

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**IMPACTO DE VARIACIONES EN LOS PROTOCOLOS DE CONGELAMIENTO SOBRE
LA CALIDAD DEL SEMEN OVINO.**

“por”

**Pablo Walter CAYRUS TOLSTOY
José Mauricio RODRÍGUEZ RIBAS
Renzo MACHIAVELLO TENCA**

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

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2019**

1. PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

DMTV PhD. Alejandro Benech Gulla

Segundo miembro (Tutor):

QF- BC Silvia Sterla Lacoste

Tercer miembro:

DMTV PhD. Luis Cal Pereyra

Cuarto miembro:

DMTV. MSc. Zully Hernández Russo

Quinto miembro

Lic. MSc. Oscar Irabuena

Fecha:

3, de abril, de 2019

Autores:

Renzo Machiavello Tenca

Pablo Walter Cayrus Tolstoy

José Mauricio Rodríguez Ribas

2. AGRADECIMIENTOS

A nuestra tutora QF-BC Silvia Sterla por su colaboración y tiempo dedicado en este trabajo.

A nuestros co- tutores MSc. DMTV. Zully Hernández, MSc. Lic. Oscar Irabuena por el apoyo, dedicación y comprensión.

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

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

Al personal de la EEFAS por su contribución y amabilidad.

A nuestros amigos y familiares que formaron parte de esta etapa.

A la familia Grasso por su disposición y amabilidad.

TABLA DE CONTENIDO	Página
1. PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
2. AGRADECIMIENTOS.....	3
3. LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	6
4. RESUMEN.....	8
5. SUMMARY.....	9
6. INTRODUCCION.....	10
7. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
7.1. Aparato reproductor del macho.....	13
7.2. Examen de aptitud reproductiva.....	14
7.3. Espermatogénesis.....	17
7.4. Capacitación espermática.....	18
7.5. Semen.....	19
7.6. Metodología de la inseminación artificial.....	20
7.6.1. Extracción seminal.....	20
7.6.2. Métodos de inseminación artificial.....	20
7.6.3. Conservación del semen.....	24
7.6.4. Diluyentes.....	25
7.6.5. Empaquetado del semen.....	26
7.6.6. Descongelación del semen.....	27
7.6.7. Evaluación seminal.....	27
7.6.8. Índice de calidad espermática (ICE).....	31
7.7. Sistema casa.....	32
7.7.1. Estandarización del sistema.....	35
7.7.2. Determinación de Subpoblaciones Espermáticas.....	36
8. HIPÓTESIS.....	37
9. OBJETIVOS.....	37
9.1. Objetivo General.....	37
9.2. Objetivos Específicos.....	37
10. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
10.1. Localización del ensayo.....	38
10.2. Ensayo de campo.....	38
10.3. Manejo y análisis de semen.....	41

10.4. Análisis estadístico.....	43
11. RESULTADOS.....	44
11.1. Selección de animales.....	44
11.2. Concentración.....	44
11.3. Motilidad.....	45
11.3.1. Tipo de movimiento de espermatozoides.....	45
11.3.2. Análisis de la velocidad de movimiento de los Espermatozoides.....	48
11.3.3. Análisis de los parámetros de velocidad.....	52
11.4. Pruebas de igualdad de distribución para VCL, VSL y VAP.....	54
12. DISCUSIÓN.....	59
13. CONCLUSIÓN.....	62
14. BIBLIOGRAFÍA.....	63

3. LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros:	Página
Cuadro 1: Determinación de la concentración espermática a través de color del eyaculado.....	28
Cuadro 2: Grados de movilidad en masa e individual	29
Cuadro 3: Escala de componentes que conforman el índice de calidad espermática (I.C.E.).....	31
Cuadro 4: Variables de caracterización de los carneros seleccionados.....	44
Cuadro 5: p-valor de prueba Kolmogorov-Smirnov de igualdad de distribución para concentración de espermatozoides entre tratamientos....	44
Cuadro 6: p-valor de prueba Kolmogorov-Smirnov de igualdad de distribución de porcentaje de espermatozoides estáticos entre tratamientos.....	45
Cuadro 7: p-valor de prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución de porcentaje de espermatozoides no progresivos entre tratamientos.....	46
Cuadro 8: p-valor de prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución de espermatozoides progresivos entre tratamientos.....	47
Cuadro 9: p-valor de prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución de espermatozoides lentos entre tratamientos.....	48
Cuadro 10: p-valor de prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución de espermatozoides rápidos entre tratamientos.....	49
Cuadro 11: p-valor de prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución de porcentaje espermatozoides rápidos progresivos entre tratamientos.....	50
Cuadro 12: Prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución para la velocidad VAP entre el total de pajuelas y tratamientos.....	55
Cuadro 13: Prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución para la velocidad VCL entre el total de pajuelas y tratamientos.....	55
Cuadro 14: Prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución para la velocidad VSL entre el total de pajuelas y tratamientos.....	56

Figuras:	Páginas
Figura 1. Parámetros de motilidad obtenidos por el C.A.S.A.....	33
Figura 2. Parámetros de motilidad obtenidos por el C.A.S.A.....	33
Figura 3. Visualización de un campo en el módulo de motilidad en sistema ISASv 1®.....	34
Figura 4. Ubicación geográfica EEFAS en el departamento de Salto....	38
Figura 5. Ubicación del establecimiento “El Totoral” en el departamento de Salto.....	38
Figura 6: Datos de configuración del sistema ISASv 1®.....	43
Figura 7: Diagrama de cajas para concentración de espermatozoides por tratamiento.....	45
Figura 8: Diagrama de cajas para porcentaje de espermatozoides estáticos por tratamiento.....	46
Figura 9: Diagrama de cajas para porcentaje de espermatozoides no progresivos por tratamiento.....	47
Figura 10: Diagrama de cajas para porcentaje de espermatozoides progresivos por tratamiento.....	48
Figura 11: Diagrama de cajas para porcentajes de espermatozoides lentos por tratamiento.....	49
Figura 12: Diagrama de cajas para porcentaje de espermatozoides rápidos por tratamiento.....	50
Figura 13: Diagrama de cajas para porcentaje de espermatozoides rápidos progresivos por tratamiento.....	51
Figura 14: Medias VCL vs Medias VAP en los tratamientos.....	52
Figura 15: Gráfica de posicionamiento relativo de las pajuelas en cuanto a media de VCL vs VAP para los cuatro tratamientos.....	53
Figura 16: Gráfica de posicionamiento relativo de las pajuelas en cuanto a media de VSL vs VCL para los cuatro tratamientos.....	53
Figura 17: Gráfica de posicionamiento relativo de las pajuelas en cuanto a media de VAP vs VSL para los cuatro tratamientos.....	54
Figura 18: Histogramas de velocidad VAP para los cuatro tratamientos...	57
Figura 19: Histogramas de velocidad VCL para los cuatro tratamientos...	57
Figura 20: Histogramas de velocidad VSL para los cuatro tratamientos...	58

4. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de modificaciones en los protocolos de congelamiento sobre la calidad del semen ovino, en machos Merino Australiano de la categoría dos dientes pertenecientes a un predio comercial de la región norte del Uruguay. Un grupo homogéneo de machos ($n=6$), seleccionado por aptitud reproductiva, condición corporal (CC), peso vivo (PV), circunferencia escrotal (CE), e índice de calidad espermática (ICE). Las muestras de semen obtenidas con electroeyaculador se utilizaron para realizar un pool y obtener 4 alícuotas llamadas T1, T2, T3 y T4. Las pajuelas de T1 y T2 llenadas a 20,0°C y 4,0°C respectivamente, reposaron horizontalmente 15 minutos, luego fueron equilibradas 4,0°C por 90 minutos, y luego congeladas. Las alícuotas restantes se equilibraron en tubo de vidrio, descendiendo la temperatura hasta 4,0°C en 90 minutos, se empaquetaron T3 a 4,0° C y T4 a 7,8°C en cámara y nevera respectivamente, reposaron 15 minutos a 4,0°C y luego congeladas. Se descongelaron 6 pajuelas por tratamiento y se evaluaron en ISASv1®. Para la concentración la prueba de K-S no detectó diferencias significativas ($p>0,05$) entre tratamientos. Al aplicarla para motilidad, no detectó diferencias significativas en la distribución entre tratamientos del porcentaje de espermatozoides estáticos ($p >0,05$), sí arrojó diferencias significativas en la distribución del porcentaje de espermatozoides progresivos y no progresivos entre T3 y T4 ($p\text{-valor}=0,026$), y entre T3 y T2 ($p\text{-valor}=0,026$). En los porcentajes de espermatozoides rápidos progresivos detectó diferencias significativas en la distribución entre T3 y T4 ($p\text{-valor}=0,026$). Los mayores valores medios de velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL) y velocidad media (VAP) se observan en T4 y los menores en T3. Mientras que en T2 los valores medios son moderados para VSL y VAP, y de moderados a bajos para VCL. Por último, las pajuelas del T1 registran valores bajos, medios y altos para las tres variables. Los histogramas de frecuencias para VCL, VSL y VAP por tratamiento mostraron a T2, T3 y T4 con patrones de distribución repetidos para las tres variables. El T2 mostró una distribución muy similar a T3 con leve tendencia a alcanzar velocidades más altas, para VSL y VAP, mientras que T3 mostró la mayor cantidad de espermatozoides con velocidades inferiores a 20 $\mu\text{m/s}$ y T4 mostró la mayor cantidad con velocidades $> 200 \mu\text{m/s}$, en VCL. En las condiciones de nuestro trabajo, utilizando machos categoría dos dientes, los marcadores de calidad seminal indicarían que los mejores resultados serían obtenidos en las condiciones de T4.

5. SUMMARY

The aim of this study, performed in a commercial farm of the northern region of Uruguay, was to evaluate the impact of modifications in the freezing protocols on the seminal quality in Australian Merino two teeth males. A homogenous group of males ($n = 6$) was selected by reproductive aptitude, body condition (BC), live weight (LW), scrotal circumference (SC), and spermatoc quality index, (ICE). Semen samples obtained with electroejaculator were used to pool and produce 4 aliquots called T1, T2, T3 and T4. The straws of T1 and T2 filled at 20.0°C and 4.0°C respectively, rested horizontally for 15 minutes, then were cooled to 4.0°C during 90 minutes, and finally frozen. The remaining aliquots were cooled to 4.0°C, in a glass tube, during 90 minutes, T3 was packed at 4.0 ° C and T4 at 7.8 ° C in a foam chamber and refrigerator, rested 15 minutes at 4.0 ° C and finally frozen. Six straws per treatment were thawed and evaluated in ISASv1®. Neither concentration nor static sperm percentage showed significant differences among treatments in the K-S test ($p > 0.05$). The progressive and no progressive sperm percentage distribution showed significant differences between T3 and T4 and between T3 and T2 (p -value = 0.026 both) meanwhile the rapid progressive spermatozoa percentage distribution showed significant differences between T3 and T4 (p -value = 0.026) in the K-S test. The highest mean values of curvilinear velocity (VCL), straight velocity (VSL) and average velocity (VAP) were obtained in T4 and the lowest in T3. While average values are moderate for VSL and VAP in T2, moderate to low values were showed for VCL. Finally, the straws of T1 register low, medium and high values for the three variables. The frequency histograms for VCL, VSL and VAP by treatment, showed T2, T3 and T4 with similar distribution patterns for the three variables. T2 showed a distribution very close to T3 with a slight tendency to reach higher speeds, for VSL and VAP. Furthermore, in VCL, T3 and T4 showed the highest number of spermatozoa, with lower and higher velocities, $< 20 \mu\text{m/s}$ and $> 200 \mu\text{m/s}$, respectively. In this study, the seminal quality markers would indicate that the best results would be obtained under T4 conditions.

6. INTRODUCCIÓN

La producción ovina ha sido gran protagonista en la historia del desarrollo económico y social del Uruguay. Durante mucho tiempo fue el principal rubro proveedor de divisas, con un papel fundamental en el aprovisionamiento de materia prima y permitiendo el desarrollo de la industria textil nacional. Asimismo, fue y continúa siendo una de las principales fuentes alimenticias en el desarrollo rural de nuestro país (SUL, 2018).

