) y variables cinéticas, VCL, VSL, VAP, LIN, STR. La distribución de CE en Grupo 1 al día 106 no presentó diferencia significativa con el Grupo 2, y la distribución de la CC fue significativamente diferente a los demás grupos ($p < 0,05$), obteniéndose eyaculados en dos animales de este grupo. La media de ICE en el Grupo 3 es significativamente diferente ($p < 0,05$), a la de los Grupos 1 y 2, mientras que la media del Grupo 4 no tiene diferencia significativa con la de los otros grupos. Se encontraron correlaciones positivas entre porcentaje de espermatozoides rápidos y concentración, producción de espermatozoides e ICE ($\rho = 0,44, 0,51$ y $0,48$ respectivamente, $p < 0,05$), porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo y producción de espermatozoides ($\rho = 0,42$, $p < 0,05$), porcentaje de espermatozoides velocidad media y concentración e ICE ($\rho = 0,44$ y $0,57$ respectivamente, $p < 0,05$). Considerando las correlaciones positivas, moderadas y fuertes, entre ICE y producción de espermatozoides por evaluación manual y porcentaje de espermatozoides de movimiento rápido/medio y progresivo por evaluación automatizada, ambos criterios de evaluación seleccionarían en forma concordante los animales de mayor poder de fertilización de acuerdo con lo reportado en la literatura. Finalmente, la CE y CC serían insuficientes para definir el uso de los corderos como reproductores, siendo estrictamente necesaria la obtención y evaluación de semen. Los carneros 4 y 6 dientes presentan diferencia significativa en la calidad seminal con los borregos, mientras que los carneros boca llena no mostraron diferencia significativa en la misma con el resto de las categorías.

SUMMARY

The aim of this study was to assess differences in seminal quality, using manual and automated methods, in Australian Merino lambs, hoggets and rams, to determine their reproductive capacity. Twenty five Australian Merino males were selected by age and reproductive aptitude in the corresponding cases, conforming 4 BC homogeneous groups. Group 1: lambs (n = 6), Group 2: hoggets (n = 7), Group 3: 4 and 6 teeth rams (n = 6) and Group 4: full mouth rams (n = 6). Live weight, was determined at the beginning and at day 231 in Group 1. At day 0, BC, EC was determined and semen was extracted in all groups, repeating it in Group 1 at day 106 and 231. Volume, color, motility, concentration, live and normal spermatozoa percentage were manually evaluated, and sperm index quality, ICE, was calculated. Concentration, type of movement (static, progressive and non-progressive), movement velocity (static, slow, medium and fast) and kinetic variables, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, were automatically evaluated, using ISASv1®. The EC distribution in Group 1 at day 106 did not present a significant difference with Group 2, and the distribution of BC was significantly different from the other groups ($p < 0.05$). Semen samples from two animals was obtained. Group 3 ICE mean is significantly different ($p < 0.05$) from Groups 1 and 2, while Group 4 mean is not significantly different from the other groups. Positive correlations were found between fast spermatozoa percentage and concentration, spermatozoa production and ICE ($\rho = 0.44, 0.51$ and 0.48 respectively, $p < 0.05$), progressive movement spermatozoa percentage and spermatozoa production ($\rho = 0.42, p < 0.05$), average speed spermatozoa percentage, concentration and ICE ($\rho = 0.44$ and 0.57 respectively, $p < 0.05$). Considering these positive, moderate and strong correlations, between ICE and spermatozoa production by manual evaluation, and percentage of fast/ medium and progressive movement spermatozoa by automated evaluation, both methods would make a matching selection of the greater fertilization power animals as it is reported in the literature. Finally, EC and BC would not be sufficient to define the use of lambs as breeders, the collection and evaluation of semen being strictly necessary. Four and six teeth rams presented significant difference in seminal quality with lambs, while full-mouth rams showed no significant difference with the rest of the categories.

INTRODUCCIÓN

En Uruguay la producción ovina representa un pilar en la actividad agropecuaria, durante el año 2015, ingresaron a Uruguay un total de 324 millones de dólares por concepto de exportaciones de los productos que componen el Rubro Ovino (lanas y productos de lana, carne ovina, pieles ovinas, ovinos en pie, grasa de lana y lanolina), (SUL, 2015)

Desde hace algunos años la ganadería, principalmente la ovina, se enfrenta a presiones competitivas por los recursos naturales a rubros de mayor conveniencia económica (forestación, agricultura). Esto lleva a la necesidad de incrementar la productividad y calidad en el rubro, mediante la mejora de la eficiencia en el uso de los factores de producción.

En Uruguay la producción de lana superfina de la raza Merino surgió como una alternativa de valorización y mejora de la competitividad del rubro ovino en las regiones de Basalto y Cristalino. Particularmente, para aquellos productores laneros que desarrollan sus sistemas productivos sobre suelos superficiales con escasas posibilidades de diversificación de la producción (Montossi y col, 2003).

Se señala la eficiencia reproductiva de la majada nacional como la mayor restricción que enfrenta el rubro para su crecimiento sustentable. La baja performance reproductiva de nuestras majadas se encuentra afectada fundamentalmente por: época de encarnerada, peso vivo y condición de las hembras al servicio, nivel nutricional en los momentos claves del ciclo reproductivo, fertilidad de los carneros, manejo de los carneros y la majada durante el servicio, la parición y la crianza. (Ostrowski, 1980, Bonino Morlan, 2000).

Es frecuente que los productores al observar bajos porcentajes de procreo en sus majadas piensen en los carneros como posible causa de ello. Pero la medida correctiva que generalmente toman es el aumento del porcentaje de carneros en servicio no realizando un estudio de la eficiencia de los mismos (Ostrowski, 1980).

En Uruguay, tradicionalmente la reproducción de ovinos se realizaba utilizando servicio directo, siendo necesario para obtener un porcentaje de preñez aceptable un 3% de carneros en la majada (Duran Del Campo, 1980). Este manejo hace que los carneros estén más propensos a contraer lesiones y reducir su vida útil, además de requerir un número mayor de carneros para preñar la majada (Fernández Abella, 2015).

En un estudio sobre la aptitud reproductiva de los carneros utilizados en Uruguay se observó que 24,4% de los mismos no eran aptos para la reproducción. Para determinar la cantidad de machos a utilizar se usa un criterio puramente aritmético, en el que se asume que los machos sub-fértiles o estériles del lote serán compensados en el servicio, al utilizar un mínimo de 3% de carneros (Castrillejo, 1990, Bonino Morlan, 2000). La evaluación clínica reproductiva del carnero permite determinar reproductores potencialmente fértiles (Bonino Morlan, 2000).

La edad de los reproductores tiene una importancia fundamental en la eficiencia reproductiva de la majada. Los carneros sexualmente más activos y más fértiles son los de 4 y 6 dientes. Mientras que los de 8 dientes son menos fértiles, se cansan antes y son más peleadores, por lo que si están en excesiva cantidad impiden un servicio efectivo a los más jóvenes. Por lo anteriormente expuesto, se recomienda repartir el total de la "encarnerada" en un 25% de cada una de las cuatro principales edades dentarias (2, 4, 6 y 8 dientes) y renovar anualmente el 25% de mayor edad.

Esta medida es conveniente desde el punto de vista económico y administrativo del establecimiento, pues permite planificar en cada ejercicio la adquisición de la reposición de padres. A esto se agrega que, a mayor edad de los carneros, es mayor el porcentaje de afecciones genitales, y consecuentemente de rechazos. Por lo tanto, el daño que inflige el excesivo número de carneros viejos es doble, mayor porcentaje de estériles e interferencias con los más jóvenes y fértiles. (Ostrowski, 1980). El mayor potencial génico expresado por los machos entre los 2 y 5 años disminuye un 35% anualmente según Gines de Gea (2007). Por lo tanto, el uso de machos más jóvenes puede reducir costos de producción, acelerar los beneficios de la selección genética, y permitir que se puedan realizar pruebas de progenie y libido de forma más temprana (Wheaton y Godfrey, 2003). La selección de machos a ser utilizados como reproductores es una herramienta extremadamente importante, ya que los carneros con alto desempeño sexual probablemente servirán un número mayor de ovejas en un corto periodo de tiempo, aumentando la presión de selección y la diseminación del material genético deseable (Pacheco y Quirino, 2010).

El control de fertilidad anual de los carneros es una medida que debe estar incluida en la rutina del manejo. Dicho examen debe realizarse anualmente, por lo menos 60 días antes del servicio, a efectos de detectar con tiempo afecciones recuperables y descartar a aquellos que presenten problemas irreversibles (Bonino Morlan, 2000).

Las principales características para evaluar y seleccionar reproductores incluyen la calidad seminal, las características testiculares y el comportamiento reproductivo (Pacheco y Quirino, 2010). Como criterio adicional se realiza la medición de la circunferencia escrotal (CE), fácil de realizar a campo y con alta correlación con las características reproductivas y productivas (Snowder y col., 2002). Existe una correlación positiva entre la CE y la producción espermática (Lino, 1972), por lo tanto, la circunferencia escrotal puede utilizarse para predecir la producción espermática en los carneros (Toe y col., 2000).

La evaluación de la aptitud reproductiva de los carneros se realiza para asegurar y categorizar su potencial habilidad para producir una preñez saludable a término. Finalizada la revisión de los carneros, de acuerdo a Bonino Morlan (2000) se pueden clasificar en: potencialmente aptos para la reproducción, temporalmente no aptos y no aptos.

La calidad espermática, tradicionalmente es evaluada "in vitro" según sus características macro y microscópicas (Fernández Abella, 2015). La evaluación de la calidad del semen en ovinos incluye la determinación de la concentración espermática, el recuento espermático total y la motilidad (masal e individual). A estos parámetros puede agregarse la morfología, cuestionándose la fertilidad del carnero cuando tiene más de 20% de formas anormales (Hafez, 2000).

Estos parámetros no nos indican una fertilidad definitiva, a pesar de eso, nos brindan información válida sobre la calidad seminal de una muestra (Hidalgo, 2003). Debido a que no existe un parámetro único que prediga la fertilidad "in vivo", es un reto para los profesionales del área predecir la capacidad de fertilización. Para aumentar las probabilidades de lograr una mejor selección de los reproductores en ovinos u otras especies es necesario incorporar técnicas más avanzadas a la hora de evaluar el semen (Christensen y col 1999).

La introducción en el análisis seminal de sistemas automatizados de análisis (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA), ha permitido el estudio de la motilidad,

concentración espermática y anomalías morfológicas sin el factor subjetivo e incorporando la medida cuantitativa de variables cinéticas y morfométricas de los espermatozoides (Gil y col., 2009).

La determinación de la edad de la pubertad y el comienzo del desarrollo sexual es una herramienta valiosa para la selección dentro de los machos de una misma raza (Land, 1977, citado por Madani y col., 1989).

La pubertad en el carnero es una etapa relativamente larga, en la que se observa un aumento progresivo en la secreción de testosterona, un incremento de la espermatogénesis y los primeros signos típicos de comportamiento de apareamiento. En el carnero se observa un aumento del tamaño de los testículos a las 8-10 semanas de edad, alcanzando de 16 a 20 kg de peso corporal. Esto coincide con la aparición de espermatozoides primarios y el agrandamiento de los túbulos seminíferos. Entre los 4 y 6 meses de edad se observan las primeras copulas con eyaculación de espermatozoides viables, momento en el que alcanzan un peso de 40 al 60 por ciento del peso vivo (García Sacristán, 1995).

En términos prácticos, el comienzo de la pubertad en el macho se manifiesta a partir de la producción de una suficiente cantidad y calidad de espermatozoides como para fecundar (Fernández Abella, 1993). Aunque la pubertad es un proceso paulatino, en carneros se puede definir que alcanzan la pubertad cuando el eyaculado contiene 50×10^6 espermatozoides/ mL y presenta por lo menos un 10% de células móviles (Amann y Schanbacher, 1983). Se considera que todos los componentes del aparato reproductor masculino han alcanzado un desarrollo tal que el sistema en su conjunto sea funcional. Existen factores como la raza, la edad, el estado nutricional, la presencia de enfermedades, temperatura, la estación y los factores sociales que pueden influir en la edad en la que los corderos machos llegan a la pubertad y en su actividad reproductiva (Mandiki y col., 1998).

Por todo lo anteriormente expuesto, en este trabajo se plantea determinar la edad aproximada en que un macho es capaz de eyacular semen de buena calidad a fin de intensificar el uso de machos jóvenes, logrando así disminuir los intervalos generacionales y obtener un mayor progreso genético.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Aparato reproductor del macho

El sistema reproductor del macho está comprendido por los testículos, encargados de la producción de los gametos y las hormonas masculinas; los ductos excretores, los que conducen los espermatozoides; las glándulas anexas, responsables de la dilución, el aumento de volumen y adición de sustancias al producto de los testículos; y pene y uretra, cuya función es la conducción de esta secreción hasta los órganos sexuales femeninos (Durán del Campo, 1980).

El testículo es el órgano central del aparato reproductor. Durante el periodo posnatal el crecimiento de dichas gónadas acompaña al corporal, mientras que al alcanzar el tamaño adulto las variaciones en sus pesos se deben a factores ambientales, oscilando entre 100 y 350 gramos por testículo. Estos órganos no persisten en cavidad abdominal, sino que descienden a la bolsa testicular o escroto durante el nacimiento, aunque en algunos animales pueden persistir en región inguinal durante

algunas semanas. La temperatura testicular ha de ser 4 a 5°C menor a la temperatura rectal (39°C), de lo contrario la espermatogénesis se verá afectada (Fernández Abella, 1993).

Además de la disposición de las gónadas fuera del abdomen en la bolsa testicular, existen otros mecanismos que aseguran una adecuada termorregulación: la presencia de una red capilar en escroto que posibilita la variación del flujo sanguíneo aumentando la disipación de calor; la cercanía del plexo pampiniforme que permite la refrigeración de la sangre arterial que llega al testículo y; en última instancia, las contracciones reflejas de los músculos cremaster interno y dartos que actúan acercando o alejando los testículos del abdomen al regular la temperatura (Waites y Voglmayr, 1962; Martin y col., 1984).

Una túnica externa llamada albugínea envuelve a los testículos brindándoles protección. De dicha túnica irradian tabiques musculares que dividen al parénquima en lóbulos y, que al converger hacia el centro del órgano, forman el mediastino testicular (Durán del Campo, 1980).

El parénquima de los testículos se compone de una gran cantidad de túbulos seminíferos muy contorneados y de tejido intersticial. La pared de estos tubos se constituye de una membrana basal y de epitelio germinal pluriestratificado, el cual está constituido por células germinales en diferentes etapas de diferenciación y las células de Sertoli. Estas últimas regulan y coordinan la formación y liberación de los espermatozoides. Entre los túbulos seminíferos existe un tejido conjuntivo en el que se disponen nervios y vasos sanguíneos y linfáticos, además de las células de Leydig, encargadas de la secreción de testosterona (Fernández Abella, 1993).

La longitud de los tubos seminíferos del carnero se ha calculado en aproximadamente 4000 metros (Durán del Campo, 1980).

El epidídimo es un conducto único, sinuoso, que puede ser dividido en tres segmentos: cabeza y cuerpo, encargados de la maduración de los espermatozoides, y la cola, destinada a su almacenamiento (Hafez y Hafez, 2000). Aquellos espermatozoides que ingresan a este conducto a través de la rete testis son inmóviles e infértiles, adquiriendo motilidad y capacidad para fecundar luego de experimentar el proceso de migración y maduración a través de la cabeza y el cuerpo del epidídimo. El recorrido de los gametos a través de dichos segmentos (cabeza y cuerpo) abarca de 2 a 5 días y no se altera con el número de eyaculaciones. El almacenamiento en la cola del epidídimo varía de 3 a 13 días y se reduce notablemente en machos sexualmente activos (Cunningham, 2009).

El conducto deferente es quien conduce el esperma desde la cola del epidídimo hasta la uretra, la cual llega hasta el extremo distal del pene y desemboca en el proceso vermiforme o glande del carnero (Dyce, 1999).

El pene es el órgano copulador del macho, el cual tiene su origen en la arcada isquiática y se extiende a través de la pared abdominal ventral hasta la zona próxima al ombligo. Este órgano es más o menos cilíndrico y está envuelto por una cápsula fibrosa llamada túnica albugínea. Dicha túnica envuelve diversos espacios cavernosos, lo que se conoce como cuerpo cavernoso, además del cuerpo esponjoso que se presenta rodeando la uretra (Cunningham, 2009).

Una serie de glándulas anexas completan los órganos sexuales internos y son las responsables de brindar fluidez, volumen y movilidad al eyaculado: las vesículas seminales, ubicadas sobre el cuello vesical; la próstata detrás del cuello de la vejiga;

las glándulas bulbouretrales, situadas sobre la uretra y las glándulas de Littre, en el espesor de la uretra (Durán del Campo, 1980).

Pubertad

La pubertad es un proceso dinámico gradual y progresivo que, aunque delimitado, no es un evento puntual, el individuo ha alcanzado un desarrollo suficientemente avanzado de todos los componentes del aparato reproductor tal que el sistema en su conjunto es funcional. Esta etapa precede a la madurez sexual, el individuo continúa su crecimiento y maduración hasta expresar su máximo potencial reproductivo (Rattray, 1984).

En corderos machos, la pubertad puede definirse basándose en parámetros de la espermatogénesis, en cambios testiculares u hormonales (Davis y col, 1986)

El aparato reproductor masculino durante su maduración postnatal sufre una serie de cambios en sus características morfológicas, funcionales y bioquímicas necesarias para la producción y transferencia de gametos viables. Produciéndose el desarrollo testicular, la diferenciación de células germinales en el testículo, la activación de células de Sertoli y Leydig, así como el desarrollo de las glándulas sexuales accesorias (Desjardins, 1978).

El descenso de los testículos (originariamente ubicados en la cavidad abdominal) hacia la bolsa escrotal acontece inmediatamente antes o incluso al momento del nacimiento. El crecimiento testicular, que inicialmente ocurre a una tasa muy baja, se incrementa hacia las 8 a 10 semanas de vida. Los primeros espermatoцитos primarios aparecen en los túbulos seminíferos hacia la 10^o semana, mientras que la aparición de espermatozoides en la orina ocurre hacia la 16^o semana o un poco antes. La conducta sexual se inicia tempranamente durante los primeros meses de vida, pero ésta es inespecífica. (Simonetti y col. 2014).

Durante la pubertad en el carnero, se observa un aumento progresivo en la secreción de testosterona, un incremento de la espermatogénesis y los primeros signos típicos de comportamiento de apareamiento. Se produce un aumento del tamaño de los testículos a las 8-10 semanas de edad, alcanzándose, asimismo, 16 a 20 kg de peso corporal. Esto coincide con la aparición de espermatoцитos primarios y el agrandamiento de los túbulos seminíferos.

Entre los 4 y 6 meses de edad se observan las primeras cópulas con eyaculación de espermatozoides viables, momento en el que alcanzan un peso de 40 al 60 por ciento del peso vivo (García Sacristán, 1995).

La aparición de espermatozoides en el eyaculado y la desaparición de adherencias a nivel de pene y prepucio están altamente correlacionadas (Dun, 1955; Walker y col, 1985).

En términos prácticos, el comienzo de la pubertad en el macho se manifiesta a partir de la producción de una suficiente cantidad y calidad de espermatozoides como para fecundar (Fernández Abella, 1993). Se puede decir que un cordero ha alcanzado la pubertad cuando en el eyaculado contiene 50 x10⁶ espermatozoides/ mL y por lo menos 10% de ellos son móviles (Amann y Schanbacher, 1983). En resumen, un animal puede ser considerado púber una vez iniciada su actividad reproductiva (Fernández Abella, 1993).

El desarrollo sexual, tal como se indica por el crecimiento de los órganos reproductivos y por la realización de la espermatogénesis en forma completa, parece

estar más estrechamente relacionado con el crecimiento del cuerpo que por la edad cronológica. Por lo tanto, el nivel de nutrición durante la cría, o cualquier alteración en el crecimiento, puede tener una marcada influencia en el desarrollo puberal (Dyrmundsson, 1973).

Existen factores como la raza, la edad, el estado nutricional, la presencia de enfermedades, temperatura, la estación y los factores sociales que pueden influir en la edad en la que los corderos machos llegan a la pubertad y en su actividad reproductiva (Mandiki y col., 1998).

La conducta sexual se inicia tempranamente durante los primeros meses de vida, pero ésta es inespecífica. La madurez sexual, marcada por la posibilidad de generar preñez a partir de un salto eyaculatorio y por el desarrollo de una conducta sexual bien determinada, ocurre a partir de las 24 semanas de edad aproximadamente. Sin embargo, en borregos púberes la producción espermática es de baja cantidad y calidad. Incluso borregos de dos dientes (categoría de unos 1 a 1,5 años) que van a su primer servicio, suelen tener menor concentración espermática y libido que los carneros adultos (Simonetti y col., 2014).

Libido y capacidad de servicio

Para que un macho pueda engendrar necesariamente debe producir una alta cantidad de espermatozoides con poder fecundante. Además de tenerse en cuenta la producción de semen, en los servicios a campo y montas a corral el sistema de apareamiento debe ser efectivo, si el carnero no tiene libido o manifiesta poca destreza para realizar los servicios su fertilidad podría llegar a ser nula (Fernández Abella, 2015).

La inhibición sexual de los carneros puede tener varios orígenes, la recría de machos junto a las hembras acelera el inicio de la actividad (Orgeur y col, 1984). Los borregos muestran muchas veces interés luego de varios encierros con hembras en celo, a su vez en condiciones de campo, la observación del trabajo de los carneros lleva a que los borregos se exciten (Fernández Abella, 2015).

Las pruebas de capacidad de servicio se basan en utilizar cuatro o cinco ovejas en celo y contabilizar el número de servicios en un período determinado, los mejores resultados se obtienen realizando dos pruebas en una hora, diferentes días y rotando las hembras utilizadas (Kilgour y Fernández Abella, 1985).

La alta capacidad de servicio en carneros con poca producción espermática podría llevar que a los pocos días de iniciado el servicio sus eyaculados sean muy poco concentrados. Los carneros Merino a campo presentan un valor promedio de 400 mil espermatozoides, muy inferior a los 50 a 60 millones requeridos para la fecundación (Lindsay 1984). La oveja servida por varios carneros mejora su fertilidad, pasando de 34 a 60% cuando son apareadas con uno, 4 o más machos (Knight y Lindsay 1973). En condiciones de servicios a campo, las ovejas reciben las dosis necesarias para la fecundación ya que las mismas son servidas varias veces por el mismo carnero o por varios (Fulkerson y col, 1982). Es necesario utilizar un número adecuado de carneros en el servicio para que esto suceda combinado a una buena capacidad de servicio de los mismos. A su vez la preferencia, las interacciones sociales entre carneros, la dominancia, son factores para tener en cuenta. Normalmente un carnero es dominante por la edad, presencia de cuernos, tamaño o

agresividad, la dominancia puede impedir que otros carneros realicen sus servicios, los machos subordinados cubren a las ovejas antes o después de los dominantes, generalmente al principio o al final del celo cuando la fertilidad de las hembras decae (Edey y col, 1978). El carnero dominante con alta capacidad de servicio puede formar harén por más tiempo reduciendo la fertilidad, más aún si su producción espermática es mala (Fernández Abella, 2015).