El bajo stock de ovinos en el Uruguay (6.546.000, MGAP-DIEA, 2017) motivó a instituciones y técnicos a seguir generando y validando conocimientos con el objetivo de mejorar la productividad de las majadas y así incrementar dicho stock (Bonino, 2004). Una estrategia para lograrlo es a través de la selección de animales de calidad superior (Salamon, 1990).

La selección en base a los machos es más efectiva y más rápida que en base a las hembras (Dagnew y col., 2017). 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).

Las técnicas reproductivas han estimulado la reducción de reproductores, como lo demuestra la inseminación artificial (IA) en ovinos, técnica introducida en la década del 30 (Morrant y Dun, 1960).

La reproducción asistida posibilita el mantenimiento de la diversidad genética, disminuye los costos por traslado de animales en programas reproductivos, aumenta la eficiencia reproductiva, evita problemas sanitarios y de incompatibilidad hembra-macho en el momento de la cópula (Gaviria Scioville y Arias Bernal, 2005). Asimismo, permite multiplicar las características productivas deseables de reproductores que tengan alto valor genético y obtener gran cantidad de crías del mismo padre a través de un adecuado fraccionamiento del semen (Gibbons y Cueto, 2011).

La aplicación de programas de IA está profundamente asociada al desarrollo de técnicas de preservación de semen (Ungerfeld, 2002).

La congelación de semen posibilita conservarlo por un período ilimitado de tiempo, permite el transporte a grandes distancias incorporando “sangre nueva” sin traslado de animales, el uso de semen de animales pos-mortem, la obtención de mayor cantidad de dosis en comparación con el uso directo del carnero (Evans y Maxwell, 1990; Banday y col., 2017). A esto se agrega, que, en machos de razas muy estacionales, donde la calidad de semen decae, cuando se encuentra fuera de la época de servicios, la IA con semen congelado es una alternativa para la producción de corderos fuera de estación (Ungerfeld, 2002).

Diversos factores están implicados en las bajas tasas de concepción logradas mediante el uso de semen congelado en comparación con el semen fresco. Un factor de suma importancia es la calidad de semen obtenida al descongelado. Múltiples factores afectan la sobrevivencia de los espermatozoides al descongelado: la metodología de congelación y descongelación, la concentración espermática en el diluyente, el envasado, la composición del diluyente empleado. Durante el proceso de congelación-descongelación se pierde aproximadamente el 50% de la población inicial de espermatozoides debido a los efectos de la criopreservación sobre los mismos (Stornelli y De la Sota., 2005).

Las principales causas de deterioro de las células espermáticas durante la criopreservación son: el “shock frío”, el “shock osmótico” (Watson, 2000) y el “stress oxidativo” (Aitken y Krausz, 2001; Sikka, 2001; Agarwal y Said, 2003).

El proceso de enfriamiento que se produce antes de la congelación, desde la temperatura corporal hasta los 5 °C, determina el “shock frío” (Watson, 2000; Luvoni, 2006), durante el cual, los lípidos en la membrana del espermatozoide, que no enlazan covalentemente las proteínas de la membrana, sufren transiciones de fase líquida a gel, dan lugar a cambios en la función de las proteínas de la membrana (Parks y Graham, 1992). El “shock osmótico” interviene en el rango de temperaturas desde -5 a -15 °C y en la descongelación. Si las células espermáticas se refrigeran por debajo del punto de congelación, el agua del diluyente de congelación se congelará, dejando las células espermáticas suspendidas en una solución altamente concentrada. Así, se crea un gradiente osmótico entre el interior y el exterior de la célula espermática y el agua saldrá de la célula causando su deshidratación. Si las células de esperma se enfrían rápidamente, el agua intracelular no será capaz de salir de la célula lo suficientemente rápido y se formarán cristales de hielo intracelulares. La cristalización intracelular tiene efectos nocivos sobre la viabilidad de las células espermáticas (Pukazhenthil y col, 1999). Si las células espermáticas se refrigeran muy lentamente, el agua continuará saliendo hasta que la célula esté deshidratada totalmente. Hay pues una velocidad de enfriamiento óptima (Anghel y col., 2013).

El congelamiento de semen comprende las siguientes etapas:

- Colecta de la muestra de semen.
- Dilución de la muestra de semen en diluyente previamente termostatzado a una temperatura entre 30 y 32 °C.
- Tiempo de equilibrio durante 2 a 3 horas a temperatura entre 4 y 5°C
- Empaquetado
- Congelamiento propiamente dicho y almacenamiento (Fernández Abella, 2015).

Inmediatamente después de colectado el semen, se le agrega un diluyente, termostatzado previamente a 30-32°C. Algunos agregan todo el volumen de diluyente en un solo paso y otros lo hacen en dos pasos, la mitad a 30°C y la otra a 5°C. Posteriormente se realiza el equilibramiento durante el cual la temperatura desciende a 4°C, generalmente en 90 a 120 minutos, ya que una velocidad de enfriamiento adecuada debe tener entre 0,15 y 0,25 °C por minuto para proceder posteriormente a la congelación propiamente dicha (Fernández Abella, 2015).

Se reportan mejores resultados con semen ovino cuando se empaqueta en pajuelas a temperaturas entre 4 y 6°C (Maxwell y col., 1995). En las condiciones “a campo” donde no se cuenta con cámara fría el llenado de las pajuelas se hace en nevera a temperaturas mayores (aproximadamente 7 a 10°C). Otros autores recomiendan realizar el llenado de las pajuelas a temperatura entre 20 y 25°C, para luego ser llevado a una nevera o refrigerador durante 2 o más horas a 4°C (Fernández Abella, 2015).

Las tasas de concepción deben ser superiores al 50%, para alcanzarlas son fundamentales los protocolos de criopreservación espermática para lograr una supervivencia en calidad y cantidad (Fernández Abella, 2015).

A pesar del progreso considerable de los últimos años, la criopreservación lleva a la disminución en un mínimo del 20% de la motilidad de las células espermáticas y hasta

un 50%, lo que significa que estas técnicas todavía ejercen un considerable estrés en las células espermáticas. Para obtener una fertilidad aceptable, es necesario desarrollar un método óptimo de preservación del material seminal, refrigerado o congelado, que debe integrarse fácil y rápidamente en las metodologías de inseminación (Stornelli y De la Sota., 2005; Anghel y col., 2013).

Las cualidades que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante 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).

Tradicionalmente, la calidad del semen se ha evaluado a través de una serie de parámetros macro y microscópicos, integrados en una prueba de valoración "in vitro". A pesar de que la correlación entre estos parámetros y la fertilidad no es definitiva ofrecen información válida de la calidad seminal de una muestra o de un individuo. Así, una muestra seminal de buena calidad puede no siempre ser fértil, mientras que una de baja calidad rara vez lo será (Hidalgo, 2003).

Actualmente se cuenta con técnicas objetivas de valoración de la motilidad, de la concentración y de la morfología mediante el uso de sistemas automáticos de análisis de semen (Computer-Assisted Sperm Analysis, CASA). Determinando el 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 (Cuevas, 2013).

Este sistema permite identificar la existencia de subpoblaciones de espermatozoides con distintos patrones de movimiento que coexisten en las muestras de semen (Davis y col., 1995; Holt y col, 1996; Abaigar y col., 1999).

La mayoría de los investigadores, trabajando en diferentes especies y con diferentes estudios estadísticos, proponen que la presencia de la subpoblación "rápida y lineal" es un marcador de buena calidad seminal, mientras que la de "lentos y no lineales" lo es de calidad pobre (Martínez- Pastor y col, 2011).

Por lo anteriormente expuesto en este trabajo se propone variar las temperaturas y momentos de empaquetado, evaluando el impacto en la calidad del semen congelado-descongelado a través de la determinación de las poblaciones de espermatozoides rápidas y progresivas en las muestras procesadas.

7. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

7.1. 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 período 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 escrotal 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).

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).

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 y Klein, 2009).

El conducto deferente es quien conduce el espermatozoide desde la cola del epidídimo hasta la uretra, la cual llega hasta el extremo distal del pene y desemboca en el proceso vermiforme o glándula 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). La uretra se encuentra atravesando el pene, el mismo finaliza con una estructura llamada apéndice vermiforme, la misma es fundamental al momento del servicio natural (Durán del Campo, 1980).

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).

7.2. Examen de aptitud reproductiva:

En este procedimiento además de evaluar caracteres productivos, se observa y analiza presencia de: lana en la cara, arrugas, tamaño del escroto (características asociadas a la fertilidad), estado corporal, aparato locomotor o cualquier anomalía apreciable a distancia con los animales en movimiento (Bonino, 2000).

Problemas a nivel de los miembros son importantes por la función que cumplen en el traslado y en la monta, máxime cuando se ha evidenciado que el pietín es la principal afección podal, responsable de casi el 9 % de los carneros no aptos, en el relevamiento mencionado anteriormente. El carnero es además, el principal introductor y difusor de esta enfermedad, en categorías o predios libres de la misma (Bonino, 2000).

Alteraciones graves que no tengan posibilidad de ser solucionadas serán motivo de descarte, mientras que aquellas de carácter temporario (miasis, conjuntivitis, entre otros.), deben tratarse rápidamente, pues el aumento de la temperatura corporal, incide en el proceso de la espermatogénesis (Bonino, 2000).

Finalizada esta etapa, se debe revisar individualmente cada reproductor, utilizándose siempre la misma metodología, a fin de no cometer errores u omisiones (Bonino, 2000).

Con el animal parado se revisa boca, ojos, lomo y aplomos en forma detallada (Bonino, 2000).

Boca: Se determina la edad a fin de descartar animales viejos (menor capacidad de servicio y fertilidad), observando coloración de mucosas y que no existan alteraciones mandibulares (Bonino, 2000).

Ojos: Se descartan los que presentan entropión (inversión del párpado, afección de carácter hereditario, predisponente a conjuntivitis), evaluando además problemas de conjuntivitis. El estudio de la cabeza finaliza con la apreciación de astas (Bonino, 2000).

Lomo: En la zona lumbar, se determina la condición corporal (CC) en una escala de 1 a 5 (ideal 3-3,5) y se descartan aquellos con alteraciones de columna (Bonino, 2000).

Posteriormente se "sienta" con cuidado el reproductor y se procede al examen particular de pezuñas, pecho y genitales externos (prepucio, pene, bolsa escrotal y su contenido) (Bonino, 2000).

Pezuñas: El examen debe ser meticuloso a fin de descartar animales con diferentes grados de lesiones de pietín, abscesos, entre otros. En los sanos, se realizará un

despezuñado higiénico, para mejorar el apoyo y la función de la almohadilla plantar, permitiendo una correcta irrigación y amortiguación, que eviten lesiones en el pie y luego se pasan por un pediluvio con Sulfato de Zinc al 10% (Bonino, 2000).

Pecho: En animales muy pesados es común observar úlceras o llagas en esta zona, debiéndose determinar el grado de las mismas y las posibilidades de recuperación. Lesiones avanzadas con compromiso de las partes anatómicas internas y/o complicaciones, hacen muy rebelde su curación y el dolor en la monta disminuye la capacidad de servicio (Bonino, 2000).

Prepucio y Pene: Dietas ricas en proteínas aumentan la producción de amoniaco y el pH de la orina (alcalino), favoreciendo la acción del *Corynebacterium renale*, generando úlceras o llagas prepuciales que se complican, provocan inflamación y dolor, impidiendo la normal protrusión del pene en servicio. La esquila de la lana en torno al prepucio previene esta patología y en casos clínicos, junto a tratamientos antisépticos y cicatrizantes, es fácil su reversión. Cortes de esquila u otras deformaciones a nivel de prepucio que impidan o compliquen la salida del pene (fimosi) son motivo de eliminación. La extracción manual del pene descarta la presencia o ausencia de esta patología (Bonino, 2000).

Escroto: Su inspección permite descartar sarna, que en casos extremos, provoca una inflamación con engrosamiento de la piel y elevación de la temperatura, pudiendo generar infertilidad por degeneración testicular. El tratamiento con ivermectinas inyectables o acaricidas aplicados localmente es aconsejado, evitando concentraciones altas de estos últimos, que pueden ocasionar irritaciones importantes. La presencia de heridas, fístulas o cicatrices ameritan un minucioso estudio, pues las mismas pueden ser indicadores de otros procesos patológicos o complicar la función de termorregulación que cumple el escroto (los testículos deben estar 1 a 2 grados por debajo de la temperatura corporal). Una medida conveniente es esquilar la bolsa escrotal, dejando sólo 1 cm de lana, lo que permite una mejor higiene, mayor facilidad para la palpación y permite una mejor regulación de la temperatura (Bonino, 2000).

Testículos: Dentro del saco escrotal se deben palpar los testículos bien conformados, de buen tamaño, consistencia, elasticidad y de fácil desplazamiento en la bolsa. El tamaño es sumamente importante, pues tiene una alta correlación con la fertilidad y es una característica heredable alta, que se refleja en un incremento de la precocidad sexual de la progenie (Bonino, 2000).

La correlación entre tamaño y circunferencia escrotal también es elevada, por lo que la medición de ésta, representa un parámetro de fertilidad objetivo, que puede ser utilizado en la selección de carneros. La presencia de testículos de tamaño reducido es un carácter indeseable, principalmente en reproductores adultos (Bonino, 2000).

La ausencia de los testículos es sinónimo de esterilidad, mientras que la presencia de uno solo no necesariamente afecta sustancialmente la fertilidad, pero es una patología hereditaria, representa un trastorno en el desarrollo y un defecto congénito, que no admite contemplaciones (Bonino, 2000).

Cuando en la palpación se aprecia asimetría testicular, es signo de problemas de descenso, atrofia, hipoplasia, orquitis-periorquitis, debiéndose recurrir a un seguimiento en animales jóvenes o exámenes complementarios para precisar el diagnóstico, reproductores que han superado la pubertad (40 kg) con asimetrías

testiculares, son riesgosos de utilizar y lo más coherente es su eliminación (Bonino, 2000).

Otras patologías localizadas a nivel testicular son granuloma espermático, degeneración testicular y epididimitis. El granuloma espermático, es una reacción inflamatoria ocasionada por los espermatozoides cuando toman contacto con el tejido conectivo. Se observa en la mayoría de los procesos infecciosos que afectan el epidídimo y provoca importantes adherencias.

La degeneración testicular (común en carneros de cabaña) tiene como causas predisponentes altas temperaturas (esterilidad de verano), procesos febriles, estabulación, dietas ricas en concentrados, sobrepeso, transporte, sarna chorióptica, miasis. La consistencia (resistencia a la presión) y la elasticidad (capacidad de volver a su forma original luego de ejercer una presión) están alteradas y la producción seminal comprometida. Esta patología es muchas veces reversible, pero generalmente el proceso de regeneración es más lento que lo que fue el de degeneración. Las epididimitis más comunes del carnero comienzan al nivel de la cola del epidídimo y son de manifestación unilateral, presentando adherencias que la diferencian del granuloma espermático no infeccioso (Bonino, 2000).

Cordón testicular: Se pueden observar abscesos o varicocele (trastornos locales de la circulación venosa), aunque ambos tienen una prevalencia baja. La otra afección que se puede detectar al palpar la zona es la hernia inguinal. Reproductores con cualquiera de estas alteraciones, deberán ser descartados, por estar predispuestos a sufrir alteraciones a nivel testicular y en el caso de hernias hay cierta predisposición de carácter hereditario (Bonino, 2000).

Circunferencia escrotal: Es un complemento que debe ser adecuadamente interpretado, teniendo presente el modo de obtención, época del año, actividad sexual entre otras (Bonino, 2000).

Una muestra seminal tomada aisladamente, puede detectar presencia de anormalidades celulares (reflejo de una degeneración testicular) o células inflamatorias (reflejo de procesos infecciosos del testículo o glándulas anexas). El análisis serológico para detectar *Brucella ovis* subclínica es otro colateral importante (Bonino, 2000).

Finalizada la revisión de los carneros los mismos se pueden clasificar en:

- Potencialmente aptos para la reproducción.
- Temporalmente no aptos.
- No aptos.

Los potencialmente aptos para la reproducción se dosificarán con un antihelmíntico y se vacunarán contra clostridiosis, destinándose a un potrero que reúna condiciones de buena sombra, agua y verde, donde se mantendrán bajo control hasta el servicio (Bonino, 2000).

Los temporalmente no aptos, además de las medidas mencionadas y el tratamiento específico que se aconseje, se volverán a revisar para determinar su evolución. No se aconseja el uso de productos hormonales para problemas de degeneración testicular (Bonino, 2000).

Los no aptos se castrarán, lo que no sólo impide su utilización, sino que además permite confirmar el diagnóstico clínico y encarar el problema de futuro a nivel del

predio. Aquellos que la patología es infecto-contagiosa (Brucelosis), deberán ser eliminados para evitar su diseminación. Por último, si bien muchos productores pueden revisar sus carneros y detectar algunas de las patologías mencionadas, el asesoramiento profesional y seguimiento de los reproductores, es clave para eliminar esta causa de bajos índices de procreo (Bonino, 2000).

7.3. Espermatogénesis:

La espermatogénesis es el proceso por el cual se forman los gametos sexuales del macho (pasaje de espermatogonia a espermatozoide) (Salisbury y col, 1978; Garner y Hafez, 2000; Ungerfeld, 2002).

Las divisiones de la espermatogonia madre no ocurren al mismo tiempo, sino más bien, cada una comienza una propia nueva onda de divisiones a intervalos regulares de tiempo. Así, al comenzar nuevos ciclos, siempre existirá un abastecimiento continuo de espermatoцитos (Coy, 1995).

Por lo general la espermatogénesis se divide en tres procesos principales: espermatoцитogénesis, meiosis y espermiogénesis (Cunningham y Klein, 2009).

La espermatoцитogénesis cumple con dos funciones importantes: la primera, la división mitótica de espermatogonias tipo A, produciendo espermatogonias que no entran al ciclo del espermatozoide manteniendo la población de células indiferenciadas. La segunda función es transformar las espermatogonias tipo A a tipo B, que más tarde se dividen por mitosis para producir espermatoцитos primarios. Estos experimentan un proceso de meiosis final para producir espermatozoides (Cunningham y Klein, 2009).

La meiosis es una división reduccional del material genético a partir de dos divisiones celulares sucesivas, sin que haya replicación del material genético entre ellas (Ungerfeld, 2002).

La espermiogénesis no involucra división celular alguna, sino la transformación de una célula redonda a una célula altamente especializada y flagelada que es el espermatozoide. Posterior a esto, se produce la liberación de los espermatozoides desde los túbulos seminíferos, etapa a la cual se le denomina con el nombre de “espermiación” (Garner y Hafez, 2000).

Este proceso se lleva a cabo en los tubos seminíferos dentro de los testículos, una vez finalizado pasan hacia la rete testis y posteriormente a los conductos eferentes, desembocando en la cabeza del epidídimo. En la cabeza y el cuerpo del epidídimo el espermatozoide sufre transformaciones conocidas como proceso de maduración espermática, en la que los espermatozoides adquieren motilidad y poder fecundante perdiendo la gota citoplasmática para luego ser almacenados en la cola de epidídimo (Salisbury y col., 1978).

El ciclo de la espermatogénesis en el carnero tiene una duración variable entre 47-52 días (Senger, 2003).

Control hormonal de la espermatogénesis:

El hipotálamo es un regulador de la actividad reproductiva mediante la síntesis de GnRH, hormona de naturaleza peptídica, liberada a los vasos porta hipofisarios de forma pulsátil, llega a la hipófisis para estimular la secreción de las gonadotrofinas LH y FSH (Ungerfeld, 2002). Las hormonas hipofisarias actúan sobre los testículos con el fin de iniciar y mantener la espermatogénesis (Durán del Campo, 1980).

Cada pulso de GnRH determina la liberación de otro pulso de LH, esta gonadotrofina es totalmente dependiente de la pulsatilidad de la GnRH (Ungerfeld, 2002). La secreción de FSH parece estar regulada por dos mecanismos, un componente de la secreción basal o constitutiva y otro componente pulsátil y sujeto a regulación. Luego de cada pulso de GnRH aparece un pulso de FSH, pero además, cada tanto aparecen pulsos de FSH que no son precedidos por ningún pulso de GnRH (Ungerfeld, 2002).

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 principal función de la célula de Leydig es la producción de testosterona, la producción de esta hormona está controlada por la LH, cuando la concentración de LH aumenta provoca un aumento de la testosterona. A su vez se inhibe la secreción de LH por un sistema de retroalimentación negativa provocado por el aumento de la testosterona, lo que provoca a su vez una disminución en la síntesis de la misma (Ungerfeld, 2002).

Las concentraciones de testosterona altas en los túbulos seminíferos son necesarias para un desarrollo normal de la espermatogénesis. Además, esta hormona tiene vital importancia en la libido, la actividad secretoria de las glándulas anexas y las características sexuales secundarias (Ungerfeld, 2002).

Las células de Sertoli que se encuentran presentes en los túbulos seminíferos están reguladas por los niveles de FSH y testosterona. Existen evidencias que indican que la FSH estimula a la célula de Sertoli a aromatizar la testosterona y producir estrógenos. Además, la FSH estimula la producción de proteína fijadora de andrógenos (ABP), que es secretada en los espacios intercelulares del epitelio seminífero y en la luz de los túbulos seminíferos. La función de esta proteína es mantener las altas concentraciones de andrógeno que existen en los túbulos seminíferos (Ungerfeld, 2002).

Existe además la producción por la célula de Sertoli de una hormona proteica denominada inhibina, esta tiene como efecto la supresión de la secreción de FSH probablemente actuando directamente sobre la hipófisis (Ungerfeld, 2002).

7.4 Capacitación espermática

Los espermatozoides de la mayoría de los mamíferos, madurados en el epidídimo y posteriormente eyaculados no tienen la capacidad para fertilizar el óvulo. Dicha capacidad es adquirida en el recorrido por el tracto genital femenino y luego de experimentar una serie de cambios en la composición y estructura de la membrana plasmática (Yanagimachi, 1988; Garner y Hafez, 2000).

La finalización de esta fase de maduración origina una vesiculación entre la membrana plasmática y la membrana acrosómica externa llamada reacción acrosómica y un cambio en el patrón de movimiento espermático conocido como motilidad hiperactivada (Bedford, 1970, 1983).

La conservación del semen (enfriado o congelado) puede determinar una capacitación prematura de los espermatozoides que provoca que al momento de alcanzar el lugar de la fertilización, los espermatozoides ya no mantengan su capacidad fertilizante.

Este es un proceso relativamente frecuente en los espermatozoides de carnero y explicaría al menos parcialmente la dificultad para obtener buenos resultados de preñez con semen ovino conservado (Watson, 2000).

7.5 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 (Durán 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 (Durán del Campo, 1980).

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, 1992).

En el macho joven se observa un mayor porcentaje de anomalías, cuando este es superior a 20% debería eliminarse, excepto que predominen las anomalías del flagelo ya que éstas están menos relacionadas a la fertilidad (Fernández Abella, 2003), 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).

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 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).

7.6. Metodología de la Inseminación Artificial:

7.6.1. Extracción Seminal

Los métodos más utilizados en nuestro medio son:

Vagina artificial: como su nombre lo indica, se utiliza un equipo que simula el órgano copulador femenino para la extracción del fluido seminal. Método por electroeyaculación: Método en estudio con el cual se utiliza el electroeyaculador para obtener en el semen del macho (Gómez, 2013).

La vagina artificial estimula térmicamente, a través de la temperatura, así como mecánicamente, a través de la presión para lograr la eyaculación. Luego de verificar la higienización del lugar y la del animal, se procede a asegurar la oveja en el cepo. Al momento de la monta, el colector que se encuentra del lado derecho del carnero, debe desviar el pene lateralmente para así enfrentarlo a la vagina artificial (Gibbons y col., 1993).

Pero requiere de un entrenamiento previo del macho de parte de un operario especializado, un caballete y la presencia de una hembra en celo para estimular al macho lo que dificulta su trabajo en campo abierto (Gómez, 2013).

Electroeyaculador: es un dispositivo electrónico, que consiste en una fuente generadora de energía que transmite impulsos eléctricos en una determinada frecuencia, voltaje y corriente que son conducidos a través de un transductor, que es un dispositivo de forma anular de proporciones requeridas según la especie y contiene electrodos que permiten el paso de energía eléctrica, lo que provocará las descargas que permitan eyacular al animal (Yamasaki y col., 2005).