	Monta a campo Potrereros		
	Monta a corral (1)	Chicos (<50 ha)	Grandes o quebrados
Edad de macho	Número de hembras por macho		
Cordero (7-8 meses)	20-25	-	-
Borrego (12-18) meses	50-75	30-50	20-35
Adulto (hasta 6-7 años)	100-140	35-80	25-50

Nota: En la I.A. el número de hembras dependerá de la fertilidad del semen, del número de eyaculados colectados y del método de inseminación (ver Capítulo 8).
 *En ovejas en celo sincronizado se recomienda utilizar 1 macho cada 5 a 7 ovejas/día durante no más de una semana. Si se realiza monta a corral (dirigida) hasta 8-10 ovejas/día. La variación del número de ovejas dependerá de la producción espermática.
 (1): Si se realiza una monta libre durante la noche encerrando el rebaño, manejar valores similares.

Figura 1. Guía práctica para realizar servicio en ovejas en celo natural.

Fuente: Fernández Abella, 2015

El porcentaje de carneros en servicios a campo dependerá de la época de apareamientos, en otoño el mayor número de hembras en celo requerirá mayor número de machos por oveja. En primavera o verano es fundamental comenzar el servicio con 3% o más de machos para favorecer el inicio de la actividad y luego descender a 2% rotando los machos (Fernández Abella, 2015).

Los carneros sexualmente más activos y más fértiles son los de 4 y 6 dientes, los de 8 dientes son menos fértiles, se cansan antes y son más peleadores, por lo que si están en excesiva cantidad impiden un servicio efectivo a los más jóvenes. A esto se agrega que, a mayor edad de los carneros, es mayor el porcentaje de afecciones genitales, y consecuentemente de rechazos (Ostrowski, 1980).

El mayor potencial génico expresado por los machos entre los 2 y 5 años disminuye un 35% anualmente según Gines de Gea (2007). Por lo tanto, el uso de machos más jóvenes puede reducir costos de producción, acelerar los beneficios de la selección genética, y permitir que se puedan realizar pruebas de progenie y libido de forma más temprana (Wheaton y Godfrey, 2003).

Por lo anteriormente expuesto, se recomienda repartir el total de la “encarnerada” en un 25% de cada una de las cuatro principales edades dentarias (2, 4, 6 y 8 dientes) y renovar anualmente el 25% de mayor edad.

El control de fertilidad anual de los carneros es una medida que debe estar incluida en la rutina del manejo. Dicho examen debe realizarse anualmente, por lo menos 60 días antes del servicio, a efectos de detectar con tiempo afecciones recuperables y descartar a aquellos que presenten problemas irreversibles (Bonino Morlan, 2000).

Espermatogénesis

La espermatogénesis, o sea el desarrollo de la célula germinal masculina, tiene lugar en los túbulos seminíferos, y consiste en los siguientes pasos: las células más indiferenciadas ubicadas en la base del túbulo, llamadas espermatogonias, se dividen por mitosis, dando como resultado una espermatogonia activa, que finalizará su desarrollo, y una latente, que permanecerá como tal hasta que la activa haya completado su evolución. En ese momento se dividirá por mitosis, dando a su vez una espermatogonia activa y otra latente. La espermatogonia activa dará lugar a dieciséis espermatozoides primarios, por varias mitosis sucesivas acompañadas de un proceso de diferenciación. Cada uno de los espermatozoides primarios sufrirá la primera división meiótica, dando origen a dos espermatozoides secundarios, de número haploide de cromosomas. Cada uno de éstos, a su vez, en la segunda división meiótica, dará origen a dos espermátides, cada uno de los cuales, por metamorfosis, originarán un espermatozoide, que madurará en forma definitiva en el epidídimo. El ciclo de la espermatogénesis en el carnero tiene una duración de aproximadamente 47 días (Senger, 2003).

La espermatogénesis es un proceso que se halla bajo control hormonal: la hormona folículo-estimulante junto con la testosterona son las que estimulan el proceso (Steinberger y Steinberger, 1969).

Endocrinología de la espermatogénesis

El hipotálamo es el responsable de liberar la hormona GnRH, encargada de regular la actividad reproductiva al ser liberada a los vasos porta hipofisarios de manera pulsátil, estimulando a la hipófisis para que secreta hormonas (Ungerfeld, 2002a). Las hormonas hipofisarias actúan sobre los testículos con el fin de iniciar y mantener la espermatogénesis (Duran Del Campo, 1980).

Desde el punto de vista morfológico se clasifica la hipófisis en lóbulo anterior, medio y posterior. En cuanto a las hormonas que actúan en la esfera de la reproducción se encuentran: Prolactina, Hormona folículo estimulante (FSH) y Hormona Luteinizante (LH) producidas en el lóbulo anterior y la oxitocina producto del lóbulo posterior (Duran Del Campo, 1980).

La LH es necesaria en forma continua para que la actividad espermatogénica sea normal, ya que de ella depende la producción de testosterona mientras que la FSH, es necesaria para iniciar la producción de espermatozoides en la pubertad o al comienzo de la estación reproductiva, pero no parece ser necesaria para el mantenimiento de la espermatogénesis (Evans y Maxwell, 1990). La FSH parece cobrar mayor importancia en el establecimiento de la población normal de células de Sertoli durante el período prepuberal (Kilgour y col., 1998).

La prolactina estimula la espermatogénesis a través de un incremento del número de receptores a LH presentes en las células de Leydig. En el caso del carnero, esta hormona tendría un papel importante en el período de recuperación de las células de Leydig, previo al inicio de la temporada reproductiva (Sharpe, 1982).

Las hormonas sexuales, al llegar la pubertad, comienzan a ser segregadas por la hipófisis y, mediante el torrente circulatorio, llegan a su órgano blanco, el testículo. Allí, la FSH incita a la capa celular más excéntrica del epitelio germinal a dar inicio a la serie de divisiones que llevarán a la formación de nuevos espermatozoides (Duran Del Campo, 1980). La LH controla la producción de testosterona por las células de

Leydig (Ungerfeld, 2002a) y permite una adecuada función de la FSH (Duran Del Campo, 1980). La testosterona además de ser la hormona masculina encargada de inducir las características sexuales del macho también es importante para posibilitar una apropiada actuación de la FSH (Duran Del Campo, 1980).

Las células de Sertoli presentes en el túbulo se encuentran reguladas por las hormonas FSH y testosterona. Pruebas existentes indican que la FSH estimula a las células de Sertoli a aromatizar la testosterona y producir estrógenos. Por otra parte, la FSH estimula la producción de la Proteína ligadora de andrógeno (ABP), la cual es secretada en los espacios intercelulares del epitelio seminífero y en la luz de los túbulos seminíferos. Dicha proteína tiene la función de mantener las altas concentraciones de andrógeno presente en los túbulos seminíferos (Ungerfeld, 2002a).

Las células de Sertoli producen una hormona proteica denominada inhibina. El efecto de dicha proteína es suprimir la secreción de FSH, probablemente actuando directamente sobre la hipófisis (Ungerfeld, 2002a).

Factores que influyen en la espermatogénesis

Nutrición

El sistema neuroendócrino reproductivo de los carneros es altamente sensible a cambios en la nutrición (Wood y col., 1991a) y en los corderos machos, afecta marcadamente el inicio de la pubertad (Pretorius y Marincowitz, 1968).

Los alimentos ricos en proteína permiten aumentar 40% la producción espermática (Oldham y col., 1978; Cameron y col., 1988), mientras que aquellos ricos en energía (animales estabulados) provocan procesos degenerativos en la maduración espermática (Gunn, 1942; Galloway, 1966).

Los animales inmaduros son más susceptibles que los adultos a deficiencias nutricionales, pudiendo en algunos casos sufrir daños permanentes en la función reproductiva (Ferrel, 1991). En el período prepuberal, la desnutrición generalmente retarda el desarrollo sexual, observándose retraso en el inicio de la pubertad, aparición tardía de los genitales externos y supresión de la espermatogénesis (Reid, 1960; Baronos y col., 1969; Leathem, 1975).

En Uruguay, a latitud intermedia, y con condiciones de cría a pastoreo la evolución de la talla testicular acompaña los cambios en el crecimiento de las pasturas (Fernández Abella y col., 1993). Los efectos del fotoperiodo son enmascarados por los cambios en la alimentación, observándose variaciones estacionales cuando las condiciones nutricionales son de penuria o están afectadas en su calidad (Fernández Abella, 2015).

Temperatura

La temperatura es el factor ambiental que influye más marcadamente en la espermatogénesis, ésta debe ocurrir a unos 5° C por debajo de la temperatura corporal, existiendo para ello diferentes mecanismos propios de termorregulación. Si la temperatura es baja, los mecanismos antes mencionados son suficientes para mantener una temperatura testicular apropiada. Mientras que en condiciones de

mucho calor pueden no ser suficientes, conduciendo a una producción espermática inadecuada (Simonetti y col, 2014).

Las temperaturas altas actúan sobre el testículo, disminuyen la síntesis de testosterona, alteran la espermatogénesis y la maduración en epidídimo. Se observan alteraciones primarias y secundarias, en períodos variables post exposición a dichas temperaturas, llegando a 8 semanas o más (Fernández Abella, 2015). La disminución de la calidad del semen provoca un descenso en la fertilidad pudiéndose producir esterilidad temporal (Dutt y Hamm, 1957, Howarth, 1969).

Otros factores que pueden influir elevando la temperatura corporal son los estados febriles causados por enfermedades, arreos prolongados o estrés (Simonetti y col, 2014). Las altas temperaturas causaron una disminución en los siguientes parámetros del eyaculado: volumen, concentración de espermatozoides, motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos y de espermatozoides normales en estudios realizados por Dun, 1956; Moule, 1970 y Rathore, 1970.

Por lo anteriormente mencionado y teniendo en cuenta la duración de la espermatogénesis, alrededor de 50 días, se recomienda mantener a los carneros en lugares frescos dos meses antes a la encarnerada para evitar prevenir problemas de fertilidad (Fernández Abella, 2015).

Estacionalidad

El ovino ha desarrollado un método de contracepción natural impidiendo la reproducción en periodos no favorables (Lincoln y Short, 1980).

Los mensajes del fotoperiodo provocan una acción sobre el eje hipotálamo- hipófisis, previo pasaje por la glándula pineal, determinando una menor sensibilidad a la retroalimentación negativa de los esteroides gonadales. La información lumínica llega a la glándula pineal, ésta secreta melatonina, hormona que participa en la regulación de la actividad hipotálamo-hipófisis gonadal (Hastings y col., 1985; Arendt, 1986). La duración de la secreción nocturna de la melatonina sigue un ritmo circadiano endógeno y actúa como un mensaje pasivo que provee información al eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, activando o inhibiendo su acción (Reiter, 1993).

La sensibilidad del carnero al fotoperiodo no es tan marcada como en la oveja. A diferencia de las ovejas que sólo producen óvulos durante cierta época del año, los carneros producen espermatozoides de manera continua. Sin embargo, la eficiencia reproductiva varía a lo largo del año, coincidiendo la época cíclica de las ovejas con el mejor desempeño reproductivo de los carneros (Simonetti y col, 2014).

Los carneros presentan fluctuaciones estacionales en el comportamiento sexual, en la actividad hormonal, en la espermatogénesis, en el peso y volumen testicular (Schanbacher y Lunstra, 1976; Lincoln y Davidson, 1977; Ortavant y col., 1985). Estos parámetros son altos al final del verano y en otoño, y bajos en el final del invierno y en primavera (Lincoln y Short, 1980; Pelletier y Almeida, 1987). Durante los días largos de primavera e inicio de verano la producción de semen es inferior en cantidad y en calidad según Schanbacher (1979). Dacheux y col., (1981) registraron que la producción del parénquima testicular es 50 a 80% menor en primavera que en otoño. El peso y tamaño testicular alcanza su máximo desarrollo en el otoño (peso promedio de 300g y rango de circunferencia escrotal de 30 a 32cm), asegurando una producción espermática mayor. El peso testicular evoluciona en sentido inverso a la cantidad de horas luz (Lindsay y col., 1984), siendo el aumento de peso

consecuencia del mayor número de espermatozoides liberados en los tubos seminíferos (Hochereau de Reviers y col., 1976). La calidad espermática también está afectada por el fotoperiodo, de modo que durante los días largos se tornan más frecuentes las alteraciones morfológicas, tales como la presencia de gota citoplasmática y las anomalías en acrosoma (Simonetti, y col., 2014).

Los cambios estacionales en la actividad reproductiva en los carneros son menos evidentes cuando se mantienen cerca de la zona ecuatorial. Esto se debe a que, en estas áreas, los cambios en el fotoperiodo son menos pronunciados (Souza y col., 2007). Hay notorias diferencias entre razas ovinas, y existe un vínculo entre el origen geográfico de una raza ovina y su grado de estacionalidad. En términos generales, cuanto más cercano a los polos geográficos es el origen de una raza, más marcada es la estacionalidad reproductiva que presenta (Bronson, 1988). En las razas más estacionales la libido está afectada por las horas de luz, disminuyendo durante la primavera/verano (Simonetti, y col., 2014).

Fernández Abella y col. (1993) estudiaron las variaciones estacionales en la producción espermática de cuatro de las razas ovinas más utilizadas en Uruguay (Corriedale, Ideal, Merilín y Merino). En Ideal se registraron cambios en el eyaculado que acompañaron las variaciones del fotoperíodo, en condiciones decrecientes del mismo, se registraron aumentos en la libido, y en concentración y producción espermática. En las condiciones de nuestro país, la raza Ideal presentaría estación reproductiva (octubre-noviembre a junio-julio). Las otras 2 razas de lana fina (Merino y Merilín) presentan una estación reproductiva similar, mientras que la raza Corriedale presentaría una estación reproductiva más corta (diciembre-enero a junio-julio).

Raza

Existen variaciones importantes entre razas en la concentración espermática, siendo los eyaculados de las razas carniceras más concentrados que los observados en razas laneras (Hochereau de Reviers y col., 1985).

Fernández Abella y col. (1993) estudiaron las razas más utilizadas en Uruguay, Merino, Corriedale, Ideal y Merilín, encontrando que en Corriedale la concentración fue 10% inferior a las otras tres. Esto podría deberse a una menor producción por volumen testicular constatada por estos autores.

Simonetti y col. (2014); Fernández Abella (2015), manifiestan que las razas con mayor aptitud carnicera o lechera tienden a producir semen de mayor concentración espermática que las razas de aptitud lanera. También reportan una mayor prepotencia o conducta sexual en los machos carniceros o lecheros.

Sanidad

La sanidad incide sobre el desempeño reproductivo de los machos, ya sea por afectar el estado general, producir cuadros febriles o incidir directamente sobre la producción espermática. Los procesos reproductivos y en especial la espermatogénesis son afectados por enfermedades ya sea infecciosas o metabólicas, ejemplo de ello es la Brucelosis ovis la cual produce inflamación y durezas en testículos y epidídimos. (Castrillejo, 1987; Simonetti, 2014). Cualquier evento que limite la tasa de crecimiento de un carnero durante su desarrollo

prepuberal retrasa, pero no impide que eventualmente se manifieste la pubertad (Bester, 2006).

Edad

La producción espermática está directamente relacionada al desarrollo del testículo, se producen 20 a 25 millones de espermatozoides/día por gramo testicular (Cameron y Tilbrook, 1990). El crecimiento testicular se ha reportado correlaciona más con el PV que con la edad (Sanford y Dickson 2008), por esto al producir una mejora en el peso corporal de los borregos, podemos mejorar su producción espermática (Fernández Abella y col., 1992).

En el macho joven se observa un mayor porcentaje de anomalías primarias, producidas durante la espermatogénesis, determinando un descenso del 10% de la fertilidad en el semen de borrego con respecto al macho adulto al utilizarlo en I.A. y lo que puede incrementarse en servicios a campo por tener los borregos menor libido y capacidad de servicio (Colas, 1983; Fernández Abella, 2015). Asimismo la cantidad de espermatozoides por eyaculado desciende más rápidamente en el borrego que en carnero (Lightfoot, 1968).

Factores sociales

Ha sido reportado que la exposición temprana a ovejas en celo, en corderos prepúberes, es un estímulo positivo para el desarrollo del comportamiento sexual (Price y col., 1996). Asimismo, carneros criados en grupos sólo de machos, cuando adultos, fracasaron en el apareamiento con hembras en celo (Zenchak y Anderson, 1980).

Ungerfeld y González-Pensado (2008) observaron que corderos de alto rango social maduran sexualmente antes que corderos de bajo rango, dichos corderos aumentaron su peso corporal y su circunferencia escrotal antes que los animales de bajo rango.

En los ovinos, el vínculo emocional entre la madre y su descendencia masculina, más que otros factores sociales o genéticos, puede determinar alteraciones irreversibles, tanto en el ámbito social como sexual (Kendrick y col., 1998).

Tamaño testicular como indicador de fertilidad

La producción espermática está estrechamente relacionada al tamaño testicular, habiendo sido reportada una correlación entre peso y producción espermática de 0.80 (Lindsay y col., 1984). A su vez el tamaño testicular es una variable de heredabilidad media- alta, mayor a 0.5 según Haley y col., (1990). Los hijos de machos con tamaño testicular por sobre el promedio presentan si son hembras, mayor fertilidad y si son machos, mayor concentración espermática y mayor tamaño testicular (Purvis y col., 1988).

Se pueden utilizar para estimar el tamaño testicular: circunferencia diámetro y volumen, siendo los dos primeros más fáciles de determinar, no requiriendo entrenamiento previo (Fernández Abella, 2015). Existe una alta correlación entre volumen testicular, determinado por orquímetro y producción espermática con dos

meses de diferencia, siendo los valores de correlación de diámetro y circunferencia similares, de mediana magnitud.

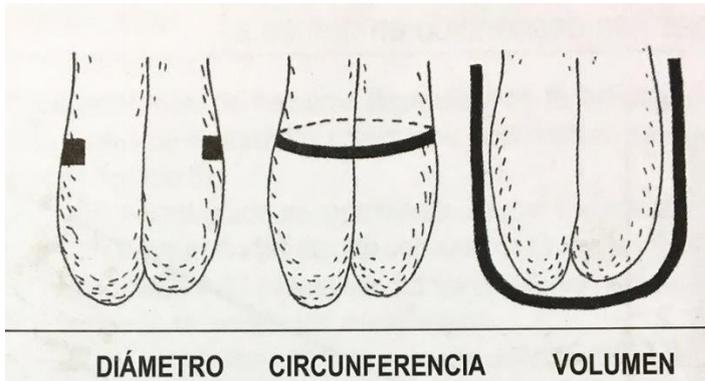


Figura 2. Diferentes técnicas de medición de la talla testicular
Fuente: Fernández Abella, 2015

Semen

El semen es el producto de la mezcla de material fluido y morfológico. El primero es producto de las glándulas anexas del aparato genital (vesículas seminales o de Littre, bulbouretrales o de Cowper y próstata), la segunda (espermatozoides) es producto de los testículos. (Duran Del Campo, 1980). La relación plasma seminal/ espermatozoides en el semen ovino es 75/25, en el semen proveniente de electroeyaculación puede alcanzar a 95/5 (Fernández Abella, 2015).

El carnero emite un promedio de volumen de semen de 0.8 a 1.5 mL, 74% corresponde a líquido seminal y 26% a los espermatozoides. El fluido seminal presenta un pH ácido de 6.5 a 6.8. Contiene un 86% de agua y el 14% restante es materia seca, siendo la misma diversas sales inorgánicas y trazas minerales. Las sales de yodo, calcio y potasio son las más importantes, también encontramos magnesio, hierro, ácido láctico y cítrico, aminoácidos, proteínas, vitaminas, enzimas, entre otros. En cuanto a los carbohidratos la fructosa es la más importante y abundante, la misma es la fuente de energía de los espermatozoides mediante su desdoblamiento químico (Duran Del Campo, 1980).

Colecta de semen

Es necesaria realizar la colecta de semen cuando se quiere evaluar la calidad del mismo, para llevar a cabo técnicas de inseminación artificial (IA) o para congelamiento y almacenamiento para su posterior utilización. Actualmente se utilizan métodos directos para la colecta de semen, vagina artificial o electroeyaculador (Fernández Abella, 2015).

La vagina artificial es una imitación de la vagina de la oveja, estimula térmica y mecánicamente, por temperatura y presión, para lograr la eyaculación. Es conveniente excitar al carnero previamente con las ovejas en celo. Luego de verificar la higienización del lugar y la del animal, se procede a asegurar la oveja en el cepo. El operador encargado de la colecta se ubica en cuclillas al lado del carnero, cuando éste salta, debe desviar el pene hacia la vagina artificial (Gibbons y col., 1993).

La electroeyaculador consiste en un electrodo bipolar que se introduce en el recto del animal 15 a 20 cm, haciendo pasar una corriente alterna de 6 a 12 voltios, provocando la emisión del semen. El volumen de semen obtenido por este método es mayor al obtenido en la colecta con vagina artificial debido a una mayor estimulación de las glándulas anexas, también puede producirse contaminación con orina (Fernández Abella, 2003). No todos los carneros responden al electroeyaculador, el método mayormente recomendado es la vagina artificial la cual permite obtener eyaculados con mejor concentración espermática, motilidad y congelabilidad. Para poder utilizarla los animales seleccionados deben ser entrenados para saltar con la presencia del operador (Gibbons y col., 1993)

Excitación previa del carnero

Existen diferentes tipos de libido en los reproductores, fuerte, vivo, quieta y débil. En carneros de libido fuerte la eyaculación es de mayor facilidad, llevándose a cabo en poco tiempo. A medida que la escala disminuye, no solo tardan más, sino que a veces la estimulación es necesaria. Para obtener un buen eyaculado es conveniente seleccionar una oveja en celo, incitar al carnero a su cortejo y en caso de que el reproductor presente libido débil ponerlo junto al lote de ovejas en celo durante algunas horas. Carneros con libido débil se acostumbran rápidamente a la misma oveja y pierden interés, por esto si debe extraerse semen más de una vez es posible que sea necesario cambiar la oveja en celo (Duran Del Campo, 1980).

Cuando el carnero haya completado el periodo de excitación es necesario no producir en él ningún tipo de sensaciones desagradables como podrían ser movimientos bruscos, gritos, ladridos de perro, exceso de calor en la vagina, entre otras. En buenas condiciones serán capaces de trabajar en vagina artificial por largo tiempo (Duran Del Campo, 1980).

Manipulación del semen

Luego de la obtención del eyaculado, es importante que este no sea expuesto a cambios bruscos de temperatura, así como a contacto con agua, metales, radiación solar directa, o impurezas. Debido a esto, es importante la manipulación del mismo el menor tiempo posible, con objetos de vidrio o plástico, estériles, secos y con la misma temperatura del semen (Gibbons y col., 1993)

Evaluación del semen

La calidad del semen debe evaluarse antes de utilizar un macho como semental, una vez obtenido el semen hay varios criterios para evaluar la calidad de la muestra. Ya sea si se utilizan técnicas clásicas como las automatizadas siempre el resultado es una estimación de la capacidad potencial de fertilización de los espermatozoides (Hafez, 2000).

En un eyaculado fecundante, las cualidades que deberían tener los espermatozoides son motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcional de la membrana, integridad de las enzimas asociadas a la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético (Graham, 1996).

Espermiograma clásico

La evaluación del semen reduce posibles pérdidas por utilización de muestras de baja calidad. La misma consiste en pruebas macroscópicas, microscópicas y bioquímicas.

Pruebas macroscópicas

El estudio macroscópico comprende: volumen, color, olor, motilidad masal y pH. Se realizan inmediatamente de obtenida la muestra de semen, no necesitan materiales especiales para su realización (Fernández Abella, 2015).

Volumen

Normalmente el volumen se encuentra entre 0,5 y 2,0 mL, esto depende de la excitación previa del animal, de la época del año en que se realiza la colecta, la edad del mismo, estado nutricional y sanitario, número de eyaculados por día y el método de colecta (Fernández Abella, 2003).