Es fácil de realizar, no requiere hembras en celo ni equipo para la monta y se lo puede realizar en campo abierto (Gómez, 2013).

A su vez permite incrementar la productividad de los machos, que se encuentran limitadas a la donación de semen de manera convencional, debido a factores anatómicos o de adiestramiento. Haciendo posible asegurar la conservación de los recursos genéticos y difusión de material genético de alto valor comercial. Además, reduce riesgos en la transmisión de enfermedades e incluso su aplicabilidad trasciende a los trabajos en investigación y recuperación de especies en peligro de extinción (Aliaga, 2006).

El semen emitido por electroeyaculador tiene distinta característica al recogido con vagina artificial, se describe mayor volumen, mayor contenido de fructosa, pH más elevado y menor concentración de espermatozoides, manteniendo la fertilidad (Durán del Campo 1980).

7.6.2. Métodos de inseminación artificial

La inseminación artificial (IA) es la introducción del semen en el tracto genital femenino por medios artificiales sin que se produzca la monta directa (coito) (Fernández Abella, 2015).

El semen es recolectado previamente, se recomienda su evaluación, aunque a nivel nacional los productores frecuentemente no disponen de las condiciones necesarias para efectuar el análisis del semen (Fernández Abella, 2015).

La IA incrementa notablemente el aprovechamiento de un reproductor al permitir obtener un gran número de crías del mismo padre. Esto es posible debido a que mediante un adecuado fraccionamiento del semen, se obtiene un número importante de dosis por eyaculado (Gibbons y Cueto, 1995).

El semen procedente de sementales valiosos se puede conservar para utilizarlo en años venideros, incluso después de muerto el animal. Algunos ganaderos criopreservan el semen de sus mejores sementales para prevenir las pérdidas por una muerte temprana de los mismos. Los bancos de semen se pueden utilizar para conservar semen control en los programas de selección a largo plazo, programando así su futuro uso. De esta forma los animales producidos después de varios años de selección se pueden comparar con los animales básicos utilizados como monitores de los progresos genéticos (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990; Chemineau y col., 1991; Hafez y Hafez, 2000).

Los carneros subfértiles pueden identificarse con facilidad y ser eliminados del grupo de sementales. La IA puede asegurar que se inseminen todas las hembras, evitándose así problemas relacionados con las preferencias macho-hembra que a menudo se manifiestan en algunos estros de hembras.

Se pueden realizar inseminaciones secuenciales, cubriéndose así las hembras que no presenten comportamiento estral (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990; Hafez y Hafez, 2000).

La IA elimina el contacto directo macho-hembra con lo que se controla o previene el propagar enfermedades venéreas u otras enfermedades. Es conveniente advertir que la IA es una medida profiláctica, pero no curativa, de la enfermedad (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990; Hafez y Hafez, 2000).

En muchas ocasiones machos de estimable valor no pueden ser utilizados para cubrir por sufrir lesiones o por razones de edad. Si su semen es de calidad suficiente con la IA se pueden seguir utilizando (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990; Hafez y Hafez, 2000).

La utilización de la IA permite mantener registros de reproducción muy seguros, los mismos permiten aumentar la correcta selección o eliminación de caracteres deseables o indeseables respectivamente en un rebaño (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990; Hafez y Hafez, 2000).

La inseminación de la oveja puede ser vaginal, cervical, transcervical o intrauterina, estos métodos difieren en cuanto a su complejidad y resultados, (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990; Mejía y Hernández, 1996; Del Pino, 2000; Hafez y Hafez, 2000).

Inseminación vaginal:

La inseminación vaginal es el método más simple y más rápido cuando se realiza con semen fresco diluido (Hafez y Hafez, 2000).

El semen se deposita en la cavidad vaginal sin utilizar vaginoscopio, se requiere gran cantidad de esperma, dosis dos a tres veces mayores que en los otros métodos, para aumentar la posibilidad de fecundación y es el método utilizado en aquellos casos donde no es posible la introducción de la cánula en el cérvix (Fernández Abella, 2003). Este método desvirtúa uno de los principales fines de la IA o sea el uso más eficiente del esperma eyaculado (Fernández Abella, 2015).

Inseminación cervical:

Es el método más comúnmente utilizado, se deposita el semen dentro de los primeros pliegues cervicales los cuales se visualizan con la ayuda de un espéculo con fuente de luz. Es barato y relativamente fácil, generalmente se utiliza con semen fresco, con o sin refrigeración (Gibbons y Cueto, 1995).

Los porcentajes de preñez logrados en inseminación cervical con semen fresco, y dosis de 100-150 millones de espermatozoides, varían entre el 60 y 70%, mientras que por medio de la utilización de semen congelado por esta vía los resultados varían entre el 20 y el 25% (Gibbons y Cueto, 1995).

Según Fernández Abella (2003), la dosis inseminante de semen fresco debe tener entre 80-100 millones y no ser menor a 60 millones de espermatozoides, mientras que la inseminación realizada con semen congelado debe superar los 250 millones de espermatozoides.

Con la utilización de semen congelado ha resultado en rangos poco aceptables de fertilización, pudiendo ser de hasta 10-30% en ovejas (Fernández Abella, 2015).

Para realizar la IA son necesarios dos tipos de materiales: unos encargados en depositar o dosificar el semen (pistola o jeringa) y otros de abrir paso a los primeros (vaginoscopia) (Fernández Abella, 2015).

El vaginoscopia que se usa normalmente consiste de un tubo de 18-20 cm de largo con el borde cortado en bisel y un diámetro mayor en su base (1,5 a 3 cm). El bisel permite introducir el vaginoscopia en la vagina de la oveja sin lesionar la mucosa. El mismo se podría lubricar con vaselina o aceite mineral e introducirse con movimientos giratorios en la vagina. Generalmente no sería necesario el uso de dichos lubricantes ya que la vagina se encuentra naturalmente lubricada por el propio mucus de la oveja en celo (Fernández Abella, 2015).

La pistola para inseminar consta de una cánula larga y mediante un émbolo accionado por una varilla dentada se pueden realizar dosis de hasta 0,01 ml (Fernández Abella, 2015).

La técnica del método cervical consiste en introducir el vaginoscopia con una mano, localizando el cuello del útero, mientras que con la otra se introduce la pistola dosificadora (multidosis) dentro del mismo, y este a su vez ayuda a retirar el mucus exterior y facilita la observación del orificio. En estos casos se levanta el tren posterior de la oveja y parte del mucus se retira utilizando el vaginoscopia como embudo. No debe retirarse todo el mucus ya que este facilita el transporte espermático (Fernández Abella, 2015).

Localizando el orificio se introduce la cánula hasta hacer tope y antes de depositar se retira la misma unos milímetros para facilitar la salida del esperma. Se retira el vaginoscopia unos centímetros para evitar que el contacto del mismo sobre la pared vaginal determine que el semen fluya hacia la vagina, lográndose con esa operación el plegamiento vaginal. Esta operación es muy importante, siendo generalmente olvidado por los inseminadores para acelerar su trabajo, perdiéndose gran parte del volumen de la dosis la cual queda en la vagina (Fernández Abella, 2015).

Una vez descargado el semen es conveniente que la hembra permanezca en un brete contiguo a los machos por un par de horas (Gibbons y Cueto, 1995).

Inseminación intrauterina o por laparoscopia:

Esta fue desarrollada en la década del '80 por investigadores australianos donde depositaron el semen descongelado directamente en la luz de los cuernos uterinos, permitiendo obtener porcentajes de preñez superiores al 50%. Esta técnica permite asimismo realizar un uso muy eficiente del semen. Al depositarse la dosis de inseminación en proximidad al lugar de fecundación, basta con disponer de un bajo número de espermatozoides por hembra inseminada. Esto posibilita obtener, mediante una adecuada dilución y fraccionamiento del semen, entre 60 y 100 dosis de 40 a 50 millones de espermatozoides por eyaculado (volumen de inseminación 0,25 mL (Gibbons y Cueto, 1993).

El semen se introduce en el cuerpo del útero, manteniéndose la capacidad fertilizante por 18-35 horas utilizando menor cantidad de espermatozoides. De las tres posibles técnicas, quirúrgica (laparotomía), intracervical y endoscópica (laparoscopia), ésta última es la más utilizada, con la cual se alcanzan resultados iguales o superiores a los obtenidos con el método cervical. Las técnicas intrauterinas utilizan 20 a 50 millones de espermatozoides con semen fresco y 50 a 100 millones con semen congelado, lo cual significa una enorme economía si comparamos con las cantidades necesarias por vía cervical. Tiene la desventaja del costo del equipo y la especialización necesaria de la persona que utiliza el laparoscopio (Fernández Abella, 2015).

La inseminación artificial laparoscópica (IAL) es una técnica que involucra una cirugía menor (Laparoscopia), donde el semen es depositado directamente dentro de la cavidad uterina (Dogan y col., 2004).

Se introduce en la cavidad abdominal un trocar de 7 mm y cánula a la izquierda de la línea media de la oveja y a unos 5 cm de la ubre, cuidando de no perforar las venas visibles a simple vista. Antes de introducir el trocar de 5 mm y cánula a la derecha de la línea media, es conveniente dejar ingresar aire dentro de la cavidad abdominal, lo que facilita la visualización de los órganos internos. Reemplazando el trocar de 7 mm por el laparoscopio, se examina la cavidad abdominal para la localización de los cuernos uterinos (Gibbons y Cueto, 1995).

La inseminación de la dosis seminal se realiza mediante inyección en el tercio medio y en dorsal del cuerno uterino, depositando la mitad de la dosis de semen. El semen debe fluir libremente hacia el interior del útero. A continuación, se repite la maniobra en el otro cuerno (Gibbons y Cueto, 1995).

El volumen de la dosis utilizado normalmente en inseminación laparoscópica es de 0.25 cc. El número de espermatozoides totales por dosis de inseminación varía entre 40 y 50 millones, obteniéndose tasas de preñez del 50 al 60% (Gibbons y Cueto, 1995).

Cuando se utiliza semen fresco con este método se logran fertilizaciones mayores del 80%, con semen congelado los rangos alcanzados van desde 50 hasta 80% de concepción (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990). La inseminación intrauterina por laparoscopia tiene su mayor utilidad en programas de transferencia de embriones, en donde la utilización de otras técnicas tiene algunas desventajas que son rebasadas por la deposición del semen intrauterinamente (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990; Mejía y Hernández, 1996; Ishwar y Momon, 1996; Jiménez y col., 2004; Quezada y Pérez., 2004).

7.6.3. Conservación del semen:

Semen refrigerado o enfriado:

La preservación a bajas temperaturas, 5 °C resulta adecuada para periodos entre 12 y 24 horas (Salamon y col., 1990). La fertilidad tras la IA declina en relación al tiempo de preservación del semen, siendo más marcado luego de las 24 horas de almacenamiento, debido a que los espermatozoides experimentan cambios que determinan una menor vida media (Maxwell y Watson, 1996).

El semen fresco debe utilizarse lo más rápido posible, manteniéndolo a temperatura ambiente (entre 20 y 30 grados) por no más de dos horas. Para conservarlo por más tiempo se lo debe diluir, entre los posibles diluyentes a utilizar, la leche descremada permite el almacenamiento del semen (10 a 15 grados) manteniendo una buena fertilidad durante 12 horas (Fernández Abella, 2003).

Si se desea conservar por más horas (hasta 2 días) se debe agregar yema de huevo a la leche a razón de 5 a 10 % del volumen total (Fernández Abella, 2003).

En ovinos, el semen debe diluirse en relación al tiempo de conservación, por ejemplo relaciones 1:2 (1 de semen: 2 de diluyente) o 1:3, cuando se conserva por menos de 24hs, relaciones de 1:4 a 1:5 cuando se conserva por más tiempo, mientras que diluciones mayores reducen la fertilidad (Fernández Abella, 2003).

La fertilidad obtenida con el semen refrigerado dependerá de la calidad del mismo y de las horas de conservación (Fernández Abella y col., 2015).

Semen congelado:

El objetivo principal de la criopreservación es el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular por un período prolongado de tiempo. Para lo cual, es necesario mantener el semen a temperaturas inferiores a -130°C para detener completamente los procesos metabólicos (Medeiros y col., 2002). La supervivencia a la congelación es el producto de numerosos factores que interaccionan entre sí (Boiso, 2001).

La criopreservación de cualquier material biológico se efectúa indispensablemente dentro de una solución que otorgue propiedades físico- químicas favorables para la sobrevivencia durante la congelación y descongelación (Vila, 1984).

Cuando la suspensión alcanza temperaturas entre -5 y -10°C se forman núcleos de hielo, que se distribuyen aleatoriamente en el medio extracelular. La membrana plasmática del espermatozoide constituye una barrera que detiene la formación de hielo dentro de la célula (Vila y García, 1983; Holt, 2000).

La cristalización en el medio extracelular da lugar a hielo puro, dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida. Este proceso recibe el nombre de crioconcentración. La fracción líquida se hace hipertónica y en respuesta a la diferencia de gradientes de concentración, la célula se deshidrata (Boiso, 2001).

El punto eutéctico refleja la máxima concentración de solutos que puede alcanzarse justo antes de que el agua y los solutos se solidifiquen conjuntamente (Grossmann y Santaló, 1991). Cuando la temperatura baja hasta alcanzar el punto eutéctico, la fracción no congelada y los solutos se solidifican (Vila y Carretero, 1985). Al ocurrir la cristalización, hay una liberación de energía en forma de calor latente de solidificación. Esto eleva transitoriamente la temperatura de la solución. Este proceso de aumento y disminución rápida de la temperatura es perjudicial para las células (Boiso, 2001).

La velocidad de congelamiento es un factor importante en la criopreservación. Cuando la velocidad de congelamiento es muy rápida, la célula no es capaz de deshidratarse lo suficiente (Boiso, 2001). Consecuentemente, se produce una inadecuada deshidratación y el agua que aún se encuentra en el interior de la célula forma cristales de hielo, que tienen un efecto letal para la célula (Mazur, 1984). Por el contrario, si la velocidad es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiendo llegar al colapso celular (Boiso, 2001). La deshidratación severa produce la desnaturalización de macromoléculas y una reducción excesiva del tamaño celular hasta el colapso irreversible de la membrana plasmática (Mazur, 1984).

La supervivencia celular será máxima a una velocidad de congelamiento adecuada, que es específica para cada tipo celular (Holt, 2000). La velocidad de congelamiento es de considerable importancia durante el “rango crítico de temperatura”, definido como el período donde ocurre la formación de cristales de hielo y la consecuente deshidratación celular (Kumar y col., 2003).

Durante los procesos de conservación, congelación y descongelación se observan alteraciones bioquímicas y anatómicas de las células espermáticas lo cual causan pérdidas en la capacidad fecundante de los espermatozoides (Fernández Abella, 2003).

Para lograr prolongar la vida de los espermatozoides se debe retardar o detener el metabolismo. Reducir la temperatura es la forma más común para lograr reducir el metabolismo (Ungerfeld, 2002).

La conservación del semen en nitrógeno líquido tiene como objetivo fundamental prolongar la viabilidad de los gametos masculinos de forma indefinida, ya que a temperatura ambiente o de refrigeración los espermatozoides degeneran con cierta rapidez, debido principalmente al agotamiento de las reservas energéticas (Hammerstedt y col., 1990).

Existen diversos protocolos para congelar semen, uno de los más difundidos es la dilución en un paso. Este tipo de protocolo implica el agregado de un único diluyente hasta lograr la concentración espermática necesaria, para luego seguir con el enfriado a 5°C en 1,5 a 2 horas, sucediéndose la equilibración en ese plazo, luego el envasado y el congelado (Ungerfeld, 2002).

En otros parte del diluyente se agrega a 30°C (diluyente 1) y el resto a 5°C (diluyente 2) (dos pasos). Se debe realizar periodos de equilibrio luego del agregado de un diluyente, normalmente estos duran entre 90 y 120 minutos (Fernández Abella, 2015).

7.6.4. Diluyentes:

El semen obtenido debe ser mezclado con sustancias líquidas llamadas diluyentes, con la finalidad de aumentar el volumen del eyaculado e incrementar el número de dosis y sacar un máximo provecho a la capacidad reproductora del macho (Bearden y Fuquay., 1982; Hafez, 2000).

Los diluyentes son compuestos químicos, o conjunto de sustancias que preservan la viabilidad y fertilidad del semen (Cavestany, 1994).

Estos deben de ser isotónico con respecto al semen, tener capacidad buffer el pH de la fracción rica del semen es de 6,8 a 7,4 los espermatozoides y las bacterias producen algunos metabolitos como el ácido láctico, por lo que las sustancias buffer son

necesarias en la preservación del semen, proteger a los espermatozoides durante el enfriamiento desde temperatura corporal a 5° C, proveer una adecuada combinación de nutrientes para los espermatozoides. La mayoría contiene glucosa como principal fuente de energía, otras fuentes utilizadas son galactosa, fructosa, ribosa y trehalosa. Deben estar libres de microorganismos infecciosos y contener electrolitos para regular la presión osmótica, para esto se utilizan sales como NaCl y KCl (Hafez, 2000)

Además deben tener agentes protectores para las membranas celulares, durante el enfriamiento a 5°C se utiliza yema de huevo y en el congelamiento se utiliza glicerol (Hafez, 2000).

Clases de diluyentes:

Diluyentes naturales:

Salamón y Maxwell (2000), reporta que en ambientes de campo el diluyente del semen más fácilmente aceptable es la leche bovina, que se puede utilizar tanto entera, como descremada o en polvo siempre que se vaya a proceder a la IA cervical o vaginal.

Se utiliza también leche tratada a altas temperaturas (UHT), que tiene la propiedad de conservarse mejor. Si se utiliza leche entera, descremada o en polvo se debe calentar a 92-95 °C, en baño de agua María, durante 8-10 minutos, para inactivar los factores tóxicos de su función proteica (Laing y col, 1990).

Diluyentes sintéticos:

Los diluyentes sintéticos son ampliamente utilizados en la dilución del semen de carnero, contienen como amortiguador tris o citrato, glucosa o fructosa como fuente de energía y yema de huevo para proteger la membrana del espermatozoide contra el shock por frío (Fernández y col., 2001).

7.6.5. Empaquetado del semen

El semen puede congelarse en pastillas (pellets, píldoras) o en pajuelas. Desde el punto de vista práctico la congelación de pajuelas presenta ciertas ventajas; tales como ser homogéneas al proveer mayor superficie de contacto al frío, mayor higiene y mejor identificación del semen (Fernández Abella, 2015).

Existen varios tipos de pajuelas:

-La francesa en 3 tamaños, utilizándose actualmente la mediana (0,50 mL) y la fina (0.25 mL). Ambas presentan un largo de 133 mm y un diámetro de 2 a 1 mm respectivamente (Fernández Abella, 2015).

-La alemana de 0,30 mL con un largo de 65 mm y un diámetro de 2,8 mm (Fernández Abella, 2015).

-La americana en 3 volúmenes 0,50; 0,30 y 0,25 mL con diferentes diámetros respectivamente (Fernández Abella, 2015).

Las pajuelas luego del llenado son selladas con alcohol polivinílico tamizado o por medio de un tapón con soldadura térmica o a presión (Fernández Abella, 2015).

7.6.6. Descongelación del semen

Otro aspecto importante que incide sobre la viabilidad de las células espermáticas congeladas es la velocidad de descongelación (Bank y Brockbank, 1987).

La velocidad óptima de descongelación depende en gran medida de la técnica aplicada para la congelación (Robbins y col., 1976; Fiser y Fairfull., 1986). Cuando se utilizan velocidades de congelación altas los mejores resultados post-descongelación han sido obtenidos con descongelaciones también rápidas (Fiser y Fairfull., 1986). Por el contrario, si la congelación se realiza con velocidades lentas y la descongelación es rápida, no se concede a la célula espermática el tiempo suficiente para que restablezca el equilibrio osmótico con el medio externo (Leibo, 1981), originándose la entrada de agua al interior del espermatozoide, provocando la ruptura de estructuras celulares (Mazur, 1980; Fiser y Fairfull., 1986).

Finalmente, el descongelamiento del semen es tan importante como el congelamiento, porque los espermatozoides tienen que atravesar nuevamente el “rango crítico de temperatura” (Salamon y Maxwell, 2000). El descongelamiento rápido es necesario para prevenir la recristalización de cualquier cristal de hielo intracelular presente en el espermatozoide. En la mayoría de trabajos, la descongelación de pajuelas de semen ovino se ha realizado en baño maría a 37- 50°C durante algunos segundos hasta 5 minutos (Fiser y Fairfull., 1986; Molinia y col., 1994a, 1994b; Aisen y col., 2000; Gil y col., 2000; El-Alamy y Foote, 2001; Gil y col., 2003b; Kumar y col., 2003).

7.6.7. Evaluación Seminal

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 así 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).

La evaluación del semen para su conservación es una condición fundamental, reduciendo las pérdidas espermáticas producto de la congelación y descongelación del mismo (Fernández abella, 2015).

El semen está constituido por dos partes: Las células espermáticas o espermatozoides y el plasma seminal o espermático, este es resultado de los productos secretados por las glándulas anexas (vesículas seminales, uretrales o de littré, bulbouretrales o de Cowper y la próstata) (Fernández abella, 2015).

En el semen del carnero la relación plasma seminal/espermatozoides es de 75/25, pudiendo alcanzar valores del 95% del primero (95/5) especialmente cuando el semen se obtiene por electroeyaculación. Por medio de la centrifugación a 2000 r.p.m durante 10 minutos se pueden separar los dos componentes del semen quedando las células espermáticas en la parte inferior (Fernández abella, 2015).

Los métodos de evaluación del semen se pueden clasificar en:

1. Pruebas macroscópicas; volumen, color, olor, movilidad en masa, pH.
2. Pruebas microscópicas; concentración, motilidad, morfología, porcentaje de espermatozoides vivos o muertos.
3. Pruebas biológicas; porcentaje de preñez, resistencia del espermatozoide, viabilidad.
4. Pruebas bioquímicas; coeficiente respiratorio, índice de fructólisis, poder deshidrogenante y acidez.

-Pruebas macroscópicas:

Volumen

Se puede evaluar en la misma copa o tubo graduado, resultando normalmente 0,8 a 1,2 mL., dependiendo de la excitación del carnero, edad, tipo de vagina, habilidad del operador, entre otros. Fundamentalmente del volumen testicular (Durán del campo, 1980).

Color

El semen deberá ser blanco-cremoso; la disminución de la concentración transformará el color y aspecto y la azoospermia lo hará casi incoloro (Durán del campo, 1980).

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

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

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

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 de ser inodoro salvo la presencia de algún foco infeccioso (Fernández Abella, 2015).

Movilidad en masa

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).

Cuadro 2. Grados de movilidad en masa e individual

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

Fuente: Moule, 1970.

pH

El valor normal en un carnero es de 6.8, pudiendo disminuir en caso de gran concentración, o virar hacia la alcalinidad en muestras poco concentradas (Durán del Campo, 1980).

La toma del pH es muy sencilla y puede practicarse en el medio rural, usando como reactivo papeles especiales que cambian de color según la acidez del medio (Durán del Campo, 1980).

-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 termostatzada 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 presentan un movimiento progresivo o normal, ya que esto determina que el espermatozoide avance y pueda fecundar (Fernández Abella, 2015).

Movilidad

A nivel de microscopio debemos evaluar el tipo de desplazamiento- lento, oscilante, en retroceso, vibratorios, entre otros.

Concentración

Cantidad de espermatozoides por unidad de volumen, en un carnero se encuentra entre 2000 y 4000 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/ mL) 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).

Morfología

Su estudio es importante toda vez que la apariencia del semen no sea buena; el porcentaje de células anormales está estrictamente relacionado a la fertilidad (Durán del Campo, 1980).

Un eyaculado con un porcentaje de anormalidades superior a 20% debería eliminarse, excepto que predominen las anormalidades 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 (Fernández Abella, 2003).

Vitalidad

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

-Pruebas Bioquímicas:

Generalmente son test de laboratorios (Fernández Abella, 2003).