Color

El color varía según la concentración de espermatozoides en el eyaculado, pudiendo ser desde claro hasta crema oscuro.

Cuadro 1. Determinación de la concentración espermática a través del color del eyaculado

Fuente: Fernández Abella y Villegas 1992, modificado Fernández Abella 2002.

Tonalidad	Millones/ml
Crema muy oscuro	4000
Crema oscuro	2800
Crema	2000
Crema claro	1600
Lechoso	1000
Lechoso claro	500
Nublado	100
Claro	Insignificante

Debe ser desechado el eyaculado que tenga color rojizo, ya que éste indica la presencia de sangre. Asimismo, los colores grises o marrones en el semen indican contaminación o infección (Gibbons y col., 1993)

Olor

El semen debe ser inodoro, cualquier olor percibido es debido a una infección o contaminación con orina (Fernández Abella, 2015).

Motilidad masal

La motilidad masal se observa en el propio tubo de colecta o copa recolectora. Se pueden observar ondas que son producto de la concentración espermática, movilidad de espermatozoides y porcentaje de células espermáticas vivas. En caso de duda se puede poner una gota de la muestra en un portaobjeto y observar (Fernández Abella, 2003).

pH

El pH es fundamental para descartar muestras de semen que no se encuentren en el rango adecuado su determinación se realiza utilizando papel indicador de pH de rango adecuado.

Pruebas microscópicas

Las pruebas microscópicas comprenden el estudio del movimiento masal, motilidad individual, concentración, morfología y vitalidad, utilizando microscopio óptico, con contraste de fases y platina termostatizada a 35- 37° C preferentemente. Luego de agitar y homogeneizar el eyaculado, se procede a sacar una gota con una pipeta Pasteur templada y colocarla en un portaobjeto limpio, seco y entibiado a 37°C, se realiza la observación microscópica con 100 aumentos (Gibbons y col., 1993).

En la evaluación de la motilidad individual se verifica el porcentaje de espermatozoides que presenten un movimiento progresivo o normal, ya que esto determina que el espermatozoide avance y pueda fecundar (Fernández Abella, 2015).

Cuadro 2. Clasificación de la motilidad espermática.

Fuente: Evans y Maxwell, 1987.

Escore	Clase	Espermatozoides vivos	Clasificación
0	-	Sin actividad	-
1	-(+)	10%	Mala
2	+	20-40%	Mediocre
3	++	50-65%	Aceptable
4	++(+)	75-80%	Buena
5	+++	90%	Muy buena

Cuadro 3. Grados de movilidad en masa e individual
Fuente: Moule, 1961.

Grado	Movilidad masal (Macroscópica)	Movilidad individual (Microscópica)
0	Sin corrientes	Sin movimiento progresivo
1	Pocas corrientes	20% de movimiento progresivo
2	Muchas corrientes moderadas	40% de movimiento progresivo
3	Muchas corrientes	60% de movimiento progresivo
4	Muchas corrientes rápidas	80% de movimiento progresivo
5	Numerosas ondas de tipo tumultuoso rápidas y vigorosas	Casi 100% de movimiento progresivo

Concentración

La concentración normal, cantidad de espermatozoides por unidad de volumen, en un carnero se encuentra entre 2000 y 3000 millones/mL. Existen distintos métodos que nos permiten cuantificar cantidad de espermatozoides por unidad de volumen en el eyaculado, entre ellos se encuentran diferentes hemocitómetros o cámaras de recuento, Neubauer, Thoma o Makler y en fotocolorímetro. Son métodos precisos, siendo el fotocolorímetro más rápido y las cámaras menos costosas (Gibbons y col., 1993).

Para realizar el recuento en cámara de Neubauer, se debe aspirar semen en una pipeta que contiene suero fisiológico igual a 1:200. Luego de aspirarlo, se debe limpiar el extremo de la pipeta para que no altere los resultados. Se coloca al borde del cubreobjetos y se dejan caer las gotas de semen de manera que por capilaridad se cargue la cámara. Ésta cuenta con dos retículos, con cinco cuadrados grandes, y dentro de cada uno de estos hay 16 cuadrados chicos, separados por líneas dobles o triples. La superficie total de la cámara es de $1/2,5 \text{ mm}^2$, la altura es de $1/10 \text{ mm}$ y la dilución 1:200, por lo que la concentración se obtiene (millones por mm^3) multiplicando el número de cuadrados grandes por el factor 5000. En el recuento de cada cuadrado se tienen en cuenta todos los espermatozoides que se encuentran, siempre manteniendo el criterio de las cabezas, considerándolos dentro o fuera dependiendo de la ubicación de la misma (Fernández Abella, 2015).

El fotocolorímetro se basa en que el pasaje de luz a través de una muestra de semen es inversamente proporcional a su concentración. El fotocolorímetro se calibra con 15 o más conteos en hemocitómetro (Fernández Abella, 2015).

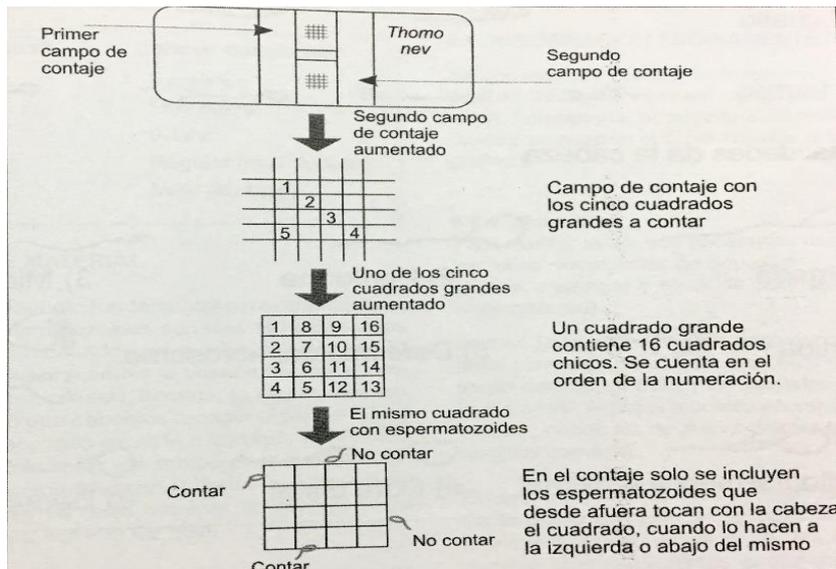


Figura 3. Conteo de la concentración espermática utilizando cámara de Neubauer – Thoma.

Fuente: Fernández Abella, 2015

Morfología

Es de gran importancia la evaluación de la morfología, ya que existe una alta correlación negativa entre el porcentaje de formas anormales y el poder fecundante del semen. Un eyaculado con un porcentaje de anomalías superior a 20% debería eliminarse, excepto que predominen las anomalías del flagelo ya que éstas están menos relacionadas a la fertilidad (Fernández Abella, 2003).

No solo evaluamos las formas normales y clasificamos las anormales, sino que también podemos estimar el porcentaje de células vivas.

El estudio se lleva a cabo colocando una gota de semen con dos gotas de suero fisiológico y una gota de colorante eosina/ nigrosina previamente calentado a 30°C en un portaobjeto, mezclando 5 a 10 segundos. Manteniendo todo a 30°C en estufa o platina se esperan 40 a 50 segundos, se realiza el frotis y se observa en microscopio sin cubreobjetos.

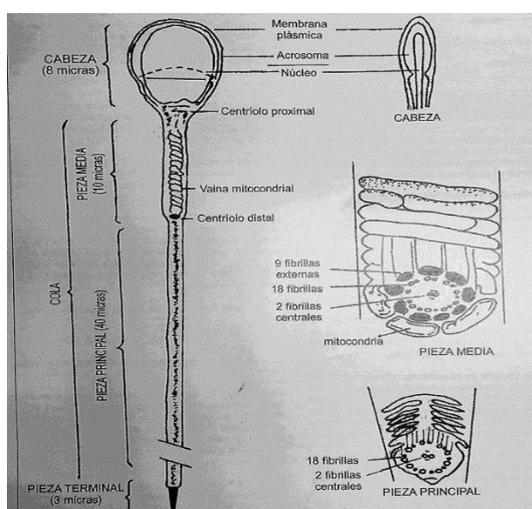


Figura 4. Representación esquemática del espermatozoide de carnero

Fuente: Schulte-Wrede y Wetzstein, 1972

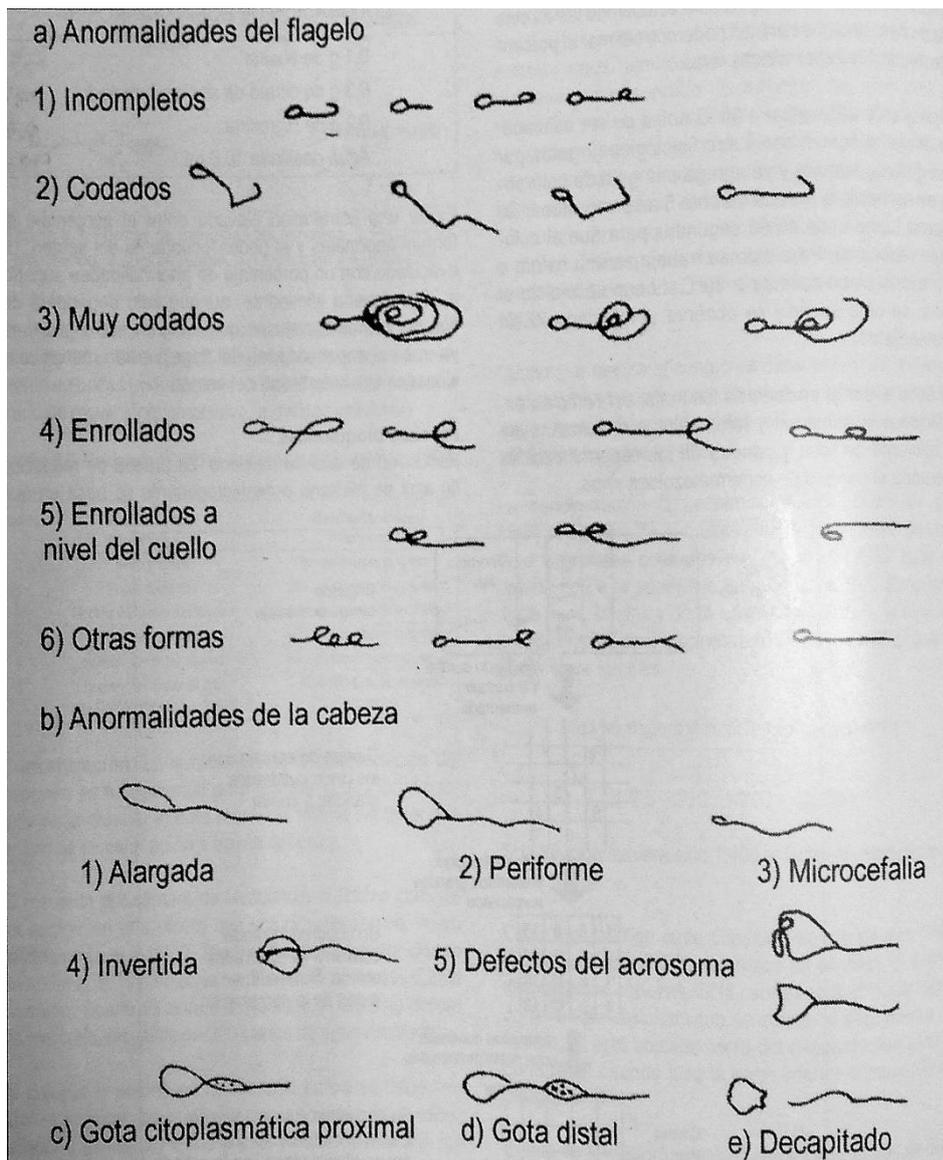


Figura 5. Principales anomalías morfológicas del semen de carnero.
Fuente: Fernández Abella, 2015

Cuadro 4. Coloración Eosina/ Nigrosina
Fuente: Fernández Abella, 2015

Cantidad	Componente
0.1 g	Eosina
0.3 g	Citrato de sodio dihidratado
0.2 g	Nigrosina
10.0 mL	Agua destilada

La vitalidad de los espermatozoides también se evalúa a través de la tinción con eosina-nigrosina, se observan los espermatozoides muertos teñidos de rosado. (Fernández Abella, 2003).

Índice de calidad espermática (I.C.E.)

El I.C.E, es un índice para evaluar calidad espermática, fue desarrollado para su uso en bovinos por Godfrey y col. (1990) y más tarde fue adaptado para carneros por Fernández Abella y col. (1993). Se calcula para cada animal en cada muestreo combinando los valores de: motilidad masal, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides normales y concentración, utilizando la siguiente fórmula:

$$ICE = \frac{\text{motilidad masal} + \% \text{ spz vivos} + \% \text{ spz normales} + \text{concentracion}}{4}$$

Los tres últimos componentes son llevados a una escala de 0 a 5 según el criterio que se puede observar en el cuadro 5.

Cuadro 5. Escala de componentes que conforman el índice de calidad espermática (I.C.E.). Fuente: Fernández Abella y col, 2003

Grado	% vivos	% normales	Concentración (x10 ⁹)
0	0	0-30	<1,00
1	1-20	31-40	1,00-1,50
2	21-40	41-50	1,51-2,50
3	41-60	51-60	2,51-3,50
4	61-80	61-80	3,51-4,00
5	81-100	81-100	>4,00

Sistemas computarizados de análisis espermático (CASA)

Para predecir la capacidad fecundante de los espermatozoides, se desarrollaron nuevas tecnologías in vitro como el Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), que posibilita el estudio de múltiples características funcionales y morfológicas (Quintero-Moreno y col., 2011).

Las técnicas tradicionales de análisis espermático, a pesar de ser rápidas y prácticas, tienen una variación entre los laboratorios que oscila de 30 a 60%, debido a que el método manual lo realizan operadores con diferentes interpretaciones, las que varían según la formación y experiencia del mismo, es pues subjetivo y pasible de error humano, siendo muy importante al momento de la selección de los reproductores (Rodríguez-Martínez, 2003).

En las últimas dos décadas, a través del uso de los sistemas CASA se han unificado criterios, este método permite conocer la calidad seminal de manera objetiva. Además, permite la clasificación y pronóstico de fertilidad o comparación por procesamientos de análisis, ya que el registro de los datos cuantitativos es más fácil, simplificando la comparación de los resultados. El costo del equipo, la necesidad de extrema validación y la normalización de las medidas realizadas son las desventajas

que presenta esta metodología (CASA) frente a la tradicional (Rodríguez-Martínez, 2003).

A través de la metodología CASA se realiza una evaluación automatizada y clasificada de la concentración espermática y la motilidad (Osorio, 2013).

El software que contiene el sistema CASA identifica y mide automáticamente los parámetros del movimiento de los espermatozoides en campos microscópicos capturados con objetivo 10x y contraste de fase negativa. También calcula porcentajes, y concentración espermática en las muestras de semen. Los resultados incluyen los parámetros de velocidad, entre ellos: velocidad curvilínea (VCL), velocidad media (VAP), velocidad rectilínea (VSL), índice de rectitud (STR), índice de linealidad (LIN), índice de oscilación (WOB), amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH) y frecuencia de batido de la cabeza (BCF). El tiempo de análisis es de 1 segundo por campo (Bernardi y col., 2011).

Según Quintero-Moreno y col (2003) podemos definir los parámetros antes mencionados de la siguiente forma:

VCL - Velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$): velocidad media medida punto a punto sobre el recorrido de la cabeza espermática. Es la distancia total que la cabeza del espermatozoide cubre en el período de observación y es siempre el mayor de los tres parámetros de velocidad.

VSL - Velocidad rectilínea ($\mu\text{m/s}$): velocidad media medida en una línea recta desde el principio hasta el final de la trayectoria recorrida. Se determina como la distancia en línea recta entre el primer y último punto de la trayectoria, espacio recorrido en el período de observación. Es siempre el menor de los tres parámetros de velocidad en cualquier espermatozoide.

VAP - Velocidad media ($\mu\text{m/s}$): velocidad media del recorrido del espermatozoide. Se determina como la distancia que el espermatozoide ha seguido en su trayectoria durante el período de observación. Puede parecer similar a la VSL.

LIN - Índice de linealidad (%): estima la proximidad de las trayectorias de las células espermáticas a una línea recta. Se calcula como el cociente entre la velocidad media medida en una línea recta (VSL) y la velocidad media medida punto a punto a lo largo del recorrido (VCL) $\rightarrow (VSL / VCL) \times 100$.

STR - Índice de rectitud (%): estima la proximidad del recorrido seguido por las células espermáticas a una línea recta y se calcula como cociente entre la velocidad media medida en una línea recta desde el primer punto hasta el último de la trayectoria recorrida (VSL) y la velocidad media del recorrido del espermatozoide (VAP) $\rightarrow (VSL / VAP) \times 100$.

WOB - Índice de oscilación (%): estima la relación entre la trayectoria recorrida por el espermatozoide y la oscilación de la cabeza espermática y se calcula como cociente entre la velocidad media del recorrido del espermatozoide (VAP) y la velocidad media medida punto a punto sobre el recorrido de la cabeza espermática (VCL) $\rightarrow (VAP / VCL) \times 100$.

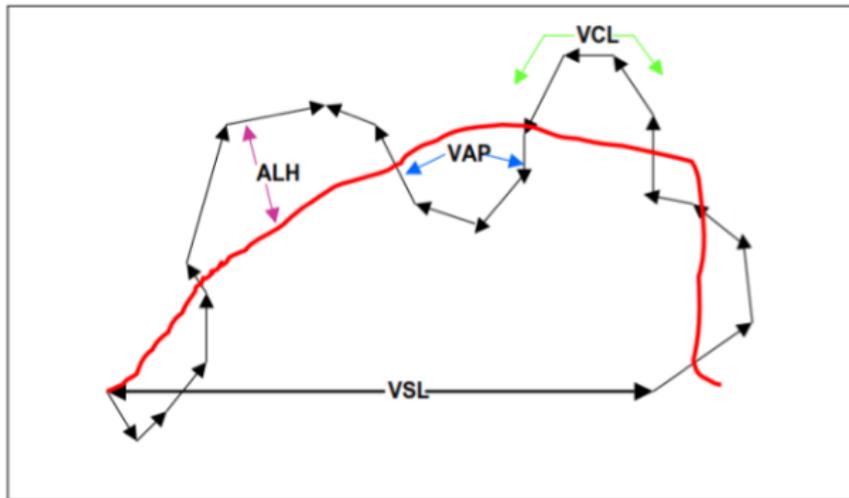


Figura 6. Parámetros de motilidad obtenidos por el CASA
Fuente: Quintero-Moreno y col., 2003

Para llevar a cabo el análisis de movilidad, debe tenerse en cuenta que el tiempo que pasa desde la obtención o descongelación del semen hasta el análisis no debe ser largo, ya que se producen cambios en los espermatozoides que afectan la movilidad. Asimismo, es extremadamente importante no exponer la muestra a repentinos cambios de luz y/o temperatura. Antes de pipetear la muestra debe ser homogeneizada, ya que los espermatozoides muertos tienden a sedimentar, mientras que los vivos se mantienen en movimiento suspendidos en el medio, y esto podría ser causa error en los resultados (Manual ISASv1®, 2015).

Luego de depositar la muestra en un portaobjetos o en hematocitómetro, se procede a capturar y analizar los campos microscópicos, los espermatozoides son clasificados según su movimiento y marcados con diferentes colores. A partir de las imágenes obtenidas se realizan las determinaciones porcentuales y absolutas de los diferentes parámetros y se elaboran los informes correspondientes. Es de gran importancia analizar un mínimo de 200 células por campo (Manual ISASv1®, 2015).

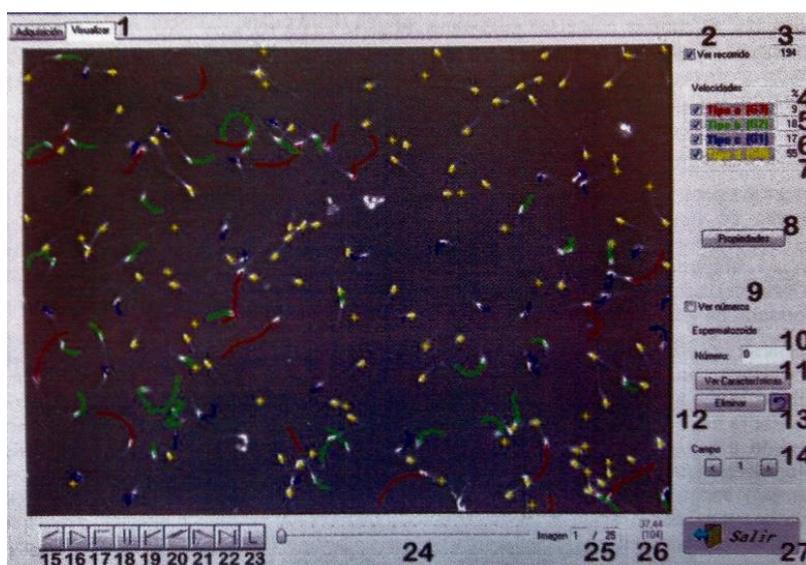


Figura 7. Visualización de un campo en módulo de motilidad sistema ISASv1®
Fuente: Equipo Laboratorio PDU Rumiantes, CENUR Litoral Norte, Salto

Para determinar la concentración de la muestra es necesario homogenizar y fijar la muestra. Los espermatozoides deben ser inmobilizados mediante una fijación química para obtener un recuento correcto, para esto se utiliza una solución conteniendo 50g de NaHCO₃, 10 mL de formol al 35% (v/v) y agua destilada cantidad suficiente para un volumen de 1000 mL. La muestra se debe agitar vigorosamente y cargar el hematocitómetro con una alícuota de la muestra fijada utilizando una micro pipeta. Después de dejar reposar 5 minutos, se logra la sedimentación celular y todos los espermatozoides se encuentran en el mismo plano focal. Se procede entonces a capturar y analizar diferentes campos microscópicos, los espermatozoides se visualizan marcados con una cruz amarilla. A partir del análisis de las imágenes se realizan los recuentos y se elabora el informe correspondiente (Manual ISASv1®, 2015).

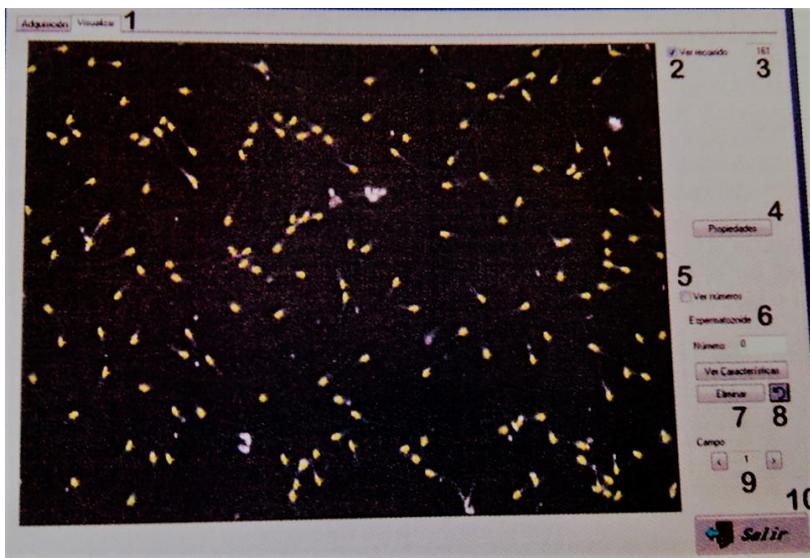


Figura 8. Visualización un campo módulo de concentración en sistema ISASv 1®
Fuente: Equipo Laboratorio PDU Rumiantes, CENUR Litoral Norte, Salto

HIPÓTESIS

Los Programas de producción y reproducción en Merino Australiano podrían utilizar machos de las diferentes categorías (carneros, borregos y corderos pos- puberales).

OBJETIVO GENERAL

Analizar y cuantificar las diferencias en calidad seminal según edad y condición corporal con el fin de valorar sus limitantes reproductivas en machos Merino Australiano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar semen de corderos, borregos y carneros utilizando método manual y automatizado para determinar el uso de las tres categorías en programas de reproducción.
- Determinar en los corderos la calidad seminal y la factibilidad de su utilización en inseminaciones (índice de calidad espermática, en nuestras condiciones de explotación).
- Evaluar si existen diferencias significativas entre borregos y carneros para obtener una herramienta de decisión frente al uso de determinado animal de valor genético en programas de reproducción.
- Evaluar la calidad del semen de los borregos para congelar y comercializar.
- Analizar y estimar diferencias en el eyaculado de carneros, borregos y corderos con el fin de estimar la edad y condición corporal a la cual se los podría considerar fértiles.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Localización del ensayo

El ensayo se llevó a cabo en el establecimiento "El Totoral" propiedad de familia Grasso, siendo responsable del mismo el Sr. Enrique Rodríguez Grasso. El mismo está ubicado sobre la ruta nacional Coronel Gorgonio Aguiar, N.º 31 km 29, departamento de Salto. Latitud 31°23'18.82"S, longitud 57°38'12.05"O.



Figura 9. Ubicación geográfica de departamento de Salto
Fuente: <http://www2.luenticus.org/mapas/uruguay/salto.gif>



Figura 10. Ubicación del establecimiento “El Totoral” en el departamento de Salto
Fuente: Google Earth

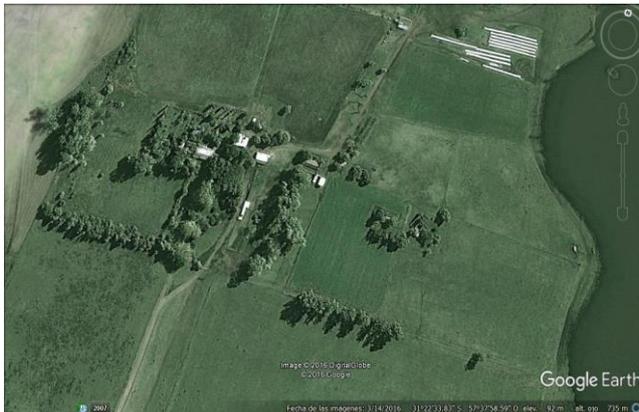


Figura 11. Imagen del establecimiento “El Totoral”
Fuente: Google Earth

Trabajo de campo

Animales utilizados:

Se utilizaron 25 animales machos Merino Australiano, los cuales fueron seleccionados de un grupo de animales previamente categorizado por edad

(carneros mediante estimación de la edad dentaria, fecha de parición para corderos y borregos) e identificados mediante caravana. Los animales de cada categoría fueron declarados aptos mediante examen de aptitud reproductiva y fueron grupos homogéneos (Ensminger, 1973, Fernández Abella, 2015)

Los 25 machos se dividieron en cuatro grupos:

Grupo 1: corderos (n=6), fecha parición noviembre 2015

Grupo 2: borregos (n=7), fecha parición marzo 2015

Grupo 3: carneros 4 y 6 dientes (n=6)

Grupo 4: carneros boca llena (n=6)

El número de animales fue determinado teniendo en cuenta los disponibles para ser cedidos al ensayo en el establecimiento y la necesidad que fuera un número adecuado para el estudio estadístico.

Día 0 (28.04.2016)

A todos los animales se les realizó:

- Determinación de condición corporal (CC) utilizando escala de 1 a 5 (Jefferies, 1961)
- Medición de circunferencia escrotal (CE) utilizando escrotímetro de cinta metálica (0.1 cm de precisión) (Rojas y col, 2008)
- Extracción de semen mediante electroeyaculador Electrojac 5, utilizándolo de acuerdo con las instrucciones del fabricante, aplicándoles a todos los animales la misma cantidad de ciclos, en forma automática. En modo automático, el circuito produce una serie de 32 ciclos, y cada ciclo brinda una intensidad ligeramente superior. Cada ciclo dura 2 segundos, con una pausa de 2 segundos. Diseñado para pasar por los 32 ciclos a menos que sea interrumpido por el interruptor de encendido/apagado o el interruptor de intervalo. Los operadores fueron profesionales entrenados en dicha técnica.

A los animales del Grupo 1 se les realizó determinación de peso vivo (PV), (Molina y col, 2006) en los días 0 y 231.

El semen colectado fue evaluado en forma manual, para ello se determinó: volumen, color, olor, motilidad masal, concentración, motilidad individual, porcentaje de espermatozoides vivos y de espermatozoides normales en el eyaculado. Procediéndose luego al cálculo de I.C.E. (Fernández Abella y col. 1993, Fernández Abella, 2015).

Asimismo, una alícuota de dichas muestras, fueron separadas y procesadas en sistema CASA sistema ISASv1® en módulo de concentración y motilidad siguiendo instrucciones del fabricante (Manual ISASv1®, 2015). Las variables determinadas fueron: concentración (millones espermatozoides/ mL), tipo de movimiento (estático, progresivo y no progresivo), velocidad de movimiento (estáticos, lentos, medios y rápidos) y diferentes variables cinéticas en cada grupo de espermatozoides según

tipo y velocidad de movimiento, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, entre otras (Manual ISASv1®, 2015).

En cada análisis de las muestras procesadas se realizaron 6 capturas al azar, analizando siempre un número superior a 200 células, y manteniendo una diferencia igual o inferior a 10% entre los campos analizados siguiendo las instrucciones del Manual ISASv1® (2015).

Día 106 (12.08.2016)

A todos los animales del Grupo 1 se les realizó:

- Medición de CC
- Medición de CE
- Extracción de semen mediante electroeyaculador Electrojac5
- Evaluación de semen manual y en sistema CASA de los eyaculados obtenidos

Día 231 (15.12.2016)

A todos los animales del Grupo 1 se les realizó:

- Determinación de PV
- Medición de CC
- Medición de CE
- Extracción de semen mediante electroeyaculador Electrojac5
- Evaluación de semen manual y en sistema CASA de los eyaculados obtenidos

A la totalidad de los machos utilizados en este ensayo se les realizó análisis parasitológico mediante conteo de huevos por gramo de materia fecal (HPG) utilizando la técnica de Mc Master (Thienpont, 1986), para estimar la carga parasitaria de nematodos gastrointestinales.

El manejo realizado contra parásitos gastrointestinales fue la dosificación al inicio del ensayo con 10 mg/ kg vía oral de Closantel (Saguicid C- L 10%®. Laboratorio Dispert, Montevideo, Uruguay).

Análisis estadístico

El primer paso del análisis estadístico se basó en un análisis descriptivo de las variables de caracterización PV (kg), CC (escala de 1 a 5), y CE (cm). Para esto se estimaron las medias y se graficaron los diagramas de caja de cada grupo, exponiendo valores máximos, mínimos y cuartiles. De esta forma se determinó la homogeneidad de los grupos respecto a las variables mencionadas, y en el caso de los corderos, la homogeneidad y la evolución a lo largo de las diferentes instancias de control.

A continuación, se realizó un análisis inferencial, tanto de las variables de caracterización como de las variables seminales de registro manual volumen (mL), concentración (millones/ mL), producción de espermatozoides (volumen x concentración) e ICE y de registro mediante sistema ISASv1® (concentración, tipo de movimiento (estático, progresivo y no progresivo), velocidad de movimiento

(estáticos, lentos, medios y rápidos) y variables cinéticas en cada grupo de espermatozoides según tipo y velocidad de movimiento: VCL, VSL, VAP, LIN, STR). El mismo fue realizado bajo dos enfoques de análisis estadístico: paramétrico y no paramétrico.

Enfoque paramétrico

El enfoque paramétrico del análisis estadístico consistió en aplicar pruebas t de Student de comparación de medias poblacionales y construir intervalos de confianza para las mismas, de forma de comparar y caracterizar los diferentes grupos de análisis.

La prueba t de Student establece como hipótesis nula que dos muestras que siguen una distribución Normal provienen de una población con igual media respecto a determinada variable, y como hipótesis alternativa que las medias poblacionales son diferentes.

Antes de aplicar las pruebas de comparación de medias es pertinente validar el supuesto de normalidad de los datos. Para esto se implementó la prueba de Shapiro- Wilks, la cual establece como hipótesis nula que una muestra se ajusta a una distribución Normal y como hipótesis alternativa que no lo hace.

Asimismo, la prueba t de Student tiene dos variantes de ejecución, la primera cuando las muestras a comparar poseen igual varianza y la segunda cuando las varianzas son diferentes. La diferencia yace en el cálculo del estadístico de prueba. Para determinar cuál variante es la indicada se implementó la prueba F de igualdad de varianzas. Esta prueba establece como hipótesis nula que dos muestras que siguen una distribución Normal provienen de una población con igual varianza respecto a determinada variable, y como hipótesis alternativa que las varianzas poblacionales son diferentes.

Enfoque no paramétrico

En los casos donde las variables no se ajustaban a una distribución Normal, debió hacerse un análisis de tipo no paramétrico para comparar y caracterizar los diferentes grupos de análisis. La prueba aplicada en estos casos fue la de Kolmogorov-Smirnov, la cual establece como hipótesis nula que dos muestras comparten la misma ley de probabilidad, o equivalentemente, que provienen de la misma población respecto a determinada variable.

Con el objetivo de determinar asociación entre variables, se estimó el coeficiente de correlación de Spearman y se realizaron pruebas de significancia sobre el mismo. A diferencia del coeficiente de correlación lineal de Pearson, el de Spearman es no paramétrico y no asume una distribución conocida de los datos para la determinación de su significancia, por lo cual es aplicable a cualquier par de variables considerado, tengan o no distribución Normal.

Los animales del Grupo 1 al día 106 solamente pudieron incorporarse al estudio estadístico de las variables de caracterización ya que solamente eyacularon 2 de los 6 integrantes del grupo. La evaluación de las muestras manual y en equipo, así como la determinación de ICE fue realizada.

RESULTADOS

Condición Corporal

En el día 0 del ensayo los cuatro grupos mostraron valores similares de CC, Grupo1 (media=2,63), Grupo 2 (media=2,57), Grupo 3 (media=2,71) y Grupo 4 (media=2,80). Respecto al Grupo 1 y su evolución en el tiempo, marcó un crecimiento sostenido a lo largo de los tres momentos de registro: día 0 (media=2,63), día 106 (media=3,42) y día 231 (media=3,75). Ver figura 12.

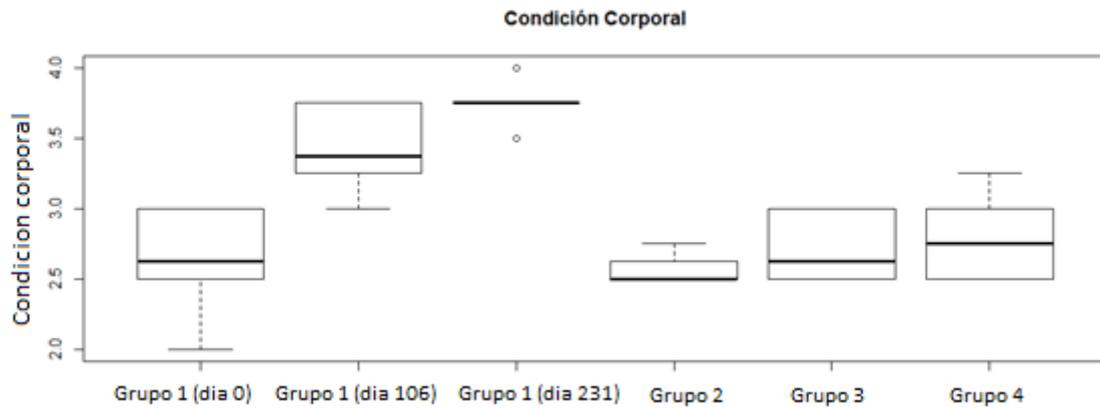


Figura 12. Diagrama de cajas para CC en cada grupo, y en los 3 momentos estudiados en el Grupo1 (días 0, 106 y 231)

Al no superar la prueba de normalidad, se implementó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, la cual detectó diferencias significativas en la distribución de la CC del Grupo1 día 0 comparado al día 106 (p -valor=0,0310) y al día 231 (p -valor=0,0050) respectivamente. Asimismo, el Grupo 1 día 106, presenta diferencias significativas en distribución con Grupo 2 (p -valor=0,0031) y Grupo 3 (p -valor=0,0031). Por último, Grupo 1 día 231, además de presentar diferencias con Grupo 1 día 0, lo hicieron con Grupo 2 (p -valor=0,0031), Grupo 3 (p -valor=0,0050) y Grupo 4 (p -valor=0,0050). Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3 y Grupo 4 al inicio del ensayo no presentaron diferencias significativas entre sí. Ver cuadro 6.

Cuadro 6. p -valor de prueba Kolmogórov-Smirnov de igualdad de distribución, para variable CC.

CC	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
	(día 0)	(día 106)	(día 231)	(día 0)	(día 0)	(día 0)
Grupo 1 (día 0)	1,0000	0,0310	0,0050	0,8654	1,0000	1,0000
Grupo 1 (día 106)		1,0000	0,4413	0,0031	0,0310	0,1389
Grupo 1 (día 231)			1,0000	0,0031	0,0050	0,0050
Grupo 2 (día 0)				1,0000	0,8654	0,3945
Grupo 3 (día 0)					1,0000	1,0000
Grupo 4 (día 0)						1,0000

Circunferencia Escrotal

El Grupo 1 fue el que mostró valores de CE más bajos al día 0 (media=14,50), aumentando considerablemente para el día 106 (media=23,08) y 231 (media=25,08) al punto que iguala los registros del Grupo 2 del día 0 (media=24,29). Por su parte las medias de los Grupos 3 y 4 (29,67 y 30,50 respectivamente) fueron los valores más altos al día 0, sin presentar, a menos de la dispersión de los datos, diferencias notorias entre ellos. Ver figura 13.

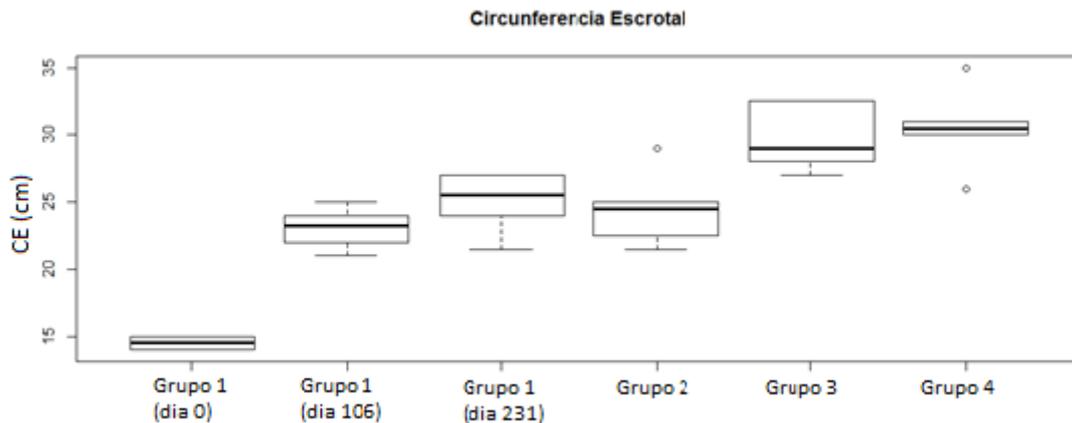


Figura 13. Diagrama de cajas para CE en cada grupo, y en los 3 momentos estudiados en el Grupo 1 (días 0, 106 y 231).

La prueba t de Student para CE, aplicada a cada par de grupos, detectó diferencias significativas entre tres bloques claramente definidos:

- Grupo 1 día 0.
- Grupo 1 día 106, Grupo 1 día 231 y Grupo 2.
- Grupo 3 y Grupo 4.

La prueba no detectó diferencias significativas dentro de cada bloque. Ver cuadro 7.

Cuadro 7. p-valor de prueba t de igualdad de medias, para variable CE.

CE	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
	(día 0)	(día 106)	(día 231)	(día 0)	(día 0)	(día 0)
Grupo 1 (día 0)	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Grupo 1 (día 106)		1,0000	0,0833	0,3237	0,0002	0,0002
Grupo 1 (día 231)			1,0000	0,5522	0,0056	0,0040
Grupo 2				1,0000	0,0024	0,0016
Grupo 3					1,0000	0,5982
Grupo 4						1,0000

En cuanto a los intervalos de confianza para las medias poblacionales, se pudo determinar que la CE media poblacional del Grupo 1 día 0 se encuentra entre 14 y 15 cm con 95% de confianza, mientras que Grupo 1 al día 106 y día 231 y Grupo 2

se encuentra entre 22 y 27 cm, y la de los Grupos 3 y 4 se encuentra entre 27 y 33 cm. Ver figura 14.

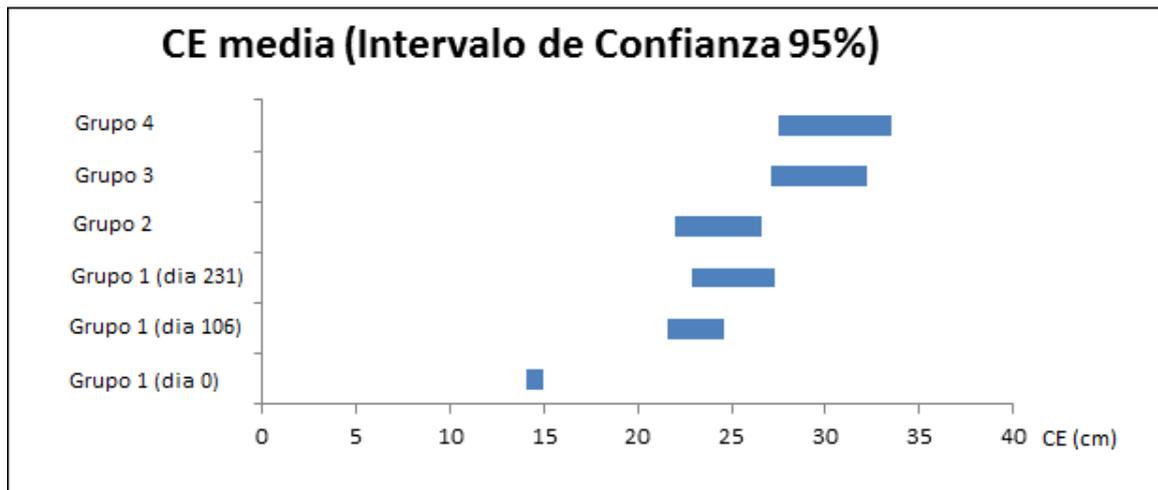


Figura 14. Intervalos de confianza para medias poblacionales para parámetro CE (cm)

Peso vivo

La variable PV solo fue registrada para el Grupo 1 en los días 0 (media=26,58) y 231 (media=52,00). Se observó un crecimiento sustancial entre los dos momentos de tiempo. Ver figura 15.

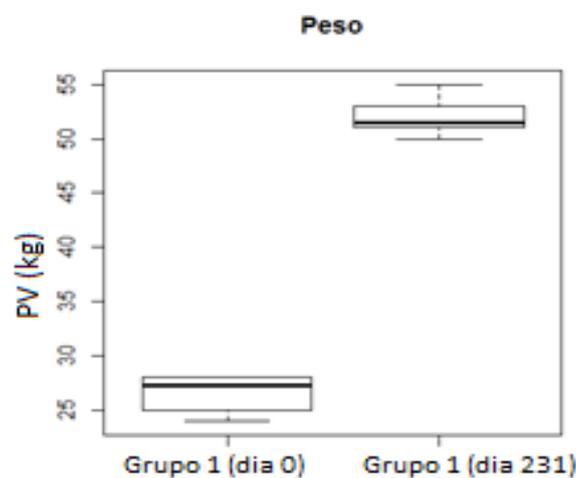


Figura 15. Diagrama de cajas para peso vivo en el Grupo 1 al comienzo y al final del estudio (días 0, y 231).

Condición Corporal vs Circunferencia Escrotal

Al relacionar las variables CC y CE se puede observar el crecimiento conjunto de ambas variables a lo largo del tiempo para el Grupo 1. Para los demás grupos del

ensayo se puede apreciar una superioridad de Grupos 3 y 4 en cuanto a CE, pero no se observan diferencias claras en cuanto a CC. Ver figura 16.

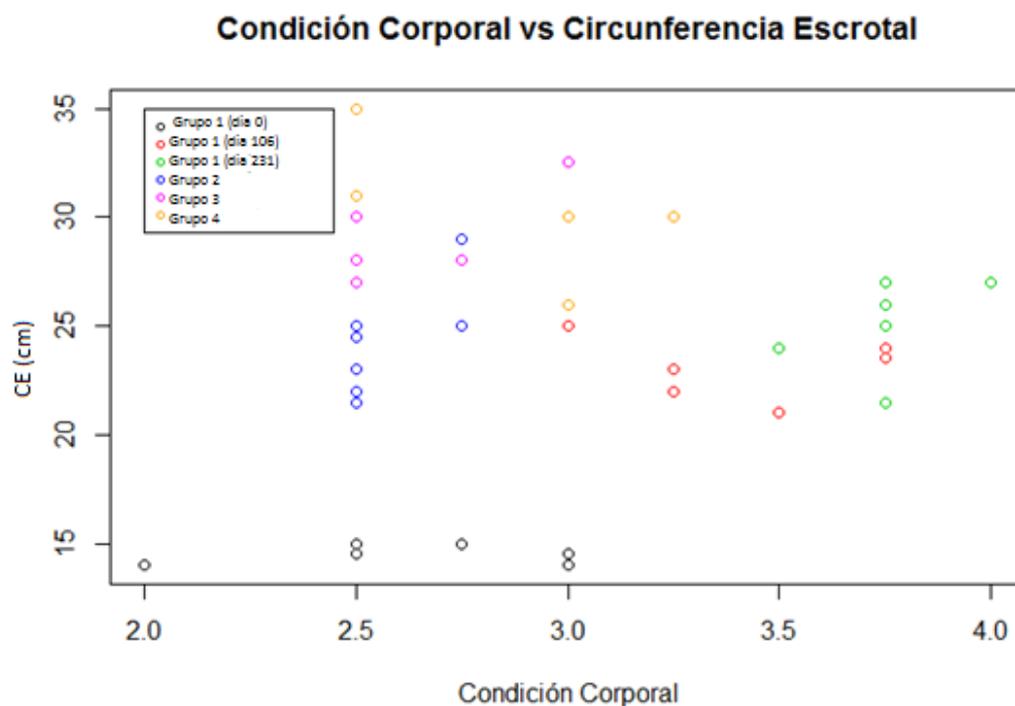


Figura 16. Correlación entre CC y CE en cada grupo, y en los 3 momentos estudiados en Grupo 1 (días 0, 106 y 231).

Variables de evaluación manual

Las variables seminales de registro manual, volumen, concentración, producción de espermatozoides (spz) e ICE, fueron medidas para los Grupos 2, 3 y 4 por única vez el día 0, mientras que para el Grupo 1 fueron medidas el día 231, conformando así cuatro grupos de análisis. Se aplicó la prueba t de igualdad de medias a cada par de grupos para cada una de ellas.