Coeficiente respiratorio

Mide el aumento de cantidad de fructosa que se gasta como consecuencia de la actividad espermática (Durán del Campo, 1980).

Test de deshidrogenación o del azul de metileno

La prueba se basa en la actividad catalizadora de ciertas enzimas-deshidrogenasas-existent en el citoplasma de las células vivas- incluido espermatozoides-que provocan liberación de hidrógeno. El tiempo que emplea una muestra de semen a temperatura homogénea para decolorar el azul, da una cifra que indica la actividad de los espermatozoides (Durán del Campo, 1980).

7.6.8 Índice de calidad espermática, ICE.

El ICE, 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:

$$\text{ICE} = (\text{motilidad masal} + \% \text{ spz vivos} + \% \text{ spz normales} + \text{concentración})/4$$

Los tres últimos componentes son llevados a una escala de 0 a 5 según el criterio que se puede observar en el cuadro 3.

Cuadro 3. Escala de componentes que conforman el índice de calidad espermática (I.C.E.).

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

Fuente: Fernández Abella y col, 2003.

7.7. Sistema CASA:

Con la idea de estandarizar y corregir los problemas de la subjetividad y de la variabilidad de algunos de los parámetros convencionales del seminograma clásico se empezó a investigar la forma de automatizar y estandarizar el análisis del movimiento espermático mediante el uso de sistemas informáticos. El sistema Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) combina una cámara termostáticamente controlada, denominada cámara de Makler, en la cual se deposita una alícuota de semen y se mantiene la temperatura (37°C) durante el examen. Por otra parte, posee un sistema óptico con iluminación de contraste de fase, un detector de imágenes, un sistema de computación y un monitor de video. Este sistema permite calcular el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y la velocidad de movimiento (Brogliatti, 2008).

La aparición de los sistemas informatizados de digitalización de imágenes, tales como el sistema CASA, abrió un nuevo campo en el estudio de la motilidad de los espermatozoides. Estos sistemas han automatizado y simplificado el proceso. Las imágenes obtenidas permiten evaluar varios parámetros, incluyendo la concentración, morfología y movimiento espermático. El sistema CASA establece, de una manera efectiva, medidas cuantitativas del movimiento individual de los espermatozoides, por lo que con este tipo de análisis se pueden obtener medidas correctas de la motilidad espermática que proporcionen información precisa acerca del estado funcional del axonema y de las membranas espermáticas (Mortimer, 2004).

Estimar la capacidad fecundante de las muestras seminales es sumamente importante, para ello Graham y Mocé (2005), sugieren el uso de equipos como el sistema CASA, ya que proporciona datos más precisos y objetivos sobre las muestras.

El software que contiene el CASA, identifica y mide automáticamente los parámetros de los movimientos de los espermatozoides en campos microscópicos capturados con objetivo 10X y contraste de fase negativa. También calcula porcentaje y concentración espermática de la muestra seminal. Los resultados del análisis incluyen los parámetros de: Velocidad curvilínea (VCL), Velocidad media (VAP), Velocidad rectilínea (VSL), Índice de rectitud (STR), Índice de linealidad (LIN), entre otros. El tiempo de análisis es de 1 segundo por campo (Bernardi y col., 2011).

- 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 (Quintero-Moreno y col., 2003).

- 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 primero y el último punto de la trayectoria y da el espacio recorrido en el período de observación. Es siempre el menor de los tres parámetros de velocidad en cualquier espermatozoide (Quintero-Moreno y col., 2003).

- 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 (Quintero-Moreno y col., 2003).

- 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) $\rightarrow (VSL / VCL) \times 100$ (Quintero-Moreno y col., 2003).
- 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) $\rightarrow (VSL / VAP) \times 100$ (Quintero-Moreno y col., 2003).

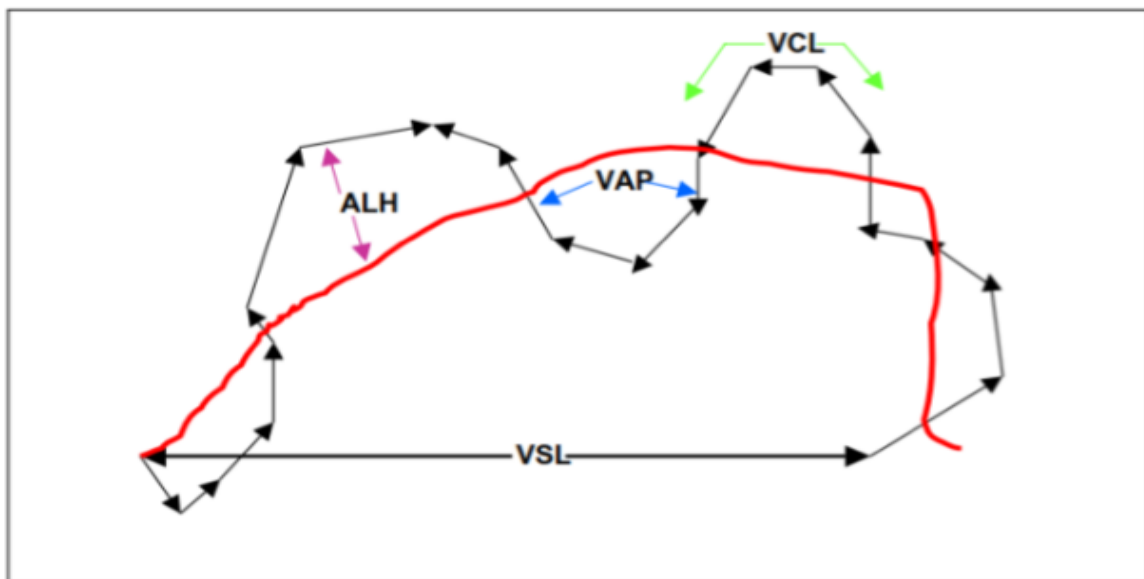


Figura 1. Parámetros de motilidad obtenidos por el C.A.S.A.

Fuente: Quintero-Moreno y col., 2003.

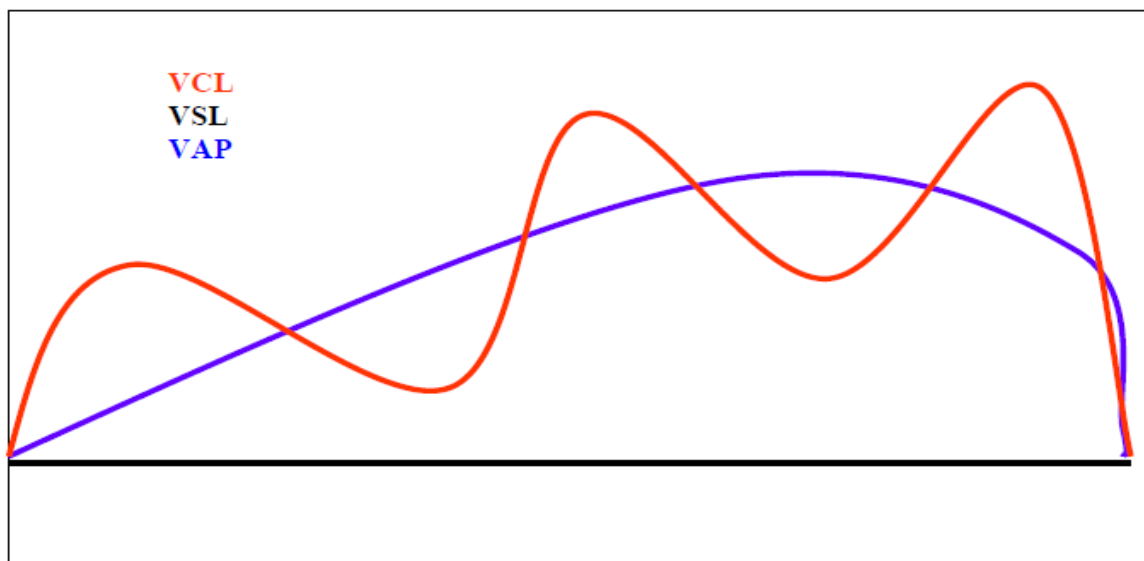


Figura 2. Parámetros de motilidad obtenidos por el C.A.S.A.

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 sea largo, ya que se producen cambios en los espermatozoides que afectan la movilidad. También 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 llevaría a un error en los resultados. Luego de depositar la muestra en un portaobjetos 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 (ISASv1®).

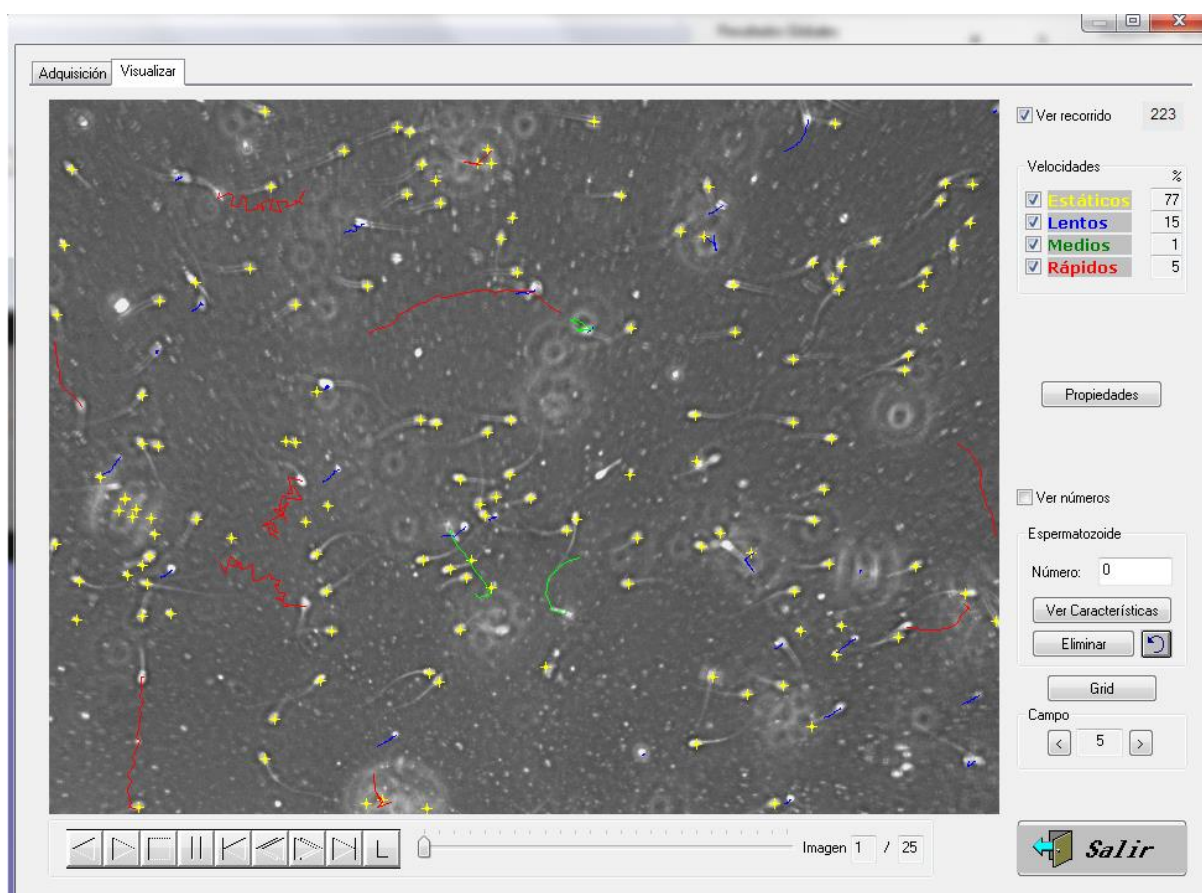


Figura 3. Visualización de un campo en el módulo de motilidad del sistema

ISASv 1® Fuente: Equipo Laboratorio PDU Rumiantes, CENUR Litoral Norte, Salto

Para evaluar la concentración es necesario homogeneizar y fijar la muestra. Los espermatozoides deben ser inmovilizados mediante una fijación química para obtener un recuento correcto. Para ello se utiliza una solución conteniendo 50 g de NaHCO_3 , 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 la cámara de Makler con una alícuota de la muestra fijada utilizando una micropipeta. Después se deja reposar 5 minutos para obtener la sedimentación celular y tener todos los espermatozoides en el mismo plano focal. Luego se capturan y analizan 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 (ISASv1®).