Volumen

El Grupo 1 presenta una media (1,44 mL) significativamente distinta a Grupo 3 (media=0,83 mL, p-valor=0,0109) y a Grupo 4 (media=0,78 mL, p-valor=0,0417), con un nivel de significancia de 0,05. Por su parte, el Grupo 2 no presenta diferencias significativas con ninguno de los otros tres. Ver cuadro 8.

Cuadro 8. p-valor de prueba t de igualdad de media, variable Volumen.

Volumen	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Grupo 1	1,0000	0,0559	0,0109	0,0417
Grupo 2		1,0000	0,7431	0,8896
Grupo 3			1,0000	0,8416
Grupo 4				1,0000

En cuanto a los intervalos de confianza para las medias poblacionales, se pudo determinar que el volumen medio poblacional del Grupo 1 se encuentra entre 1 y 1,88 mL con 95% de confianza, mientras que el Grupo 3 se encuentra entre 0,54 y 1,13 mL, y el Grupo 4 entre 0,23 y 1,34 mL. Ver figura 17.

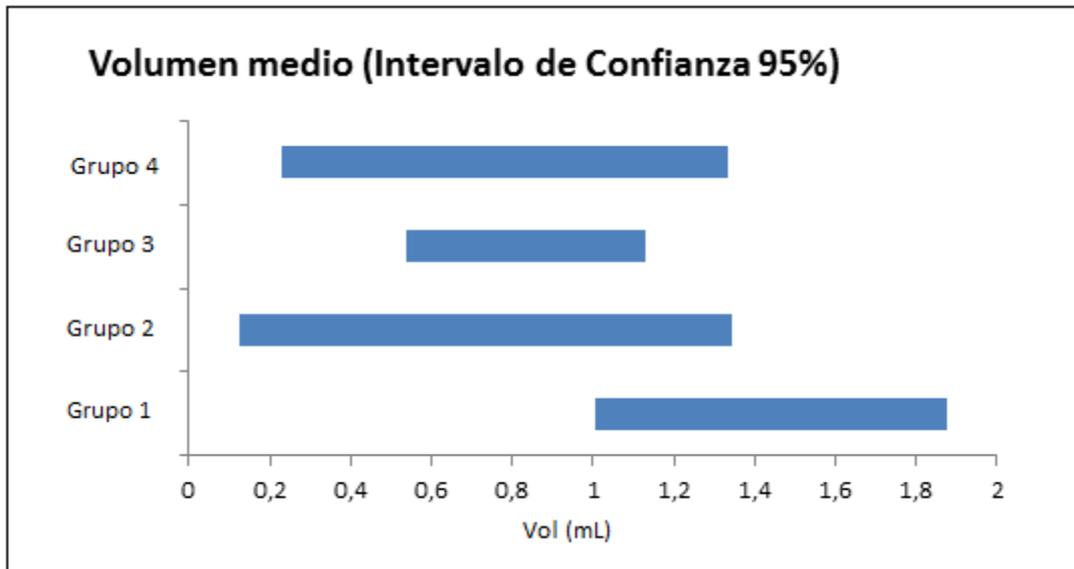


Figura 17. Intervalos de confianza para medias poblacionales para parámetro Volumen (mL)

Concentración

El Grupo 1 presenta una media (1015 millones spz/ mL) significativamente distinta al Grupo 3 (media=4017 millones spz/ mL, p-valor=0,005) y al Grupo 4 (media=2942 millones spz/ mL, p-valor=0,0314), con un nivel de significancia de 0,05. Por su parte, el Grupo 2 no presenta diferencias significativas con ninguno de los otros tres. En cuanto a los intervalos de confianza para las medias poblacionales, se pudo determinar que la concentración media poblacional del Grupo 1 se encuentra entre 35 y 1995 millones spz/ mL con 95% de confianza, mientras que la del Grupo 3 se encuentra entre 2274 y 5760 millones spz/ mL, y la del Grupo 4 entre 1346 y 4537 millones spz/ mL. Ver figura 18.

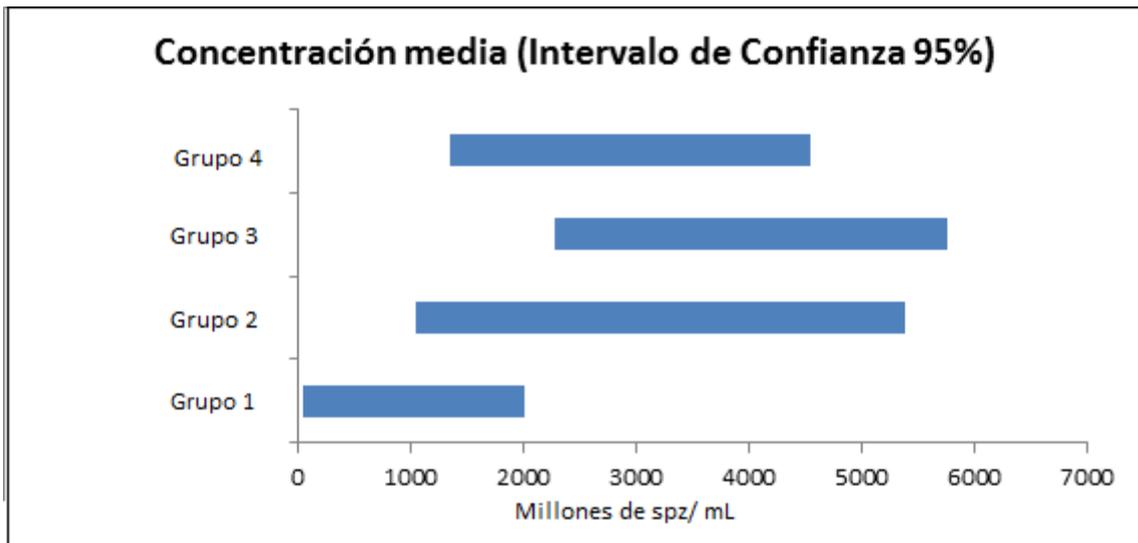


Figura 18. Intervalo de confianza para medias para parámetro concentración (millones spz/ mL)

Producción de espermatozoides

La prueba t de igualdad de medias no detectó diferencias significativas entre las medias de producción de spz de ninguno de los cuatro grupos. Ver Figura 19.

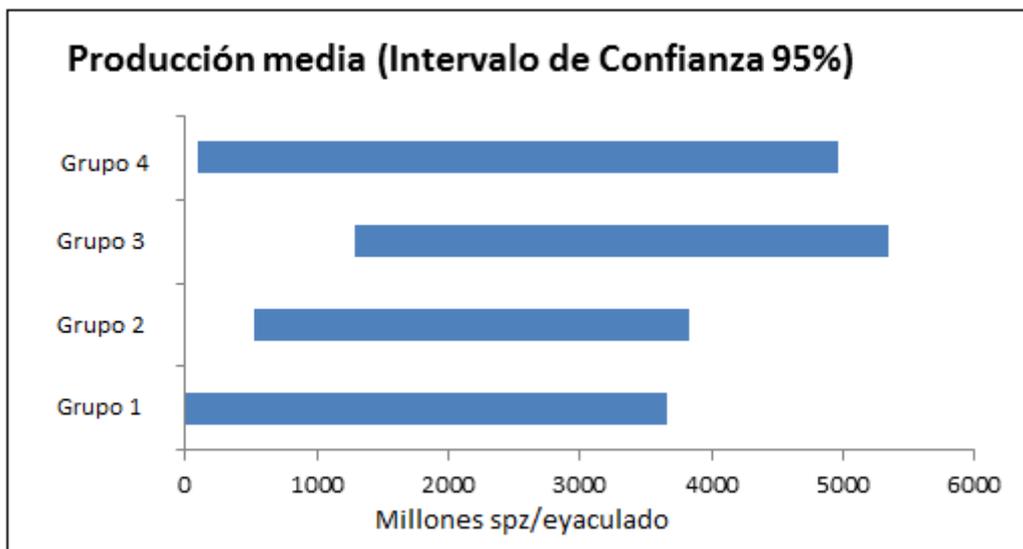


Figura 19. Intervalo de confianza para medias para parámetro producción de espermatozoides (millones spz/ eyaculado)

ICE

Los resultados de la prueba t para la variable ICE determinaron que el Grupo 3 presenta una media (3,82) significativamente distinta al Grupo 1 (media=2,72, p-valor=0,0136) y al Grupo 2 (media=3,06, p-valor=0,0485), con un nivel de significancia de 0,05. Por su parte, el Grupo 4 no presenta diferencias significativas con ninguno de los otros tres.

En cuanto a los intervalos de confianza para las medias poblacionales, se pudo determinar que el ICE medio poblacional del Grupo 3 se encuentra entre 3,27 y 4,37 con 95% de confianza, mientras que el Grupo 1 se encuentra entre 1,89 y 3,55, y el Grupo 2 entre 2,43 y 3,69. Ver figura 20.

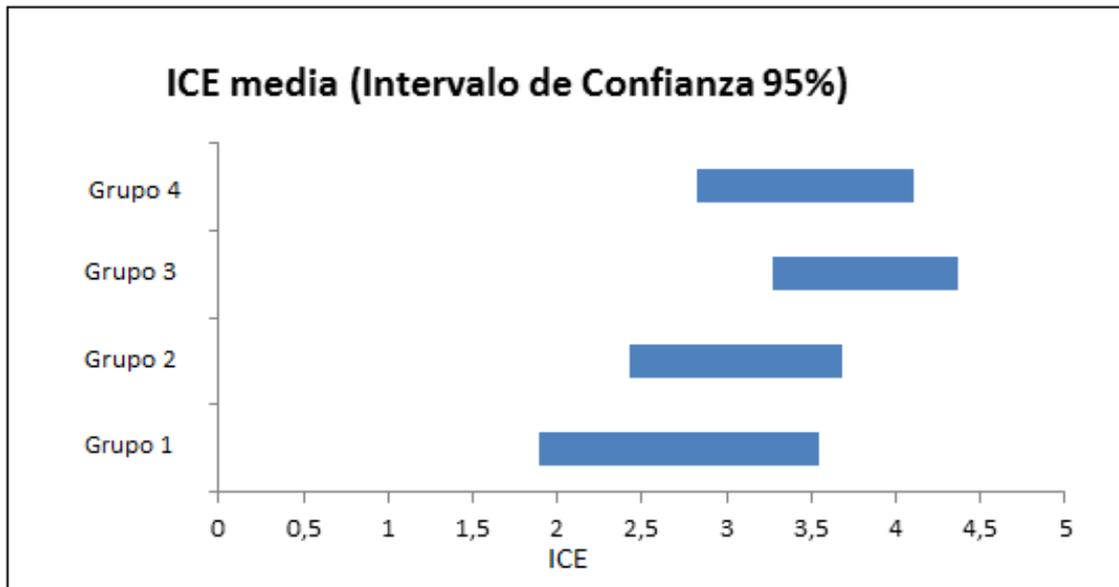
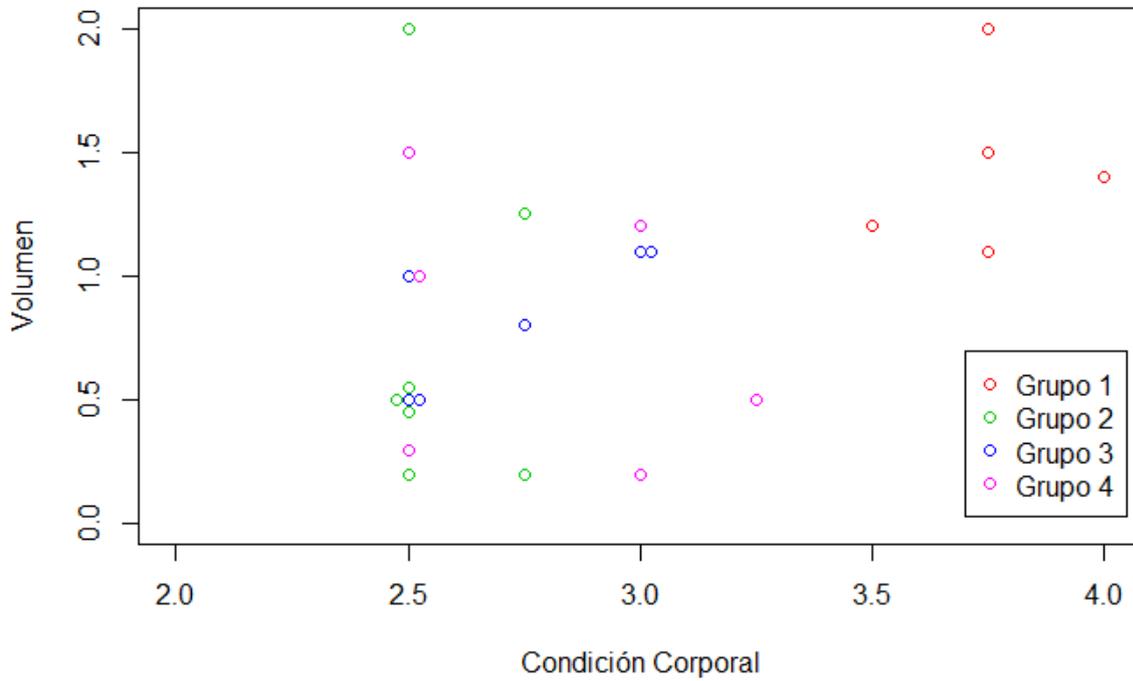


Figura 20. Intervalo de confianza para las medias del parámetro ICE

Correlación entre variables

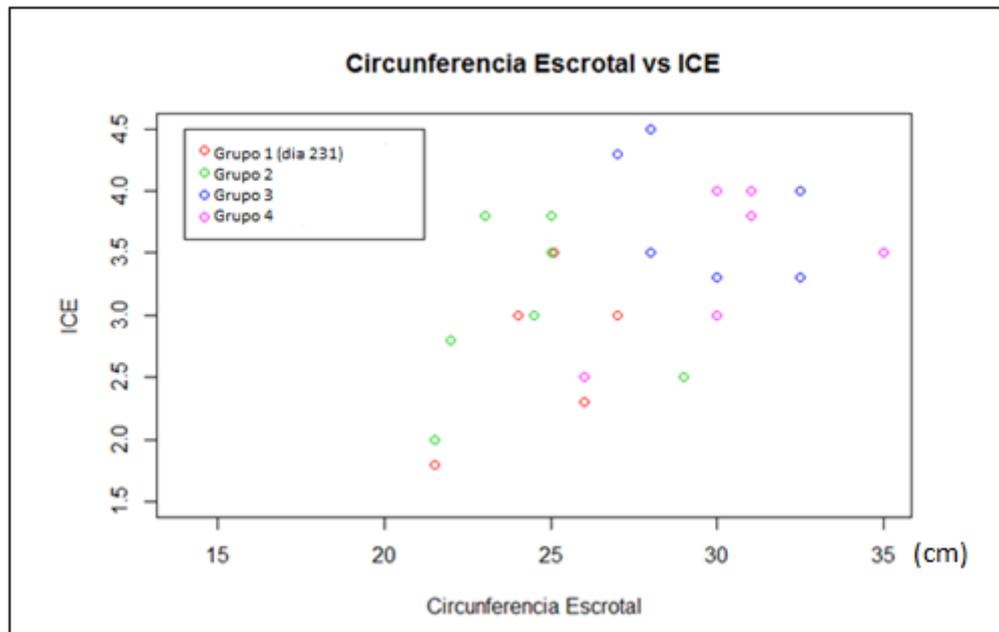
Se estimó el coeficiente de correlación de Spearman entre las variables de caracterización (CC, CE y PV) y las variables seminales de registro manual (volumen, concentración, producción de spz e ICE). La prueba de significancia del coeficiente de correlación de Spearman estableció que existe una correlación positiva entre las variables CC y volumen ($\rho=0.42$ p-valor=0,0393) (ver figura 21), y CE e ICE ($\rho=0,47$, p-valor=0,0210) (ver Figura 22).

Condición Corporal vs Volumen



(rho=0.42, p-valor=0,0393)

Figura 21. Diagrama de dispersión de CC vs volumen



(rho=0,47, p-valor=0,0210)

Figura 22. Diagrama de dispersión de CE vs ICE

Debido a que la variable PV únicamente fue registrada para el Grupo 1, su correlación con las variables seminales fue analizada por separado. Existe una correlación positiva entre PV y concentración ($\rho=1$, $p\text{-valor}=0,0167$), y PV y producción de spz ($\rho=1$, $p\text{-valor}=0,0167$).

Variables registradas por sistema ISASv1®

Se consideraron once variables para llevar a cabo el análisis estadístico:

- Tipo de movimiento Estáticos
- Tipo de movimiento Móviles no progresivos
- Tipo de movimiento Móviles progresivos
- Velocidad de movimiento Rápidos
- Velocidad de movimiento Medios
- Velocidad de movimiento Lentos
- Velocidad curvilínea (VCL)
- Velocidad rectilínea (VSL)
- Velocidad promedio (VAP)
- Índice de linealidad (LIN)
- Índice de rectitud (STR)

Todas ellas fueron registradas para los grupos 2, 3 y 4 el día 0, mientras que para el Grupo 1 registradas el día 231, conformando así cuatro grupos de análisis.

Dentro de cada grupo y para cada una de las variables consideradas se aplicó la prueba de Normalidad de Shapiro-Wilks con un nivel de significancia de 0,05.

Las primeras seis variables no distribuyen normal, mientras que las 5 últimas si lo hacen. Se implementó entonces la prueba de Kolmogorov-Smirnov en las seis primeras y se aplicó prueba de t de Student en las restantes.

Para las variables tipo de movimiento (estáticos, progresivos y no progresivos) no se detectaron diferencias significativas en cuanto a distribución entre los cuatro grupos de análisis.

Para la variable velocidad de movimiento, la prueba detectó diferencias significativas en la distribución del porcentaje de espermatozoides con velocidad media entre los Grupos 1 y 2 ($p\text{-valor}=0,0275$), y del porcentaje de espermatozoides con velocidad lenta entre los Grupos 1 y 2 ($p\text{-valor}=0,0275$) y entre los Grupos 1 y 4 ($p\text{-valor}=0,0086$).

Observando los diagramas de caja (ver figuras 22 y 23) se puede apreciar que el Grupo 1 presenta una proporción de espermatozoides de velocidad media y lenta sensiblemente inferior a los otros grupos, en particular a los de los Grupos 2 y 4.

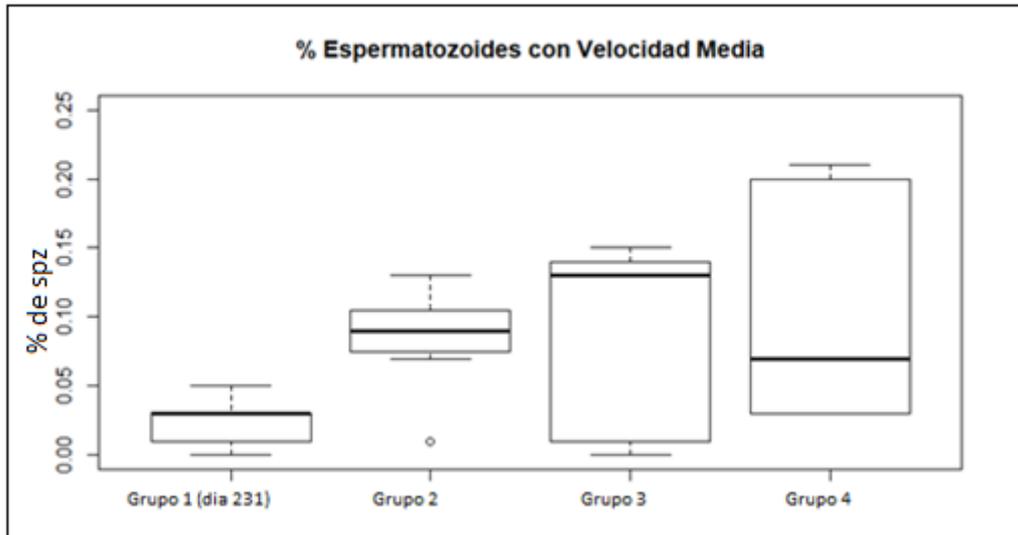


Figura 23. Diagrama de cajas de porcentaje de espermatozoides con velocidad media para los cuatro grupos

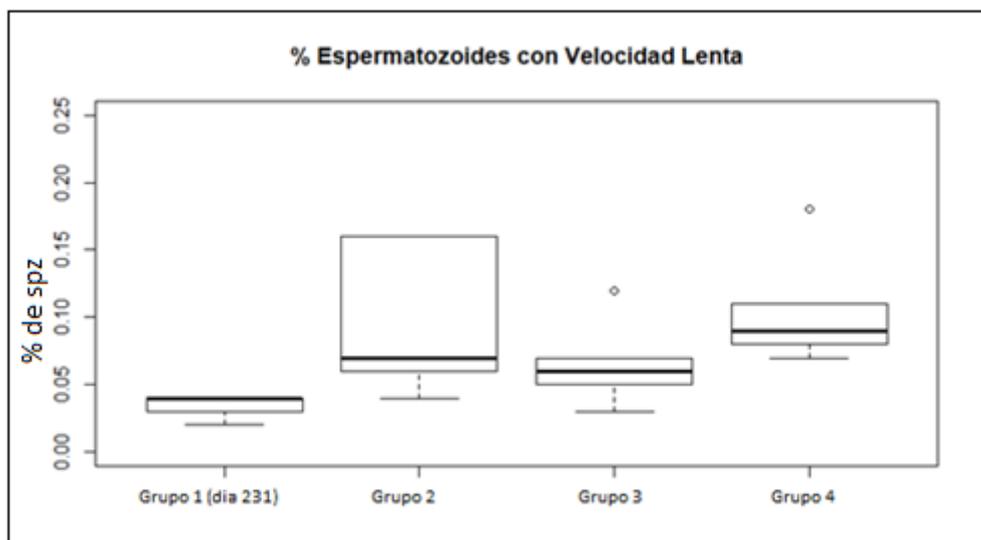


Figura 24. Diagrama de cajas de Porcentaje de espermatozoides con velocidad lenta para los cuatro grupos.

No se observan diferencias significativas en cuanto a la distribución del porcentaje de espermatozoides rápidos y estáticos en los cuatro grupos analizados. Dado que el grupo con significancia es el de espermatozoides rápidos presentamos el diagrama de cajas para dicho grupo. Ver Figura 24

% Espermatozoides con Velocidad Rápida

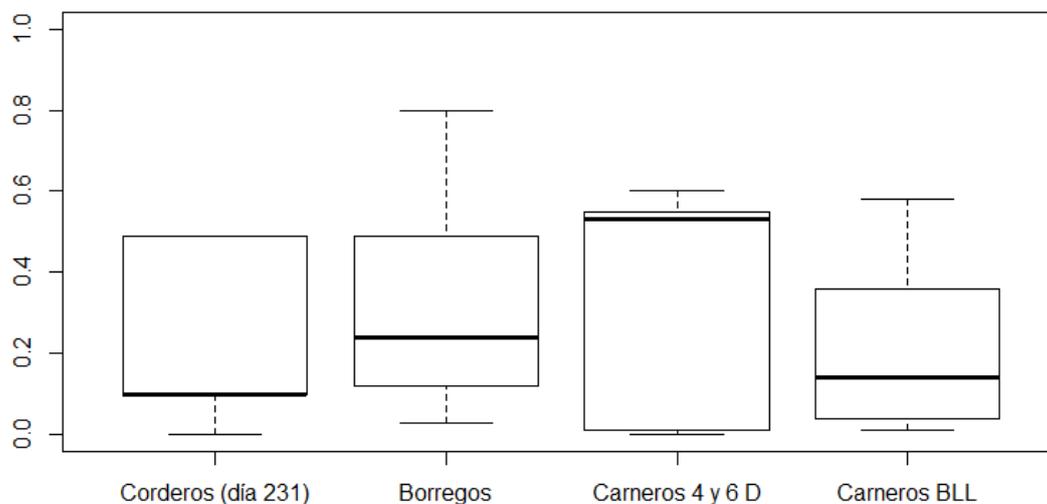


Figura 25. Diagrama de cajas de Porcentaje de espermatozoides con velocidad rápida para los cuatro grupos

La prueba t de Student, aplicada a cada par de grupos, no detectó diferencias significativas en la media para las variables VCL, VSL, VAP y LIN. Ver cuadros 9-13.

Cuadro 9. p-valor de prueba t de igualdad de media, variable VCL.

Total VCL	Corderos	Borregos	Carneros 4 y 6 D	Carneros BLL
	(día 231)	(día 0)	(día 0)	(día 0)
Corderos (día 231)	1,0000	0,6251	0,5322	0,2354
Borregos (día 0)		1,0000	0,6809	0,1794
Carneros 4 y 6 D (día 0)			1,0000	0,4632
Carneros BLL (día 0)				1,0000

Cuadro 10. p-valor de prueba t de igualdad de media, variable VSL.

Total VSL	Corderos	Borregos	Carneros 4 y 6 D	Carneros BLL
	(día 231)	(día 0)	(día 0)	(día 0)
Corderos (día 231)	1,0000	0,5330	0,4219	0,2162
Borregos (día 0)		1,0000	0,6161	0,3232
Carneros 4 y 6 D (día 0)			1,0000	0,8389
Carneros BLL (día 0)				1,0000

Cuadro 11. p-valor de prueba t de igualdad de media, variable VAP.

Total VAP	Corderos	Borregos	Carneros 4 y 6 D	Carneros BLL
	(día 231)	(día 0)	(día 0)	(día 0)
Corderos (día 231)	1,0000	0,9060	0,7640	0,3702
Borregos (día 0)		1,0000	0,7524	0,2204
Carneros 4 y 6 D (día 0)			1,0000	0,5320
Carneros BLL (día 0)				1,0000

Cuadro 12. p-valor de prueba t de igualdad de media, variable LIN.

Total LIN	Corderos	Borregos	Carneros 4 y 6 D	Carneros BLL
	(día 231)	(día 0)	(día 0)	(día 0)
Corderos (día 231)	1,0000	0,6067	0,2538	0,4911
Borregos (día 0)		1,0000	0,4373	0,9352
Carneros 4 y 6 D (día 0)			1,0000	0,4442
Carneros BLL (día 0)				1,0000

Para la variable STR, la prueba rechazó que el índice de rectitud medio fuera el mismo entre el Grupo 1 y Grupo 2 (p-valor de 0,0469).

Cuadro 13. p-valor de prueba t de igualdad de media, variable STR.

Total STR	Corderos	Borregos	Carneros 4 y 6 D	Carneros BLL
	(día 231)	(día 0)	(día 0)	(día 0)
Corderos (día 231)	1,0000	0,0469	0,0670	0,0509
Borregos (día 0)		1,0000	0,3290	0,8261
Carneros 4 y 6 D (día 0)			1,0000	0,2927
Carneros BLL (día 0)				1,0000

En cuanto a los intervalos de confianza para las medias poblacionales, se pudo determinar que el índice de rectitud medio poblacional del Grupo 1 se encuentra entre 73 y 87% con 95% de confianza, mientras que el del Grupo 2 se encuentra entre 60 y 78%, y el Grupo 4 entre 62 y 79%. El Grupo 3 es el que genera el intervalo de confianza más amplio abarcando desde 35 hasta 86. Ver figura 24.

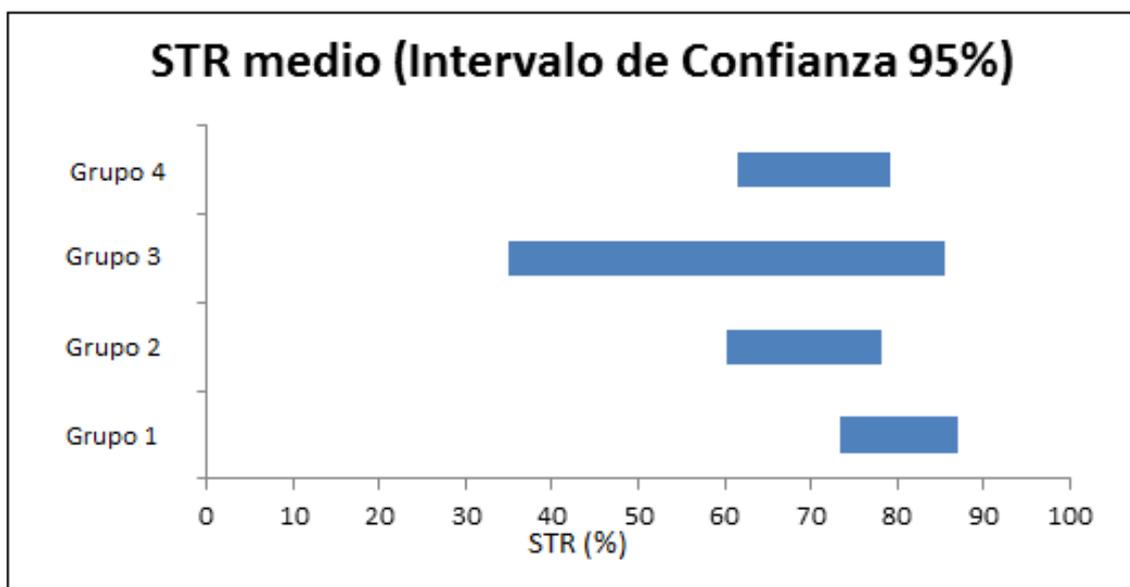


Figura 26. Intervalos de confianza para variable índice de rectitud medio.

Si centramos el análisis únicamente en los espermatozoides rápidos, la prueba de comparación de medias no detectó diferencias significativas entre los cuatro grupos de análisis para las variables VCL, VSL, VAP, LIN y STR. Ver cuadros.

Cuadro 14. p-valor de prueba t de igualdad de media, variable VCL.

Rápidos VCL	Corderos (día 231)	Borregos (día 0)	Carneros 4 y 6 D (día 0)	Carneros BLL (día 0)
Corderos (día 231)	1,0000	0,5153	0,8763	0,9678
Borregos (día 0)		1,0000	0,1499	0,1006
Carneros 4 y 6 D (día 0)			1,0000	0,8335
Carneros BLL (día 0)				1,0000

Cuadro 15. p-valor de prueba t de igualdad de media, variable VSL.

Rápidos VSL	Corderos (día 231)	Borregos (día 0)	Carneros 4 y 6 D (día 0)	Carneros BLL (día 0)
Corderos (día 231)	1,0000	0,5330	0,4219	0,2162
Borregos (día 0)		1,0000	0,6161	0,3232
Carneros 4 y 6 D (día 0)			1,0000	0,8389
Carneros BLL (día 0)				1,0000

Cuadro 16. p-valor de prueba t de igualdad de media, variable VAP.

Rápidos VAP	Corderos (día 231)	Borregos (día 0)	Carneros 4 y 6 D (día 0)	Carneros BLL (día 0)
Corderos (día 231)	1,0000	0,2719	0,9129	0,7359
Borregos (día 0)		1,0000	0,2783	0,2204
Carneros 4 y 6 D (día 0)			1,0000	0,8167
Carneros BLL (día 0)				1,0000

Cuadro 17. p-valor de prueba t de igualdad de media, variable LIN.

Rápidos LIN	Corderos	Borregos	Carneros 4 y 6 D	Carneros BLL
	(día 231)	(día 0)	(día 0)	(día 0)
Corderos (día 231)	1,0000	0,5285	0,4474	0,7776
Borregos (día 0)		1,0000	0,2772	0,7731
Carneros 4 y 6 D (día 0)			1,0000	0,3798
Carneros BLL (día 0)				1,0000

Cuadro 18. p-valor de prueba t de igualdad de media, variable STR.

Rápidos STR	Corderos	Borregos	Carneros 4 y 6 D	Carneros BLL
	(día 231)	(día 0)	(día 0)	(día 0)
Corderos (día 231)	1,0000	0,1500	0,0854	0,1579
Borregos (día 0)		1,0000	0,2175	0,9924
Carneros 4 y 6 D (día 0)			1,0000	0,2198
Carneros BLL (día 0)				1,0000

Correlación entre variables

Se estimó el coeficiente de correlación de Spearman entre las variables seminales de registro ISAS (tipo de movimiento, velocidad de movimiento, VCL, VSL, VAP, LIN y STR) y las variables seminales de registro manual (volumen, concentración, producción de espermatozoides e ICE).

Existe una correlación negativa entre el porcentaje de espermatozoides estáticos y las variables concentración ($\rho=-0,44$, $p\text{-valor}=0,0378$), producción spz ($\rho=-0,50$, $p\text{-valor}=0,0157$) e ICE ($\rho=-0,51$, $p\text{-valor}=0,0124$).

Por su parte, el porcentaje de espermatozoides progresivos únicamente correlaciona, en términos significativos, con la variable de registro manual producción de espermatozoides ($\rho=0,42$, $p\text{-valor}=0,0465$) (ver Figura 25).

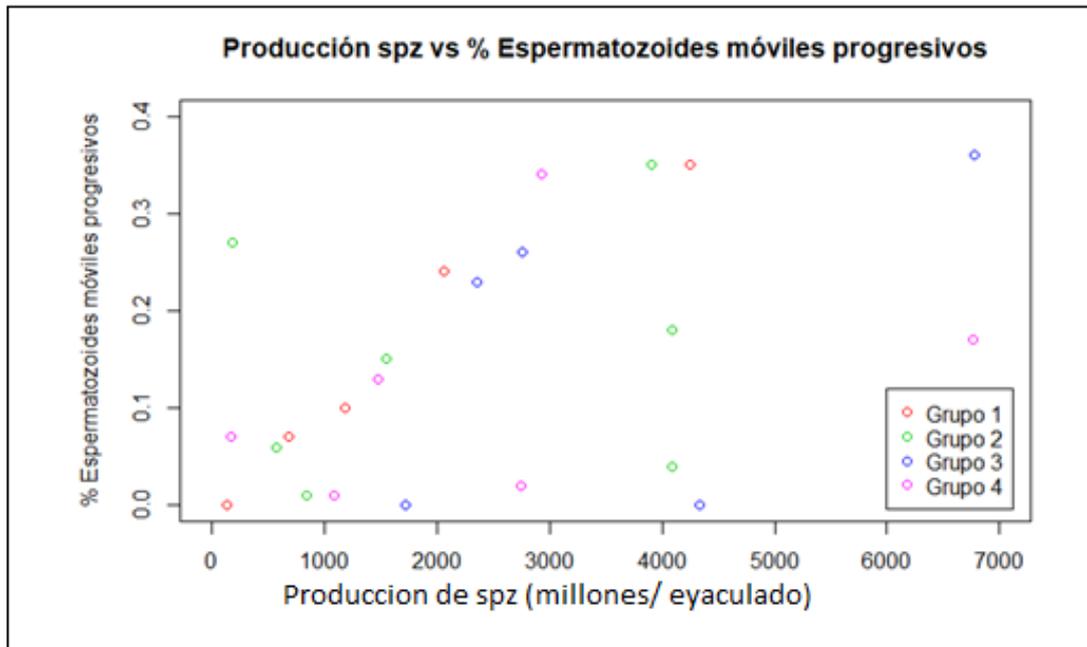
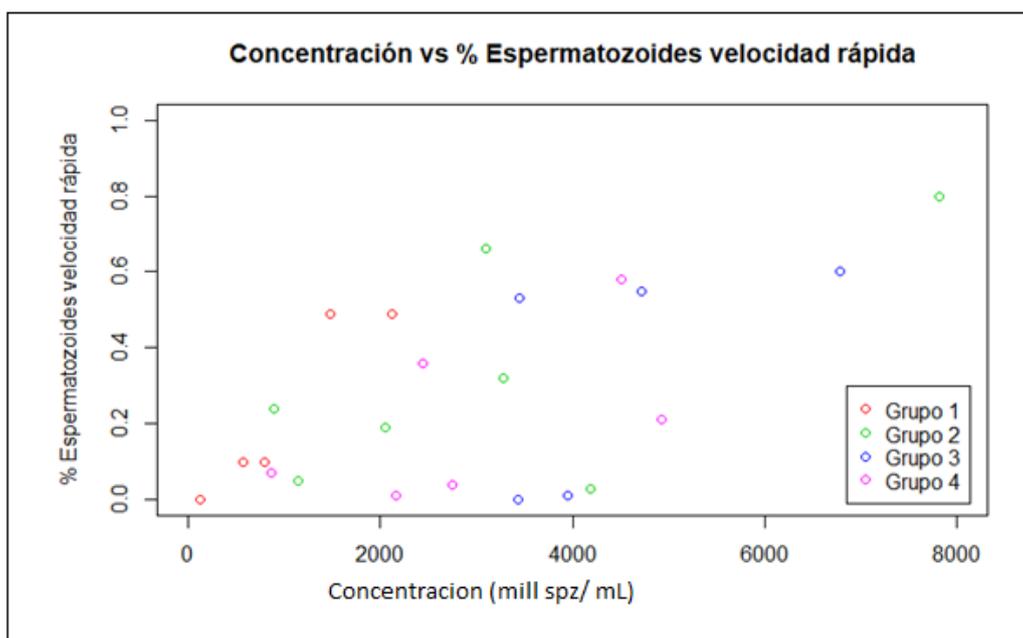


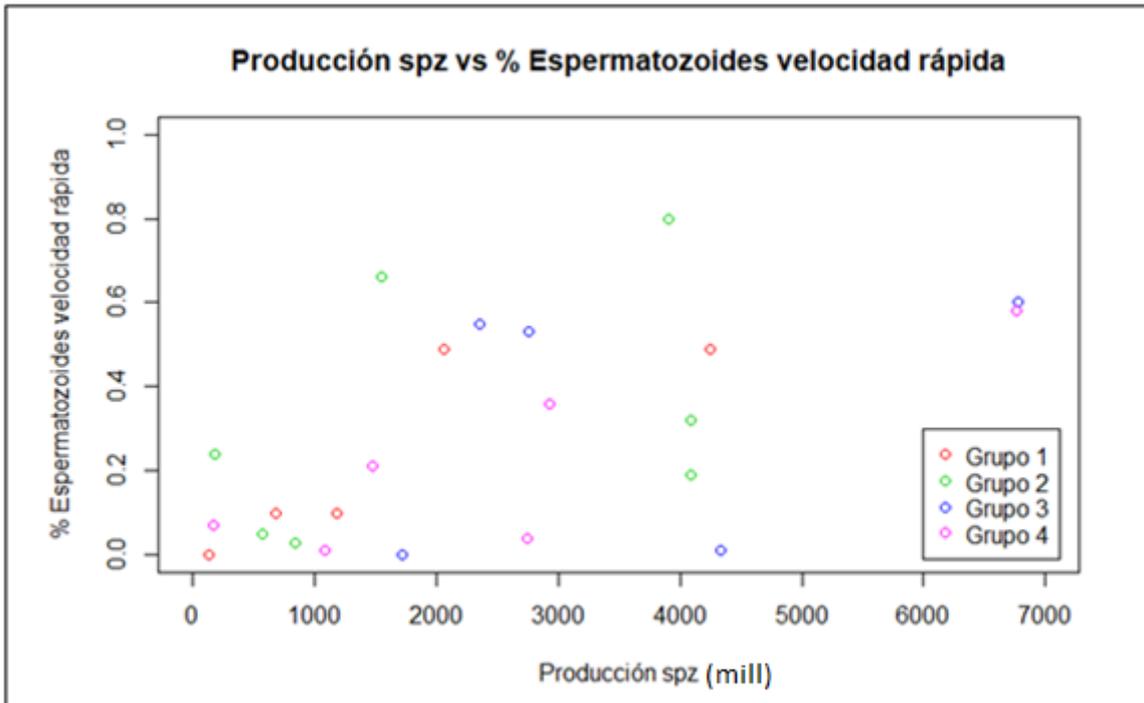
Figura 27. Diagrama de dispersión de producción de spz vs espermatozoides móviles progresivos.

En cuanto a la velocidad de movimiento, se determinó que el porcentaje de spz con velocidad rápida correlaciona positivamente con las variables concentración (ver Figura 26) ($\rho=0,44$, $p\text{-valor}=0,0356$), producción spz (ver Figura 27) ($\rho=0,51$, $p\text{-valor}=0,0129$) e ICE (ver figura 28) ($\rho=0,48$, $p\text{-valor}=0,0191$), al tiempo que el porcentaje de spz con velocidad media lo hace positivamente con las variables concentración (ver figura 29) ($\rho=0,44$, $p\text{-valor}=0,0355$) e ICE (ver figura 30) ($\rho=0,57$, $p\text{-valor}=0,0050$).



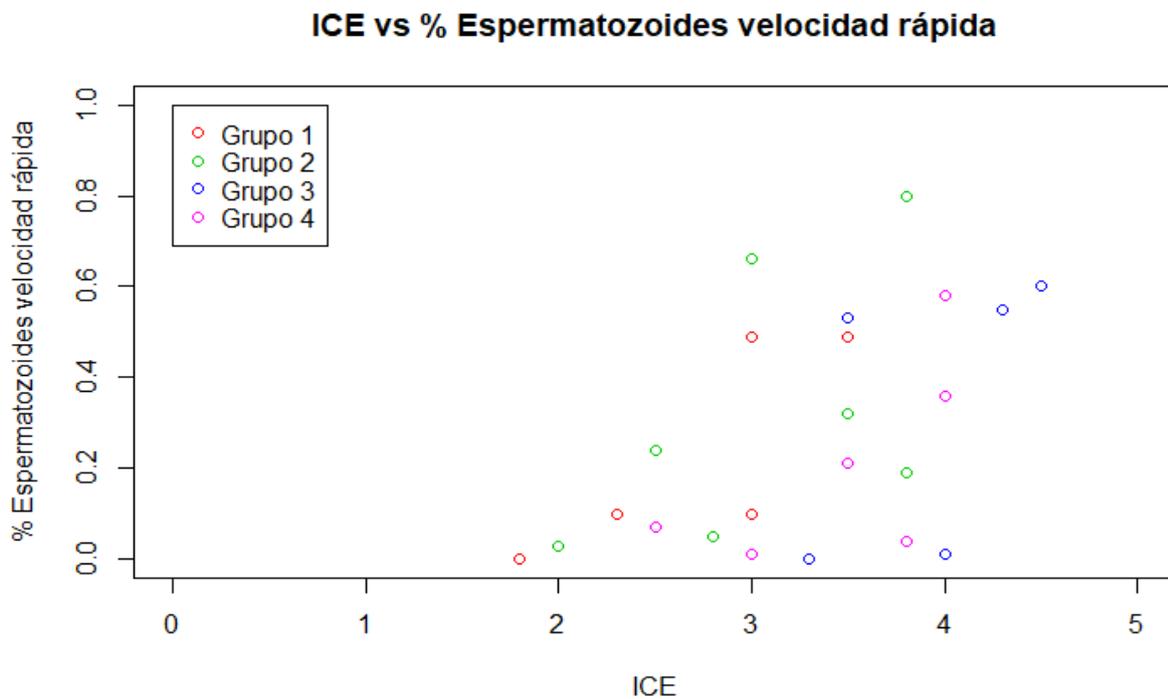
($\rho=0,42$, $p\text{-valor}=0,0465$)

Figura 28. Diagrama de dispersión de concentración vs spz con velocidad rápida.



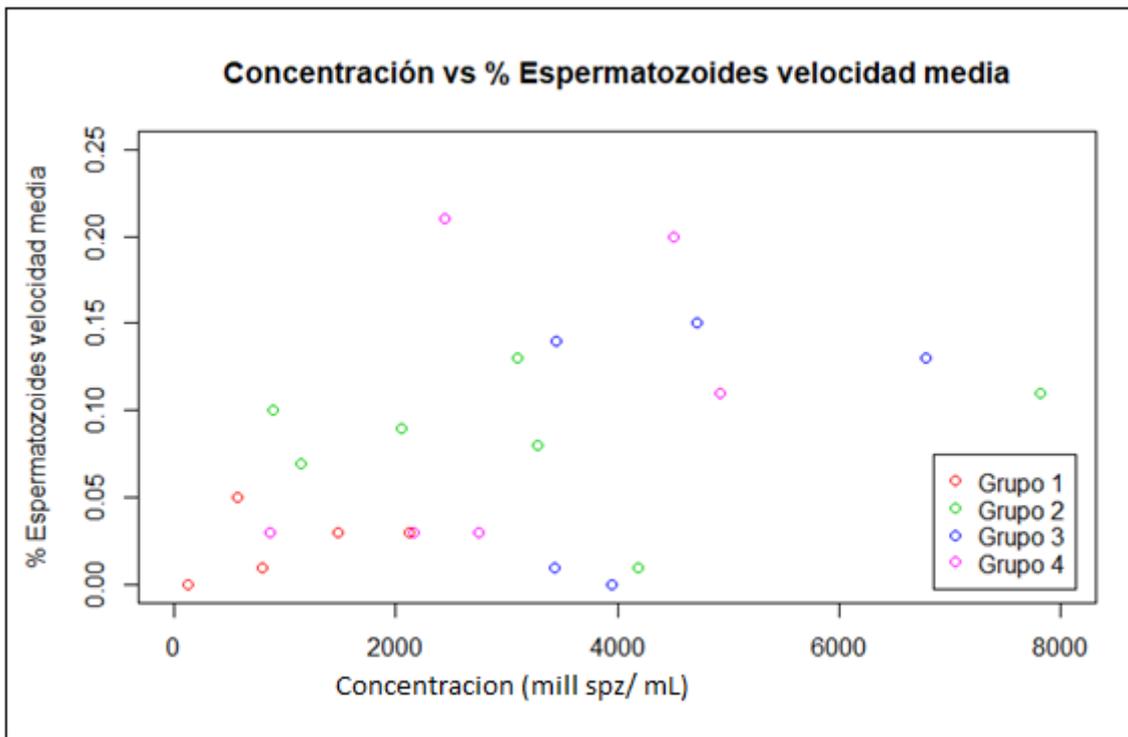
(rho=0,51, p-valor=0,0129)

Figura 29. Diagrama de dispersión de Producción spz vs spz con velocidad rápida.



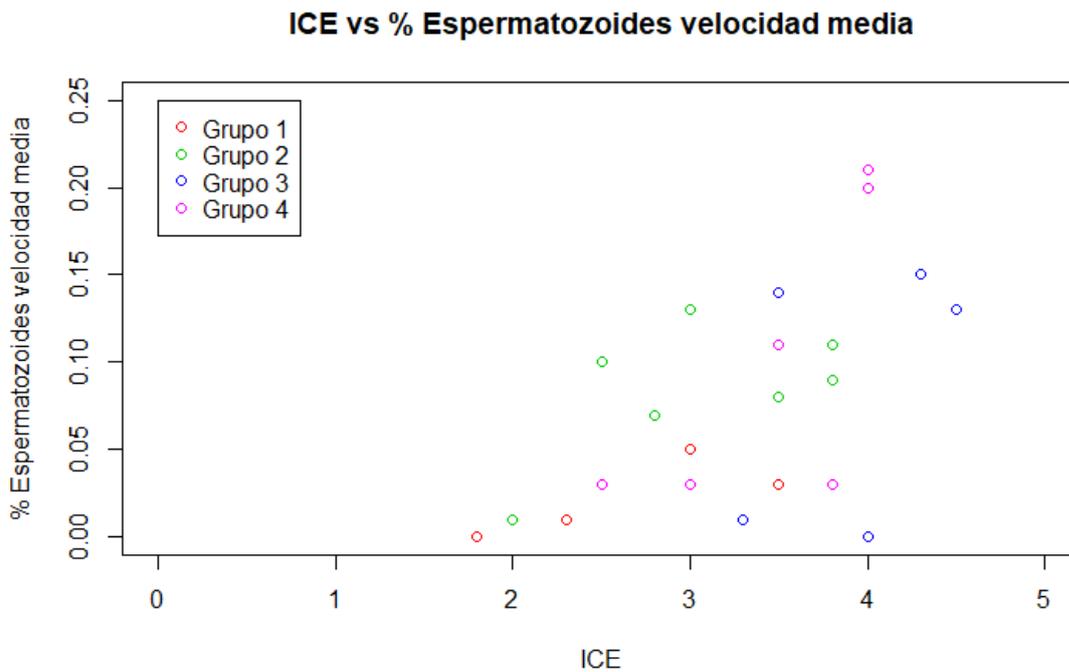
(rho=0,48, p-valor=0,0191)

Figura 30. Diagrama de dispersión de ICE vs % espermatozoides con velocidad rápida.