Sin embargo, el sistema CASA es costoso y necesita una exacta calibración. Si bien, la motilidad es solo uno de los muchos atributos de un espermatozoide fértil, fue el primer atributo utilizado y sigue siendo el más frecuentemente usado como indicador de la función espermática (Stornelli y De la Sota, 2005).

7.7.1. Estandarización del sistema:

A pesar de sus ventajas, como la objetividad mostrada por estos sistemas, algunos autores han advertido sobre el mal uso de los resultados obtenidos por los sistemas CASA (Katkov y Lulat, 2000). Por otra parte, debemos tener en cuenta que tanto el hardware como el software empleados para la identificación y determinación del desplazamiento de los espermatozoides individuales, junto con el análisis de las características del movimiento, difieren entre los sistemas comercialmente disponibles. Esto, unido al patrón de movimiento específico que presenta el espermatozoide de cada especie estudiada, hace especialmente importante la estandarización del sistema y las condiciones de trabajo, pilar fundamental en la obtención de resultados repetibles y comparables con los obtenidos por otros laboratorios (Eshre, 1998; Verstegen y col., 2002).

Es sumamente importante realizar una dilución previa de las muestras de espermatozoide tomando en cuenta la concentración, con diluyentes que no alteren las características cinéticas del espermatozoide (Vantman y col., 1988; Farrell y col., 1998; Maxwell y Johnson, 1999).

En este sentido, cabe destacar que estudios previos han demostrado que la composición del diluyente de espermatozoide empleado y el grado de dilución pueden influir en los resultados obtenidos con los sistemas CASA (Farrell y col., 1996; Mortimer y Maxwell, 2004). Por otra parte, otros autores han demostrado la influencia de la temperatura de análisis (Davis y col., 1995), el tipo de cámara (Verstegen y col., 2002) o el número de espermatozoides capturados en cada muestra (Jasko y col., 1990; Varner y col., 1991), entre otros factores.

No menos importante en la determinación correcta del movimiento espermático, siendo el propio sistema CASA, el que debe procesar los datos de forma precisa. Para tal fin, estudios previos han demostrado que es imprescindible la estandarización del sistema, a través de la configuración del software mediante un “set up” específico para cada especie. Así, podemos seleccionar la frecuencia y el número de fotogramas (frames) a capturar (Mortimer y Maxwell., 2004; Wilson-Leedy y Ingermann, 2007), parámetros específicos de la especie a estudiar (Verstegen y col., 2002). A este respecto, el uso de ajustes del análisis inadecuados podría dar lugar a cambios en el cálculo de las variables cinéticas (Davis y col., 1995; Mortimer y Maxwell., 2004; Verstegen y col., 2002), obteniéndose así resultados erróneos en aquellos parámetros cinéticos más relacionado con la fertilidad (Anel, 1999).

7.7.2. Determinación de Subpoblaciones Espermáticas:

El uso del sistema CASA ha sido una herramienta en la investigación de las subpoblaciones espermáticas en diferentes especies. El establecimiento de estas se ha hecho con base a una serie de datos objetivos proporcionados por este sistema. El porcentaje de células móviles presentes en la muestra y la calidad media de ese movimiento, permiten identificar la existencia de subpoblaciones de espermatozoides, con distintos patrones de movimiento, que coexisten en la misma muestra de semen, lo cual es una visión más real, ya que una muestra de semen es una población heterogénea con distribución normal (Muiño y col., 2006).

Los eyaculados de la mayoría de los mamíferos son conocidos por presentar un grado de heterogeneidad elevado (Dorado y col., 2010), lo que significa que espermatozoides con diferentes cualidades coexisten en un mismo eyaculado (Chantler y col., 2004).

Respecto a la identificación de subpoblaciones cinéticas, es necesario el análisis objetivo y preciso del movimiento, el cual no fue posible hasta el desarrollo de los sistemas CASA (Boyers y col., 1989). Estos sistemas permiten identificar a los espermatozoides de una manera individual por sus características cinéticas (Wilson-Leedy y Ingermann, 2007). El uso de estos sistemas junto al análisis estadístico multivariante han demostrado la existencia de subpoblaciones cinéticas en eyaculados de diferentes especies, como el titi (Holt y col., 1996), la gacela (Abaigar y col., 1997; Abaigar y col., 2001), el caballo (Quintero- Morenoy col., 2003), el asno (Miró y col., 2005; Álvarez y col., 2008; Flores I y col., 2008; Dorado y col., 2013) el cerdo (Abaigar y col., 1999; Quintero-Moreno y col., 2004; Cremades y col., 2005; Rivera y col., 2005; Rivera y col., 2006), el perro (Núñez-Martínez y col., 2006a; Núñez-Martínez y col., 2006b; Dorado y col., 2011a; Dorado y col., 2011b), el conejo (Quintero-Moreno y col., 2007) y el macho cabrío (Dorado y col., 2009), empleando diferentes sistemas CASA y análisis estadísticos (Martínez-Pastor y col., 2011)

Algunos autores han propuesto que las diferentes características cinéticas influyen en cierto grado en la calidad espermática. Por lo tanto Martínez-Pastor y col (2005) sugieren que las subpoblaciones compuestas por espermatozoides más rápidos y lineales son los que presentan mayor calidad de movimiento, mientras que Dorado y col (2009) consideran que la subpoblación que muestra un movimiento más lento y menos lineal podría significar que presentan algún tipo de compromiso metabólico. También se ha descrito que determinadas subpoblaciones están relacionadas con la mayor resistencia a la crioconservación (Martínez-Pastor y col., 2005; Muiño y col., 2008) o con la fertilidad (Quintero-Moreno y col., 2003; Quintero-Moreno y col., 2004).

Por otro lado, se ha demostrado que ciertos factores influyen en las proporciones de las distintas subpoblaciones como: la especie, el individuo e incluso el eyaculado de un mismo individuo son los más influyentes, como lo demuestran multitud de estudios realizados en diferentes especies, como el cerdo (Cremades y col., 2005), el toro (Muiño y col., 2009;), el asno (Miró y col., 2005; Dorado y col., 2013), el caballo (Abaigar y col., 1999), la gacela (Abaigar y col., 2001), el perro (Núñez-Martínez y col., 2006b; Dorado y col., 2011b) o el macho cabrío. Otro de los factores influyentes en la estructura sub poblacional de un eyaculado es la calidad seminal de la muestra (Dorado y col., 2009; Miró y col., 2005; Quintero-Moreno y col., 2007; Rivera y col., 2006) o la raza (Quintero-Moreno y col., 2007).

8. HIPÓTESIS:

El semen ovino es altamente susceptible a los cambios de temperatura durante su manipulación en el proceso de congelamiento.

9. OBJETIVOS:

9.1 Objetivo general:

- Evaluar el impacto de modificaciones en los protocolos de congelamiento sobre la calidad del semen ovino, en machos Merino Australiano de la categoría dos dientes.

9.2 Objetivos específicos:

- Evaluar diferentes momentos de empaquetado del semen ovino, pre y pos equilibramiento.
- Evaluar efecto temperatura al hacer el empaquetamiento (20.0°C, 4.0°C y 7.8°C). utilizando para ello los indicadores de motilidad (velocidad de movimiento, tipo de movimiento) y concentración, post descongelamiento, en equipo CASA.
- Evaluar las subpoblaciones espermáticas en las muestras post descongelamiento, en cada tratamiento a través de los parámetros cinéticos determinadas en el equipo CASA.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1. Localización del ensayo:

El ensayo se llevó a cabo en el mes de Marzo del año 2018 en la región Norte del país, en la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía (EEFAS), situada a 21,5 km de la ciudad de Salto sobre la ruta 31. Latitud: 31° 23' S; Longitud: 57° 57' W. Tipo de suelo basalto superficial.

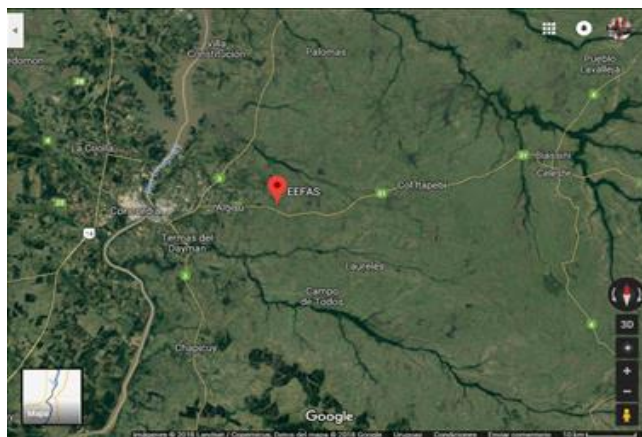


Figura 4. Ubicación geográfica EEFAS en el departamento de Salto.

Fuente: Google Maps.

10.2. Ensayo de campo:

Los animales utilizados pertenecen al 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° 31 km 29, departamento de Salto. Latitud 31°23'18.82"S, longitud 57°38'12.05"O.



Figura 5. Ubicación del establecimiento “El Totoral” en el departamento de Salto

Fuente: Google Earth.

Animales:

Los animales utilizados fueron machos Merino Australiano de la categoría 2 dientes, que pastoreaban sobre campo natural y suplementados desde el día 29/01/2018 con 300 g por animal/día de ración a base de cebada, avena y sorgo.

En los días 0 (01/02/2018), 1 (02/02/2018), 4 (05/02/2018)

Se evaluaron 15 animales, los cuales fueron sometidos a examen andrológico completo, determinación de condición corporal (CC), (escala de 1 a 5; Jefferies, 1961), edad, peso vivo (PV), medida de circunferencia escrotal (CE) utilizando un escrotómetro de cinta metálica (0,1 cm de precisión, Rojas y col., 2008). De estos se descartaron dos animales, uno presentaba Hipospadia y el otro rotación del testículo izquierdo en sentido anti horario.

Para cada una de estas variables se fijaron valores mínimos, por debajo de los cuales el animal sería descartado. Los mismos fueron 2.5, 35 kg y 22 cm, para CC, PV, CE respectivamente.

A los 13 animales restantes se les extrajo muestras de semen con electroeyaculador Electrojac 5®, el mismo se utilizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Manual Electrojac 5®, 2011). A todos los animales se les aplicó 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.

Las muestras de semen fueron evaluadas en forma manual a campo, macroscópicamente: color, olor, consistencia, volumen, movimiento masal, microscópicamente: motilidad individual, concentración (Fernández Abella, 2015). A nivel de laboratorio se determinaron concentración, porcentajes de vivos y porcentajes de normales (morfología), estas variables se utilizaron para el cálculo del ICE conjuntamente con la motilidad masal (Fernández Abella y col., 1993). Para este índice se fijó como límite inferior 3.0 por debajo del cual el animal sería rechazado.

Una alícuota de dichas muestras se procesó en el sistema computarizado de análisis de semen ISASv1® en módulo de concentración y motilidad siguiendo instrucciones del fabricante (Manual ISASv1®, 2015). Las variables que se determinaron fueron las siguientes: concentración (millones espermatozoides/ ml), tipo de movimiento (estático, progresivo y no progresivo), velocidad de movimiento (estáticos, lentos y rápidos) y diferentes variables cinéticas en cada grupo de espermatozoides según tipo y velocidad de movimiento, VCL, VSL, VAP.

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).

De los 13 carneros evaluados, 4 fueron descartados por la baja concentración de espermatozoides o la presencia de sangre u orina en el semen. De los 9 restantes, dos se descartaron por presentar bajo ICE (<3.0). El grupo seleccionado de 7 carneros presentaba valores de ICE entre 3.0 y 4.0.

Asimismo, de este grupo se utilizaron 6 animales y se reservó uno como suplente. Se seleccionó la categoría dos dientes a solicitud del establecimiento comercial donde se realizó el ensayo a campo, el mismo tiene como principal rubro la comercialización de reproductores por lo que se plantea el desafío de seleccionarlos en forma temprana y en consecuencia obtener prontamente rédito a su valor genético.