(rho=0,44, p-valor=0,0355)

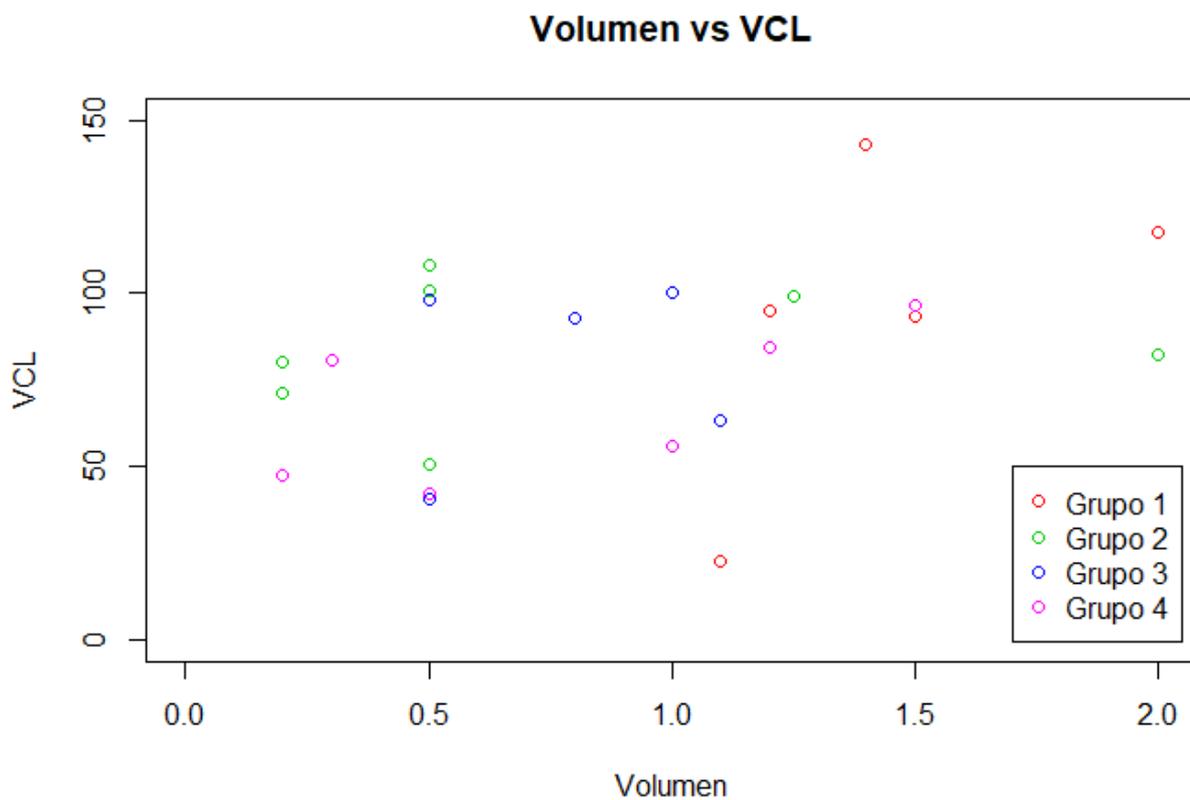
Figura 31. Diagrama de dispersión de concentración vs espermatozoides con velocidad media.



(rho=0,57, p-valor=0,0050)

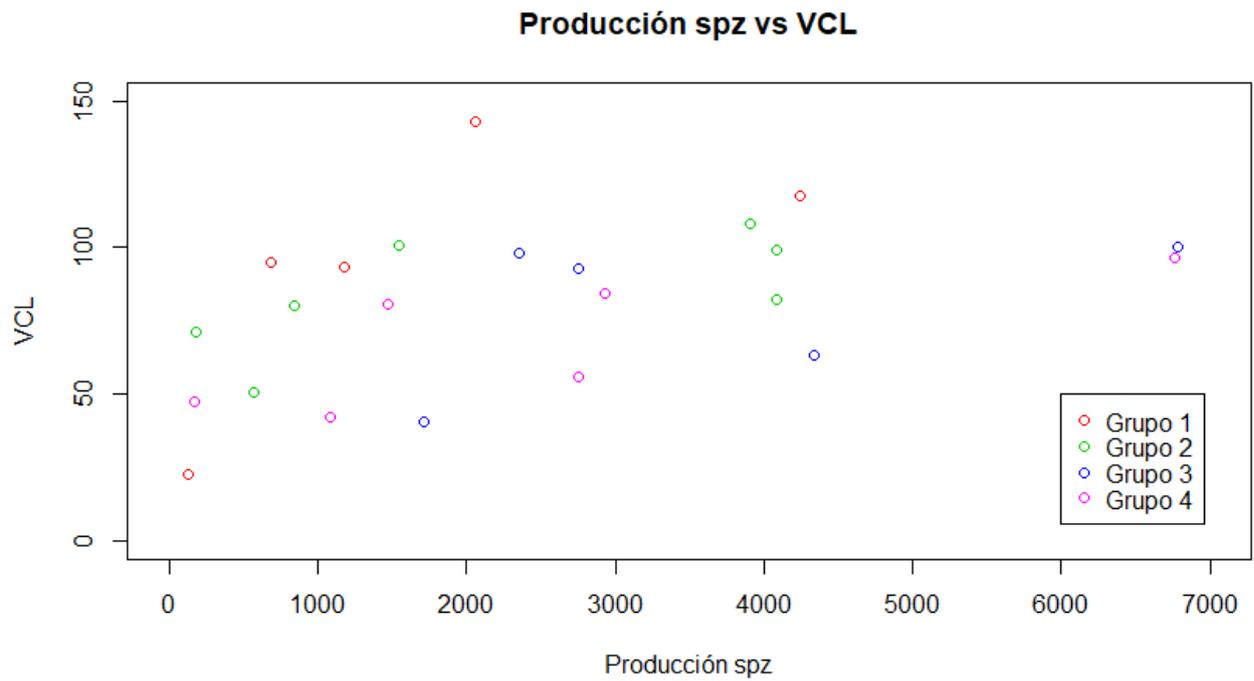
Figura 32. Diagrama de dispersión de ICE vs espermatozoides con velocidad media.

La velocidad curvilínea (VCL) es la única variable de registro ISAS que correlaciona significativamente con la variable volumen ($\rho=0,42$, $p\text{-valor}=0,0489$), además de hacerlo también con la variable producción spz ($\rho=0,55$, $p\text{-valor}=0,0075$). Por último, se determinó que la velocidad promedio (VAP) correlaciona positivamente con las variables producción spz ($\rho=0,56$, $p\text{-valor}=0,0063$) e ICE (ver figura 31) ($\rho=0,44$, $p\text{-valor}=0,0338$). En el diagrama de dispersión de Producción vs VAP se puede apreciar la asociación positiva existente entre estas dos variables. (Ver figura 32).



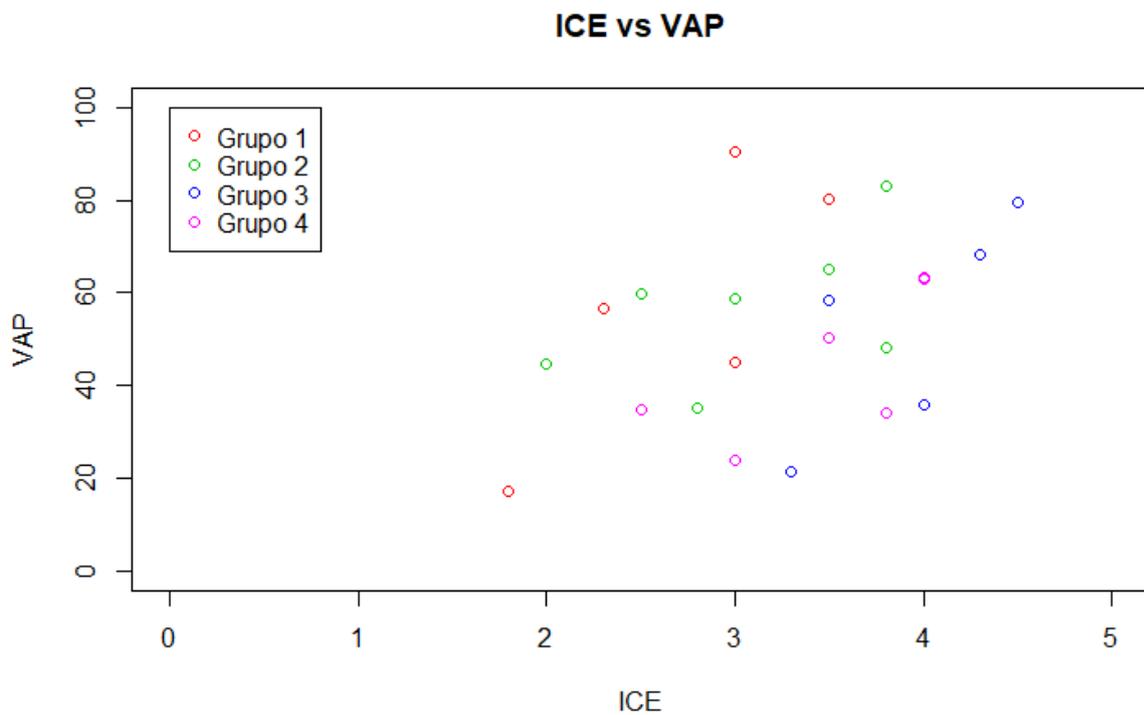
($\rho=0,42$, $p\text{-valor}=0,0489$)

Figura 33. Diagrama de dispersión volumen vs velocidad curvilínea



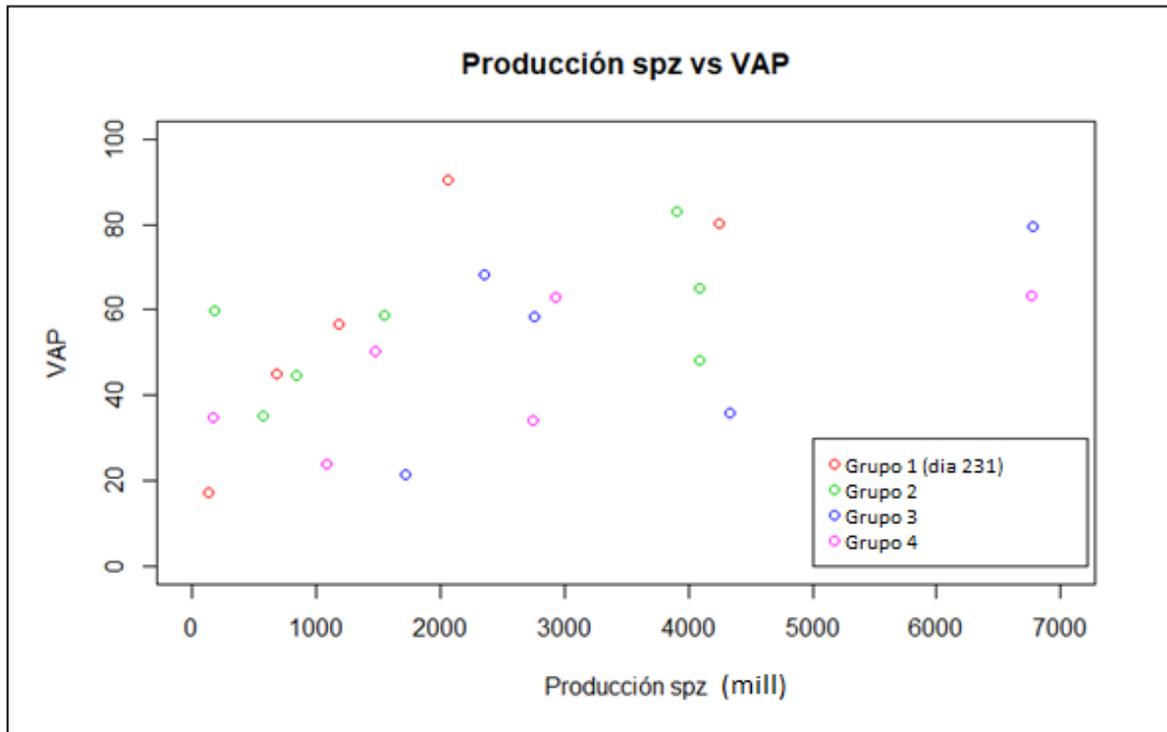
$\rho=0.55$, $p\text{-valor}=0.0075$

Figura 34. Diagrama de dispersión de producción de espermatozoides vs velocidad curvilínea.



$(\rho=0,56, p\text{-valor}=0,0063)$

Figura 35. Diagrama de dispersión de ICE vs velocidad promedio.



(rho=-0,53, p-valor=0,0108).

Figura 36. Diagrama de dispersión de Producción de espermatozoides vs velocidad promedio.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del análisis de las variables de caracterización muestran que los cuatro grupos eran homogéneos respecto a CC al inicio del ensayo. La CC de los animales de los grupos 2, 3 y 4 se encuentra en el nivel esperado al final de la estación reproductiva de otoño. Es sabido que la actividad de los machos durante la misma puede provocar un descenso en la CC (Synnott y col, 1981). Asimismo, todos los animales pastorearon campo natural durante el estudio y el Grupo 1 presenta diferencias significativas en la distribución de la CC a medida que avanzamos en el tiempo en el propio grupo y con los tres grupos restantes al final del ensayo, lo cual podría explicarse por la mayor disposición de alimento en primavera. El seguimiento de CC no fue posible con las demás categorías debido a que el establecimiento donde se llevó a cabo el estudio es vendedor de reproductores, lo cual no permitió asegurar la permanencia de los animales de mayor edad a lo largo del estudio. Al relacionar las variables CC y CE se puede observar el aumento de ambas variables a lo largo del tiempo para el Grupo 1. Lo mismo sucede con el aumento de PV y la CE en dicho grupo, lo que concordaría con Morón Cedillo y col. (2012), quienes trabajando con corderos Rambouillet, reportaron correlación positiva ($p < 0.01$) entre el PV de los corderos y la CE ($r = 0.56$).

Almeida y col (1987) reportan que a partir de los 7 meses de edad luego del periodo de latencia el desarrollo testicular y corporal evolucionan simultáneamente, en forma exponencial, hasta el año. Asimismo, Fernández Abella y col (1992) reportan alta correlación entre PV y volumen testicular entre los 7 meses y el año, sin encontrar correlación en el animal adulto, concluyendo que finalizado el desarrollo corporal las variaciones entre ambas características son independientes. En nuestro estudio, en el Grupo 1 se constató un franco aumento del PV y correlación positiva fuerte entre PV y concentración de spz ($\rho = 1$, $\text{valor} = 0,0167$), y PV y producción de spz ($\rho = 1$, $p\text{-valor} = 0,0167$), lo cual es concordante con el desarrollo conjunto, corporal y testicular.

Salhab y col (2001) reportan una correlación entre el desarrollo testicular (largo, ancho, circunferencia y volumen), con la edad y peso corporal ($p < 0.01$, $r = 0.68$ a 0.97). Los resultados en la variable CE de nuestro estudio, muestran que se pueden diferenciar 3 bloques relacionados con la edad, el primer bloque conformado por los corderos del Grupo 1 al inicio (6 meses de edad), el segundo conformado por el Grupo 1 en los días 106 y 231 y el Grupo 2 (9 y 13 meses de edad) y el tercer bloque conformado por los carneros de los Grupos 3 y 4 (4, 6 y 8 dientes).

Morón Cedillo y col (2012), trabajando en corderos Rambouillet, no encontraron correlación entre CE y volumen del eyaculado, lo cual es concordante con nuestros resultados. Los Grupos 2, 3 y 4 no presentan diferencias significativas en la variable volumen entre ellos, a pesar de que pertenecen a diferentes bloques según la CE. Los animales del Grupo 2 y 4 presentan un intervalo de confianza muchos más amplio, mientras que el Grupo 3 es el de menor intervalo mostrando menor dispersión en los volúmenes. Esto podría explicarse por lo reportado por Fernández Abella (2015) en relación con el descenso más pronunciado en los parámetros seminales en los borregos al final de la estación reproductiva respecto a los carneros. Asimismo, la categoría boca llena comprende animales donde la edad

puede tener mayor dispersión y el desempeño de los animales podría estar afectado por la misma.

Los animales del Grupo 1 al día 231 (13 meses de edad) tuvieron una media en el volumen superior al Grupo 2, a pesar de que estos tenían la misma edad y de que se encuentran en el mismo bloque según la CE. Esto podría explicarse por lo reportado por Salamon (1962) y Colas (1983), quienes destacan que a medida que avanza la estación reproductiva el volumen y la concentración espermática van disminuyendo. Los animales de los grupos 2, 3 y 4 trabajaron en la estación reproductiva de otoño, mientras los del Grupo 1 no lo hicieron. Asimismo, esto podría explicarse por la mejor CC y el PV alcanzado por los animales del Grupo 1 al día 231. Situación determinada por animales que están bajo pastoreo en campo natural (Masters y Fels, 1984). Según Simonetti y col (2014), los carneros con baja CC, situación más frecuente en animales criados a campo, suelen tener menor concentración y calidad de semen, lo cual sucede especialmente en la región basáltica de nuestro país. Además, Walkley y Smith (1980) reportan que el peso del animal presenta una relación próxima ($p=0.09$) con el volumen del eyaculado ($r=0.39$).

Si nos enfocamos en la influencia del fotoperíodo, teniendo en cuenta que los animales de los Grupos 1 y 2 alcanzan la misma edad en distintas estaciones reproductivas, no sería tan importante trabajando con razas originarias de latitudes inferiores a 35° , siendo Merino Australiano una de ellas, así lo reportaron Hafez (1952) y Robinson (1981). En latitudes intermedias como el Uruguay, bajo condiciones de cría de pastoreo, los efectos del fotoperíodo se ven enmascarados por los cambios en la alimentación, observándose variaciones estacionales cuando las condiciones nutricionales son de penuria o están afectadas en su calidad (Fernández Abella, 2015).

En los resultados de la variable concentración, podemos ver que los animales de los Grupos 2, 3 y 4 no presentan diferencias significativas entre ellos ($p>0.05$), mientras que los grupos 3 y 4 fueron significativamente diferentes respecto al Grupo 1 ($p<0.05$).

Esto puede relacionarse con los resultados de CE donde el Grupo 1 (día 106 y 231) y el Grupo 2 conforman un mismo bloque. Simonetti y col (2014) sostienen que la producción seminal puede estimarse tomando la medición de la CE. En nuestro ensayo los corderos al día 106 (9 meses de edad) si bien alcanzaron una media de CE escrotal adecuada no se obtuvo semen salvo en dos animales. Esto puede deberse a retraso en la aparición de la pubertad, lo cual puede ser provocado por una baja eficiencia en el proceso de la espermatogénesis, si bien hay desarrollo del parénquima testicular la maduración es insuficiente (Courot, 1962, Horechereau de Reviers y col, 1976). El desarrollo sexual del animal joven se ve afectado por factores genéticos, ambientales y su interacción. La aparición de la pubertad también está condicionada por la estación del año en que se produce el nacimiento, la nutrición en ese período y las interacciones sociales dentro del rebaño (Buratovich, 2010). La pubertad y la madurez sexual en el macho, como en la cordera, se puede retrasar si coincide con periodos de días largos. Asimismo, se debe tener en cuenta que la estimulación eléctrica no siempre es efectiva para la obtención de un eyaculado (Marco Jiménez y col, 2005).

En cuanto a producción espermática, Fernández Abella (2015) encuentra una alta correlación entre volumen testicular y producción espermática, mientras que la

correlación con CE es de mediana magnitud. Toe y col (2000) reportan que la CE puede utilizarse para predecir la producción espermática en los carneros. Asimismo, Trejo y col (1990) encontraron que el volumen del semen se correlaciona significativamente con la concentración espermática, el total de espermatozoides y la motilidad progresiva. La variable producción espermática, en los resultados obtenidos, no muestra diferencias significativas entre las medias de los 4 grupos. Esta variable es importante en el cálculo del número de dosis inseminantes/eyaculado si estamos trabajando en IA o el número de hembras que pueden ser servidas por el macho (Fernández Abella, 2015). Los resultados obtenidos en este estudio permitirían utilizar borregos y machos adultos sin diferencias significativas según este parámetro.

En ovinos, como en la mayoría de las especies, la calidad del semen está directamente relacionada con la edad (Morón Cedillo y col, 2012). Los resultados obtenidos de ICE muestran que existe diferencia significativa de los machos adultos jóvenes, Grupo 3, frente a los Grupos 1 y 2, mientras que el Grupo 4 no presenta diferencia con ninguno de los grupos. La categoría adultos boca llena mantiene la calidad del semen, aunque se puede observar tendencia a mayor dispersión en el intervalo de confianza. En concordancia con esto, Ostrowski (1980) afirma que la edad de los reproductores tiene una importancia fundamental en la eficiencia reproductiva de la majada y que los carneros sexualmente más activos y más fértiles son los de 4 y 6 dientes mientras que los de 8 dientes serían menos fértiles.

En borregos, Colas (1983), reporta un mayor porcentaje de anomalías primarias, producidas durante la espermatogénesis, y un descenso más rápido que en el carnero de la concentración de espermatozoides en eyaculados sucesivos. A su vez, según Dyrmondsson y Less (1972), en la pubertad, la calidad y la cantidad de los espermatozoides en el eyaculado del carnero es pobre, ya que presentan una baja motilidad y alto contenido de espermatozoides muertos y anormales. Todo lo cual impactaría en forma negativa en el ICE ya que son parámetros incluidos en el cálculo del mismo.

En nuestros resultados se observa una correlación positiva entre las variables CE e ICE. Las medias de ICE obtenidas en nuestro estudio en carneros adultos jóvenes y boca llena (3.8 y 3.5 respectivamente) son inferiores a la media (4,1) reportada por Fernández Abella (1993), aunque este autor determinó una única media trabajando con carneros de diferentes razas (Merilin, Merino y Polwarth).

Los resultados por ISASv1® no muestran diferencias significativas entre los cuatro grupos analizados en las subpoblaciones de espermatozoides por tipo de movimiento (progresivos, no progresivos y estáticos), espermatozoides rápidos, VCL, VAP, VSL y LIN entre los cuatro grupos. En las condiciones de este estudio los grupos se comportan en forma homogénea según estos parámetros.

En nuestro estudio existe correlación positiva, moderada a fuerte, entre porcentaje de spz rápidos y concentración, producción de spz e ICE ($\rho= 0.44, 0.51$ y 0.48 respectivamente, $p<0.05$). Asimismo, correlación positiva moderada entre porcentaje de spz con movimiento progresivo y producción de spz ($\rho= 0.42, p= 0.0465$). Mientras que porcentaje de spz de velocidad media presenta correlación moderada y fuerte con concentración e ICE respectivamente ($\rho=0.44$ y $0.57, p<0.05$). La VCL correlaciona positivamente en forma moderada con volumen y fuerte con producción de spz ($\rho=0.42$ y $0.55, p<0.05$). Por último, VAP correlaciona fuerte y

positivamente con producción de spz ($\rho=0,56$, $p=0,0063$) y en forma moderada con ICE ($\rho=0,44$, $p=0,0338$).

Considerando las correlaciones positivas, moderadas y fuertes, entre ICE y producción de spz por evaluación manual y porcentaje de spz de movimiento rápido/medio y progresivo por evaluación automatizada, ambos criterios de evaluación seleccionarían en forma concordante los animales de mayor poder de fertilización de acuerdo con lo reportado en la literatura (Courot y Ortavant, 1981, Holt y col, 2007, Li y col, 2016).

CONCLUSIONES

La CE y la CC serían insuficientes para definir la utilización de los corderos como reproductores.

El uso de criterios de selección de reproductores a través de evaluación manual o automatizada de semen es adecuado en todas las categorías, siendo estrictamente necesario en los corderos.

Se observa concordancia entre los criterios de evaluación manual y automatizado.

Los carneros 4 y 6 dientes presentan diferencia significativa con los borregos en la calidad seminal, mientras que los carneros boca llena no mostraron diferencia significativa con el resto de las categorías.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amann, R. P., Schanbacher, B. D. (1983). Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science*, 57 (Suppl.2): 380-403.
2. Arendt, J. (1986). Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, 8: 266-320.
3. Baronos, S., Mann, T., Rowson, L. E. A., Skinner, J. D. (1969). The effect of nutrition and androgens on the composition of bovine blood plasma and seminal plasma at puberty. *British Journal of Nutrition*, 23: 191-201.
4. Bernardi, S., Allende, R., Mazzeo, R., Monti, J., Marini, P. (2011). Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. In *Vet.* 13 (2):25-38.
5. Bester, N. (2006). Effect of different dietary energy levels on productive and reproductive traits in Dorper rams. Tesis. University of the Free State. 158 p.
6. Bonino Morlan, J (2000) Reproducción clínica reproductiva del carnero. Disponible en: www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R89/R89_41.htm Fecha de consulta: 5 de setiembre de 2017.
7. Bronson, F.H. (1988) Mammalian reproductive strategies: genes, photoperiod and latitude. *Reproduction, Nutrition, Development*. 28 (2B): 335-347.
8. Buratovich, O. (2010). Eficiencia reproductiva en ovinos: factores que la afectan. Parte II: otros factores no nutricionales. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/produccion_ovina/76-Eficiencia_reproductiva.pdf Fecha de consulta: 5 de setiembre de 2017.
9. Cameron, A. W. N.; Murphy, P.M.; Oldham, C.M. (1988). Nutrition of rams and output of spermatozoa. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production* 17:162-165.
10. Cameron, A.W.N., Tilbrook, A.J. (1990). The rate of production of spermatozoa by rams and its consequences for flock fertility. *Animal Research Institute, Department of Agriculture and Rural Affairs. Australia. Animal Science*, 10: 131 – 141.

11. Castrillejo A. (1990). Relevamiento clínico de aptitud de reproductiva en carneros. *Veterinaria (Montevideo)* 26:15-32.
12. Castrillejo, A. (1987). Enfermedades de los órganos genitales de los carneros. En: Bonino Morlan J., Duran del Campo A., Mari J.J. *Enfermedades de los lanares*. Montevideo, Hemisferio Sur. V. 3, p. 1-47.
13. Christensen P., Brockhoff P.B., Lehn-Jensen H. (1999). The relationship between semen quality and the non-return rate of bulls. *Reproduction in Domestic in Animals*. 34: 503- 507.
14. Colas, G. (1983). Factors affecting the quality of ram semen. En: Haresign, W. *Sheep production*. London. Butterworths. pp. 453-465.
15. Courot, M. (1962). Développement du testicule chez l'agneau. Établissement de la spermatogenèse. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 2 :25-42.
16. Cunningham, J.; Klein, B. (2009). *Fisiología Veterinaria*. 4º ed. Barcelona, Elsevier, 700 p.
17. Dacheux, J. L., Pisselet, C., Blanc, M. R., Hochereau-de-Reviere, M. T., Courot, M. (1981). Seasonal variations in rete testis fluid secretion and sperm production in different breeds of ram. *Journal of Reproduction and Fertility*, 61: 363-371.
18. Davis, G. P., Hinch, G. N., Thwaites, C. J., Kinghorn, B. P. (1986). Attainment of puberty in rams selected on weaning weight. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*, 16: 175-178.
19. De Gea, G (2007). *Manejo. El Ganado lanar en la Argentina*. 2ª ed. Río Cuarto, Universidad Nacional de Río Cuarto, 245 p.
20. Desjardins, C. (1978). Endocrine regulation of reproductive development and function in the male. *Journal of Animal Science*, 47(Suppl 2): 56-79.
21. Dun, R. (1955). Puberty in Merino rams. *Australian Veterinary Journal*. 31: 104-106.
22. Dun, R.B. (1956). Temporary infertility of rams associated with flooding. *Australian Veterinary Journal*, 32:1-3.
23. Durán del Campo, A. (1980). *Anatomía, fisiología de la reproducción e inseminación artificial en ovinos*. Montevideo, Ed. Hemisferio Sur, 264p.
24. Dutt, R.H, Hamm, P.T (1957). Effect of exposure to high environmental temperature and shading on semen production of rams in winter. *Journal of Animal Science*. 16: 328-334 p.

25. Dyce, K., Sack, W., Wensing, C. (1999). Anatomía Veterinaria. 2º ed. Mexico, McGraw- Hill Interamericana, 952p.
26. Dyrmondsson O.R. (1973). Puberty and early reproductive performance in sheep rams lambs. *Animal Breeding Abstracts*, 41:419-430.
27. Edey, T.N.; Kilgour, R.; Bremmer, K. (1978). Sexual behavior and reproductive performance of ewe lambs and after puberty. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 90:83-91.
28. Ensminger, M. E. 1973. Producción Ovina. Buenos Aires, El ateneo. 545 p.
29. Evans, G., Maxwell, W. M. C. (1990). Inseminación artificial de ovejas y cabras. Madrid. Acribia, 192 p.
30. Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1987). Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Sydney, Butterworths, 194 p.
31. Fernández Abella, D. (1992). Efectos de la edad y la raza en la producción de semen y la actividad sexual. *Boletín Técnico de Ciencias Biológicas* 2:37-49.
32. Fernández Abella, D. (1993). Principios de Fisiología Reproductiva Ovina. Montevideo, Hemisferio Sur, 254 pp.
33. Fernández Abella, D. (2015). Tecnologías reproductivas bovinas y ovinas. Montevideo, Hemisferio Sur. 200p
34. Fernández Abella, D.H., Villegas, N., Echeverría, Robaina, J. (1993). Evaluación de las variaciones estacionales en la producción espermática de cuatro razas ovinas. *Boletín Técnico de Ciencias Biológicas*, 3: 23-34.
35. Ferrell, C. L. (1991). Nutritional influences on reproduction. En: Cole, H.H.; Cupps, P.T. *Reproduction in domestic animals*. 4ª ed. San Diego, Academic Press, pp. 577-604.
36. Fulkerson, W.J., Synnott, A.L., Lindsay, D.R. (1982). Number of spermatozoa required to affect a normal rate of conception in naturally mated Merino ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* 66:129-132.
37. Galloway, D. B. (1966). Some aspects of reproductive wastage in rams. *Australian Veterinary Journal* 42:79-83.
38. García Sacristán A, Castejón F, de la Cruz L, González J, Murillo M, Salido G. (1995). Reproducción en ovejas y cabras. En: García Sacristán A, Castejón F, de la Cruz L, González J, Murillo M, Salido G. *Fisiología Veterinaria*. México, Interamericana – Mc Graw Hillpp, p 937-950.

39. Gibbons, A.; Cueto, M.; García Vinent, J.; Wolff, M.; Arrigo, J. (1993). Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Manual de divulgación. Comunicación Técnica de Producción Animal del INTA Bariloche Nº 200. 19 p.
40. Gil, M.C., García-Herreros, M., Barón, F.J., Aparicio, I.M., Santos, A.J., García Marín, L.J. (2009). Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology* 71: 254-263.
41. Godfrey, R. W., Lunstra, D. D., Jenkins, T. G., Berardinelli, J. G., Guthrie, M. J., Neuendorff, D. A., Long, C.D., Randel, R. D. (1990). Effect of season and location on semen quality and serum concentrations of luteinizing hormone and testosterone in Brahman and Hereford bulls. *Journal of Animal Science*, 68(3): 734-749.
42. Graham, J.K. (1996) Cryopreservation of stallion spermatozoa. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice* 12:131-147.
43. Gunn, R. M. (1942). Studies in fertility of sheep. Seminal changes affecting fertility of rams. *Australian Veterinary Journal* 18:94-106.
44. Hafez, ESE (2002). Reproducción e Inseminación artificial. 7ª Ed. México, McGraw Hill Interamericana, 519 p.
45. Haley, C. S., Lee, G. J., Ritchie, M., Land, R. B. (1990). Direct responses in males and correlated responses for reproduction in females to selection for testicular size adjusted for body weight in young male lambs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 98:383-396.
46. Hastings, M. H., Herbert, J., Martensz, N. D., Roberts, A. C. (1985). Melatonin and the brain in photoperiodic mammals. *Ciba Found Symposium*. 117: 57-77.
47. Hidalgo, M. (2003). Valoración de la calidad esperma y su correlación con la fertilidad. I Jornadas de Reproducción Equina. Valencia. España.
48. Holt W., O'Brien J., Abaigar T. (2007) Applications and interpretation of Computer-Assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research *Reproduction, Fertility and Development*. 19: 709–718.
49. Horechereau de Reviers, M. T., Blanc, M. R., Colas, G., Pelletier, J. (1985). Parameters of male fertility and their genetic variation in sheep. En: Land, R.B.; Robinson, D.W. *Genetics of Reproduction in Sheep*. Letchworth. Garden City Press., pp 301-314.

50. Horechereau de Reviere, M.T., Loir, M.C., Pelletier, J. 1976. Seasonal variations in the response of the testis and LH levels to hemicastration of adult rams. *Journal of Reproduction and Fertility* 46:203-209.
51. Howarth, B. (1969) Fertility in the ram following exposure to elevated ambient temperature and humidity. *Journal of Reproduction and Fertility* 19:179-183.
52. Jefferies B.C. (1961). Body condition scoring and its use in management. *Tasmanian Journal of Agriculture*, 32: 19-21
53. Kendrick, K.M., Hinton, M.R., Atkins, K. (1998). Mothers determine sexual preferences. *Nature Magazine*, 395: 229-230.
54. Kilgour, R. J., Fernández Abella, D. (1985). La importancia del carnero en el mejoramiento de la Tasa Reproductiva. *Primeras Jornadas sobre Producción Animal*. ITEA. Zaragoza. España. pp: 12-25.
55. Kilgour, R. J., Pisselet, C., Dubois, M. P., Courot, M. (1998). Ram lambs need FSH for normal testicular growth, Sertoli cell numbers and onset of spermatogenesis. *Reproduction, Nutrition, Development*, 38(5): 539-550.
56. Knight, T.W., Lindsay, D.R. (1973). Identifying the mating performance of individual rams. *Australian Journal of Agricultural Research* 24:579-585.
57. Leatham, J. H. (1975). Nutritional influences on testicular composition and function in mammals. En: Hamilton, D.W., Greep, D.O. *Handbook of Physiology. Endocrinology*. Bethesda, American Physiology Society, V 5, pp 225-232.
58. Li Y, Kalo D., Zeron Y. and Roth Z. (2016). Progressive motility a potential predictive parameter for semen fertilization capacity in bovines. *Zygote* 24: 70-82
59. Lincoln G.A., Short R.V. (1980). Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Recent Progress in Hormone Research*, 36: 1-43.
60. Lincoln, G.A., Davidson, W. (1977). The relationship between sexual and aggressive behavior, and pituitary and testicular activity during the seasonal sexual cycle of rams, and the influence of photoperiod. *Journal of Reproduction and Fertility*, 49 (2): 267- 276.
61. Lindsay, D. R., Pelletier, J., Pisselet, C., Courot, M. (1984). Changes in photoperiod and nutrition and their effect on testicular growth of rams. *Journal of Reproduction and Fertility*, 71(2): 351-356.
62. Lindsay, D.R. (1984). Quantitative requirements of females for animal reproduction. En: Courot, M. *The male in farm animal reproduction*. Dordrecht, Nijhoff, pp. 324-338.

63. Lino, B. F. (1972). The Output of Spermatozoa in Rams II. Relationship to Scrotal Circumference, Testis Weight, and the Number of Spermatozoa in Different Parts of the Urogenital Tract. *Australian Journal of Biological Science*, 25(2): 359-366.
64. Madani, M.O.K., Rahal, M. S., Zawia, M. T., Eluwhaishi, B. A. (1989). Puberty and early sexual development in Libyan fat-tailed ram lambs. *British Veterinary Journal*, 145(3): 276-288.
65. Mandiki, S. N. M., Derycke, G., Bister, J. L., Paquay, R. (1998). Influence of season and age on sexual maturation parameters of Texel, Suffolk and Ile-de-France rams: 1. Testicular size, semen quality and reproductive capacity. *Small Ruminant Research*, 28(1): 67-79.
66. Manual Electrojac 5 ®, 2011. Disponible en: www.giss.co.th/document/manual Fecha de consulta: 5 de setiembre de 2017.
67. Manual ISAS v1® 2015. Disponible en: <http://www.proiser.com> Fecha de consulta: 5 de setiembre de 2017.
68. Marco Jiménez F., Puchades S., Gadea J., Vicente J.S., Viudes de Castro M.P. 2005. Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology*, 64 (8): 1756- 1765.
69. Martin, L Lapwood, K. R., Kitchell, R. L. (1984). The effects of specific neurotomies and cremaster muscle sectioning on semen characteristics and scrotal thermoregulatory responses of rams. En: Lindsay, D.P., Pearse D.T., (eds). *Reproduction in sheep*. Canberra, Australian Academy of Science, pp. 73-75.
70. Masters, D.G., Fels, H.E. (1984). Seasonal changes in the testicular size of grazing rams. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production* 15: 444- 447.
71. Molina, A., Gallego, L., Soltillo, J.L., (2006). Evolución anual del peso vivo y de la nota de condición corporal de ovejas de raza manchega en diferentes estados reproductivos. Disponible en: http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/15_10_23_148_3.pdf Fecha de consulta: 5 de setiembre de 2017.
72. Montossi, F., De Barbieri, I., Mederos, A., De Mattos, D., Frugoni, J.C., Martínez, H., Zamit, W., Levratto, J., Grattarola, M., Y Pérez Jones, J. (2003). Núcleo Fundacional del Proyecto Merino Fino del Uruguay. Jornada de

Producción Animal y Pasturas en Basalto. INIA Tacuarembó, Uruguay. Serie Actividades de Difusión, 335: 41- 42.

73. Morón-Cedillo Felipe de Jesús, Ochoa-Cordero Manuel Antonio, Trejo-González Arturo , Díaz-Gómez Marta Olivia (2012). Relación del peso y edad a la pubertad, desarrollo testicular y características seminales en corderos Rambouillet. Disponible en: <http://132.248.9.34/hevila/Abanicoveterinario/2012/vol2/no2/1.pdf> Fecha de consulta: 5 de setiembre de 2017.
74. Moule, G.R. (1970). Australian research into reproduction in the ram. *Animal Breeding Abstracts*, 38: 185- 202.
75. Oldham, C. M.; Adams N. R., Gherardi, P.B., Lindsay, D.R., MacKintosh, J.B. (1978). The influence of level of feed intake on sperm producing capacity of testicular tissue in the ram. *Australian Journal of Agricultural Research*. 29:173- 179.
76. Orgeur, P., Venier, G., Signoret, J.P. (1984). Effets de l`environnement social au cours du développement sur l`apparition et l`intensité de l`activité sexuelle du sperme de bélier. *Annales de Zootechnie* 33: 1-18.
77. Ortavant, R., Pelletier, J., Ravault, J.P., Thimonier, J., Volland-Nail, P. (1985). Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual 50 cycle of reproduction in farm mammals. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. 7: 306–345.
78. Osorio C. (2013). Valoración computarizada de la integridad funcional de la membrana plasmática, motilidad y morfología espermática en semen criopreservado de búfalo. Programa de Maestría en Reproducción Animal. LUZ. Maracaibo. 106p.
79. Ostrowski J.E.B, (1980) Teriogenología. Temas sobre manejo reproductivo e inseminación artificial en bovinos y ovinos. Montevideo. Ed Hemisferio Sur, V1.
80. Pacheco, A., Quirino, C. R. (2010). Comportamento sexual em ovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 34(2): 87-97.
81. Pelletier, J., Almeida, G. (1987). Short light cycles induce persistent reproductive activity in Ile-de-France rams. *Journal of Reproduction and Fertility*. (Suppl 34): 215.

82. Pretorius, P. S., Marincowitz, G. (1968). Post-natal penis development, testes descent and puberty in Merino ram lambs on different planes of nutrition. *South African Journal of Agricultural Science*, 11: 319-334.
83. Price, E. O., Borgwardt, R., Dally, M. R. (1996). Heterosexual experience differentially affects the expression of sexual behavior in 6-and 8-monthold ram lambs. *Applied Animal Behavior Science*, 46(3): 193-199.
84. Quintero-Moreno, A., Rubio-Guillén J., González-Villalobos D., Gutiérrez JC., Madrid- Bury N. y López-Brea JJ. (2011). Identification of cryodamage on plasma membrane Integrity in bull spermatozoa and its relationship With field fertility. *Revista Científica (Universidad de Zulia)*. 21(5): 403 - 407.
85. Rathore, A. K. (1970). Fertility of rams heated for 1, 2, 3, and 4 days, mated to super ovulated ewes. *Australian Journal of Agricultural Economics*, 21: 355-358.
86. Rattray, P.V. (1984). Nutrición y capacidad reproductora. En: Cole, H.H., Cupps, P.T. *Reproducción de los Animales Domésticos*. Zaragoza. Acribia. p:473-492.
87. Reid, J. T. (1960). Effect of energy intake upon reproduction in farm animals. *Journal of Dairy Science*, 43 (Suppl): 103-122.
88. Reiter, R. J. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, 49(8): 654-664.
89. Rodríguez- Martínez, H. (2003). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia. *Reproduction in Domestic Animals* 38: 312–318.
90. Rodríguez Raineri, Conrado. (2013). Desarrollo reproductivo en corderos ideal criados artificialmente o con sus madres. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, 53 p.
91. Rojas, O.R., Murguía O.M., Bores Q.R., Quintal F.J. y Baeza R.J.J. (2008). Ganancia diaria promedio, volumen testicular y circunferencia escrotal. *La Revista del Borrego* Número 54, Septiembre – Octubre.
92. S. K. Walker, R. W. Ponzoni, J. R. W. Walkley, A .S .C . Morbey (1985). The development of male reproductive traits in progeny of Merino strains of different reproductive performance. *Animal Reproduction Science*. 8: 61-78.

93. Salamon, S.; (1962). Study on the artificial insemination of Merino sheep III. Effect of frequent ejaculation on semen characteristics and fertilizing capacity. Australian Journal of Agricultural Research 13: 1137-1150.
94. Salhab SA, Zarkawi M, Wardeh MF, Al-Masri MR, Kassem R. (2001). Development of testicular dimensions and size, and their relationship to age, body weight and parental size in growing Awassi ram lambs. Small Ruminant Research 40(2):187–191.
95. Sanford, L.; Dickson, K. A. (2008). Prolactin regulation of testicular development and sexual behavior in yearling Suffolk rams. Small Ruminant Research 77:1-10.
96. Schanbacher, B. D. (1979). Increased lamb production with rams exposed to short daylengths during the nonbreeding season. Journal of Animal Science, 49 (4): 927-932.
97. Schanbacher, B. D., Lunstra, D. D. (1976). Seasonal changes in sexual activity and serum levels of LH and testosterone in Finish Landrace and Suffolk rams. Journal of Animal Science, 43(3): 644-650.
98. Senger, PL. (2003). Spermatogenesis en Pathways to Pregnancy and Parturition. 2ª ed. Pullman, Current Conceptions, 10: 220-225 p.
99. Sharpe, R. M. (1982). The hormonal regulation of the Leydig cell. Oxford Reviews of Reproductive Biology, 4: 241-317.
100. Simonetti, L., Lynch, G.M., McCormick, M. (2014). Aspectos reproductivos de los carneros. Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental. 1(1):15-20.
101. Snowder, G. D., Stellflug, J. N., Van Vleck, L. D. (2002). Heritability and repeatability of sexual performance scores of rams. Journal of Animal Science, 80(6): 1508-1511.
102. Souza, J. D., Campelo, J. E. G., Macedo, N. D., Leal, T. M., Sousa JR, A., Medeiros, R. M., Chaves, R. (2007). Biometría testicular, características seminais, libido e concentração da testosterona em ovinos da raça Santa Inês, criados a campo, na microrregião da Campo Maior, Piauí. Ciência Veterinária Tropical, 10(1): 1-8.
103. Steinberger, E., Steinberger, A. (1969). The spermatogenic function of the testes. En: K. W. McKerns The Gonads. New York, Appleton, pp 715-737.
104. SUL. Uruguay: Exportaciones del Rubro Ovino. Disponible en: <http://www.sul.org.uy/descargas/lib/datos%20de%20producci%C3%B3n%2015.pdf> Fecha de consulta: 5 de setiembre de 2017.

105. Synnott, A.L., Fulkerson, W.J., Lindsay, D.R. 1981. Sperm output by rams distribution amongst ewes under condition of continual mating. *Journal of Reproduction and Fertility* 61:355-361.
106. Thienpont, D., Rochette, F., Vanparijs, O. (1986) Diagnosing helminthiasis by coprological examination. 2a. ed. Beerse, Janssen Research Foundation, 205p
107. Toe, F., Rege, J. E. O., Mukasa- Mugerwa, E., Tembely, S., Anindo, D., Baker, R. L., Lahlou- Kassi, A. (2000). Reproductive characteristics of Ethiopian highland sheep: I. Genetic parameters of testicular measurements in ram lambs and relationship with age at puberty in ewe lambs. *Small Ruminant Research*, 36(3): 227-240.
108. Ungerfeld, R. (2002). *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea, V1.
109. Ungerfeld, R., González-Pensado, S. P. (2008). Social rank affects reproductive development in male lambs. *Animal Reproduction Science*, 109(1): 161-171.
110. Voglmayr, J.; Waites, G. (1962). Apocrine sweat glands of scrotum of the ram. *Nature*. 196: 965-967.
111. Wheaton, R.L.; Godfrey, R.W. (2003). Plasma LH, FSH, testosterone and age at puberty in ram lambs actively immunized against an inhibin subunit peptide. *Theriogenology*. 60: 933-941.
112. Wood, R. I., Ebling, F. J., I 'Anson, H., Foster, D. L. (1991). The timing of neuroendocrine sexual maturity in the male lamb by photoperiod. *Biology of Reproduction*, 45(1): 82-88
113. Zenchak, J. J., Anderson, G. C. (1980). Sexual performance levels of rams (*Ovis aries*) as affected by social experiences during rearing. *Journal of Animal Science*, 50(1): 167-174.