Manejo sanitario:

A la totalidad de los machos utilizados en este ensayo se les realizó previo al inicio 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. En base a los resultados obtenidos el establecimiento dosificó con 10 mg/ kg vía oral de Closantel (Saguicid C- L 10%®, Laboratorio Dispert, Montevideo, Uruguay) el 24/01/18. Asimismo, todos los animales fueron vacunados contra clostridiosis y carbunco en dicha fecha.

Día 46 (17/03/2018)

A seis de los animales seleccionados se les extrajo semen, se valoró según lo descrito anteriormente el mismo para cada uno de ellos, se realizó un pool para eliminar factor individual (Paulenz y col., 2002).

Se utilizó como diluyente:

- 3 partes de agua destilada
- 1 parte de Triladyl® (trimetilaminometano, antibiótico y glicerol)
- 1 parte de yema de huevo de gallina.

El pool de semen se diluyó al tercio utilizando dicho diluyente, se determinó la concentración en el mismo y se procedió a realizar la dilución final tal que se obtuvieron 60 millones de espermatozoides /pajuela.

A 35°C, el pool se dividió en 4 partes iguales, y cada una de ellas se procesó como se describe a continuación nombrándolos T1, T2, T3 y T4. Se utilizó pajuelas de diferentes colores para facilitar la identificación.

T1. Temperatura a 20,0 °C (pajuelas color amarillo)

T2. Temperatura a 4,0 °C (pajuelas color transparente)

T3. Temperatura a 4,0 °C (pajuelas color rojo)

T4. Temperatura a 7,8 °C (pajuelas color verde)

La temperatura fue determinada con termocupla.

Las pajuelas correspondientes a T1 y T2 fueron llenadas a temperatura ambiente controlada, 20,0°C y 4,0°C respectivamente, mediante el uso de aire acondicionado y cámara fría para mantener dichas temperaturas. Se dejaron en reposo horizontalmente durante 15 minutos a la temperatura antes indicada en cada tratamiento y posteriormente fueron equilibradas a 4,0°C durante 90 minutos, para finalmente proceder al congelamiento de las mismas.

Las dos alícuotas restantes del pool, se equilibraron en tubo de vidrio descendiendo la temperatura hasta 4,0°C durante 90 minutos, luego se procedió al empaquetamiento

T3 a 4,0° C en cámara fría y T4 a 7,8°C en nevera, dejando estabilizar durante 15 minutos a 4,0°C para finalizar congelamiento de las mismas.

Todas las pajuelas fueron selladas con alcohol polivinílico y los cuatro tratamientos se congelaron en una sola partida de acuerdo a Fernández Abella, 2015.

10.3. Manejo y análisis del semen:

El semen congelado se almacenó en tanques de nitrógeno líquido, se procedió luego a su evaluación en el Laboratorio del PDU de Rumiantes, Regional Norte Salto.

Se evaluó en cada pajuela motilidad y concentración respetando este orden. El protocolo de descongelación fue realizado según Fernández Abella, 2015).

Se descongelaron 6 pajuelas por tratamiento y se evaluaron en equipo automatizado CASA en los módulos de motilidad y concentración.

Los parámetros cinéticos fueron utilizados para analizar subpoblaciones espermáticas en las muestras, siendo de especial interés los espermatozoides móviles, rápidos y progresivos, obtenidos en cada tratamiento.

Para el análisis de motilidad, se realizó dilución 1:10 con suero fisiológico previamente termostatzado a 37°C, para luego proceder según manual ISASv1® del CASA.

Las variables analizadas fueron:

1. Tipo de movimiento Estáticos
2. Tipo de movimiento Móviles no progresivos
3. Tipo de movimiento Móviles progresivos
4. Velocidad de movimiento Rápidos Progresivos
5. Velocidad de movimiento Rápidos
6. Velocidad de movimiento Lentos
7. Velocidad curvilínea (VCL)
8. Velocidad rectilínea (VSL)
9. Velocidad promedio (VAP)

Para el análisis de concentración las muestras fueron diluidas 1:10 en solución de fijación de semen conteniendo 50g de NaHCO₃, 10 mL de formol al 35% (v/v) y agua destilada cantidad suficiente para un volumen de 1000 mL. Luego se procedió según manual ISASv1® del CASA, utilizando cámara de Makler.

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®.

Según el manual ISASv1® los espermatozoides se clasifican en base a dos criterios:

1. Tipo de movimiento: estáticos, no progresivos y progresivos
2. Velocidad de movimiento: estáticos, lentos, medios y rápidos (µm/s).

Los valores límites para la clasificación de tipo de movimiento y velocidad de movimiento se muestran en la figura 6 a continuación. Los mismos son los sugeridos por el sistema ISASv 1®.

Configuración del Sistema

Datos Usuario

Usuario: ssterla

Password:

Directorio: C:\Users\operador\Desktop

Captura

Número de imágenes: 25

Imágenes por segundo: 25

Óptica: Ph-

Cámara: Cubre

Escala: 10xUB200i

Valores del Analisis

Especie: Morrueco

10 < Área de las partículas < 70
(en micras²)

VCL VAP

10 < lentos < 45 < medios < 75 < rápidos
(micras/sg)

Progresivos: 80 % de su STR

Conectividad: 12 mín núm imágenes para calcular ALH: 10

☒ Advanced Tail Analysis

Restricciones: Datos Informe

Guardar Cancelar Predeterminado

Figura 6. Datos de configuración del sistema ISASv 1®.

Fuente: Equipo Laboratorio PDU Rumiantes, CENUR Litoral Norte, Salto.

10.4. Análisis Estadístico:

Animales

Se realizó un análisis de valores atípicos para las variables de caracterización de los carneros seleccionados.

Concentración

Se aplicó la prueba Kolmogorov- Smirnov (K-S) para contrastar si las concentraciones registradas en las diferentes pajuelas seguían la misma distribución para los diferentes tratamientos.

Motilidad

Se llevaron a cabo pruebas de igualdad de distribución de KS con el fin de detectar diferencias significativas en la proporción de espermatozoides con tipo de movimiento estático/no progresivo/progresivo y velocidad estático/lento/medio/rápido entre los tratamientos T1, T2, T3 y T4.

La prueba K-S plantea como hipótesis nula que dos muestras provienen de la misma distribución respecto a determinada variable y como hipótesis alternativa que las distribuciones son diferentes. En todos los casos se consideró un nivel de significación $\alpha=0,05$ (nivel de confianza 95%). El criterio de decisión implica que se rechace la hipótesis nula en todos los casos donde el p-valor obtenido de la prueba sea menor a α .

Parámetros de Velocidades

Estos parámetros son: Velocidad curvilínea (VCL), Velocidad rectilínea (VSL), Velocidad media (VAP).

Se llevó a cabo un análisis de datos atípicos para determinar si existían pajuelas que mostraban valores significativamente apartados de los valores registrados para el resto de las pajuelas del mismo tratamiento, para determinadas variables. Las variables consideradas fueron VCL, VSL y VAP, comparando las medias registradas en las diferentes pajuelas.

El criterio estadístico utilizado para clasificar una observación como valor atípico consiste en verificar si la misma se encuentra a una distancia mayor a 1,5 veces el rango intercuartílico por debajo del primer cuartil o por encima del tercer cuartil de la distribución.

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado se diseñaron pruebas de igualdad de distribución de K-S para determinar si existían diferencias en la distribución de las variables VCL, VSL y VAP entre las pajuelas, ya sea dentro de un mismo tratamiento o entre diferentes tratamientos, excluyendo las pajuelas con valores atípicos.

Siempre que el p-valor obtenido sea inferior al nivel de significación de la prueba ($\alpha=0,05$) se rechaza la hipótesis de igualdad de distribución.

11. RESULTADOS

11.1. Selección de Animales:

Se realizó un análisis de valores atípicos para las variables de caracterización de los carneros seleccionados. Únicamente fue clasificado como valor atípico, en comparación con el resto de los valores de la misma variable, el registro de CC del carnero (9952). Podemos considerar por lo tanto este grupo de carneros seleccionados un grupo homogéneo.

Cuadro 4: Variables de caracterización de los carneros seleccionados, peso vivo (PV), dentición (D), circunferencia escrotal (CE), condición corporal (CC) e índice de calidad espermática (ICE)

Identificación	PV	D	CE	CC	ICE
5	35	2	24,5	2,5	3,5
6	47	2	31	2,5	3,5
10	39	2	26	2,5	3,25
9959	44	2	30,5	2,5	4
9952	44	2	31,5	3,75	3,5
9995	37,5	2	27,5	2,5	4

11.2. Concentración:

Se implementó la prueba de Kolmogorov- Smirnov para el estudio de la distribución de la variable concentración entre tratamientos, no detectándose diferencias significativas en la misma ($p>0,05$).

Cuadro 5: p-valor de prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución para concentración de espermatozoides entre tratamientos.

	T1	T2	T3	T4
T1	1,000	1,000	0,474	0,474
T2		1,000	0,474	0,143
T3			1,000	0,474
T4				1,000

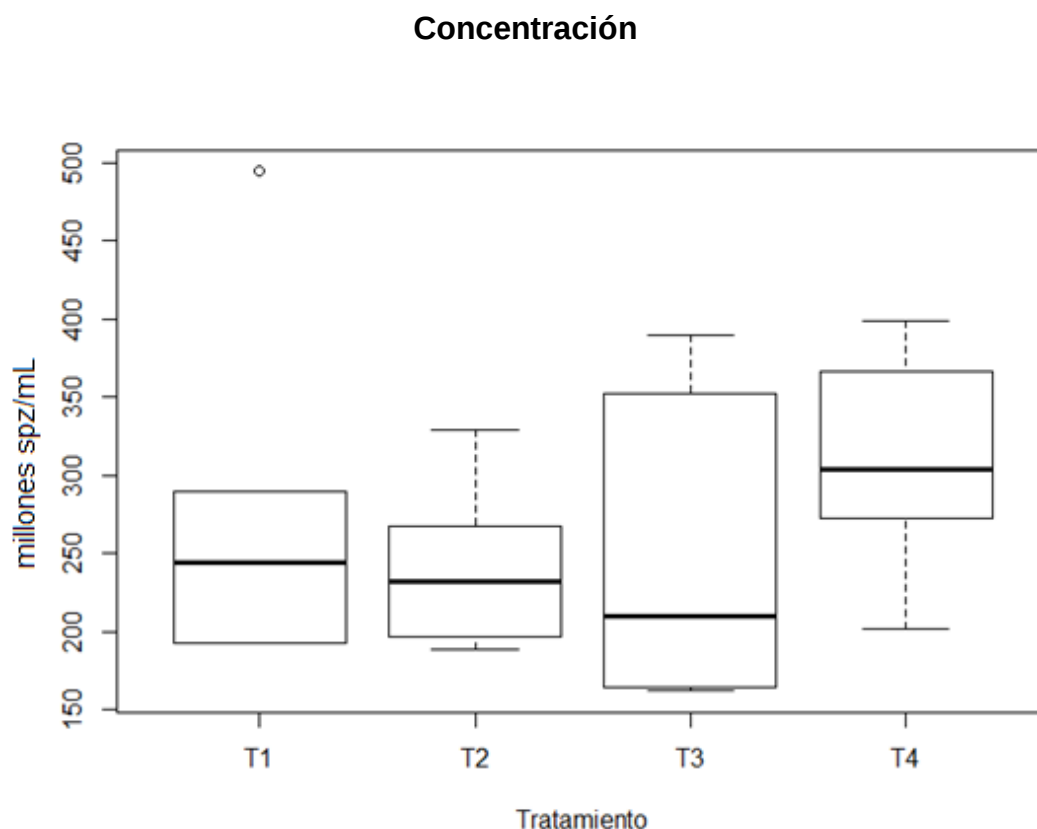


Figura 7: Diagrama de cajas para concentración de espermatozoides por tratamiento.

11.3. Motilidad:

11.3.1. Tipo de movimiento de espermatozoides

-Espermatozoides Estáticos

La prueba de Kolmogorov- Smirnov no detectó diferencias significativas en la distribución del porcentaje de espermatozoides estáticos ($p > 0,05$) entre tratamientos.

Cuadro 6: p-valor de prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución de porcentaje de espermatozoides estáticos entre tratamientos.

	T1	T2	T3	T4
T1	1	0,143	0,931	0,474
T2		1	0,143	0,931
T3			1	0,474
T4				1

Espermatozoides Estáticos

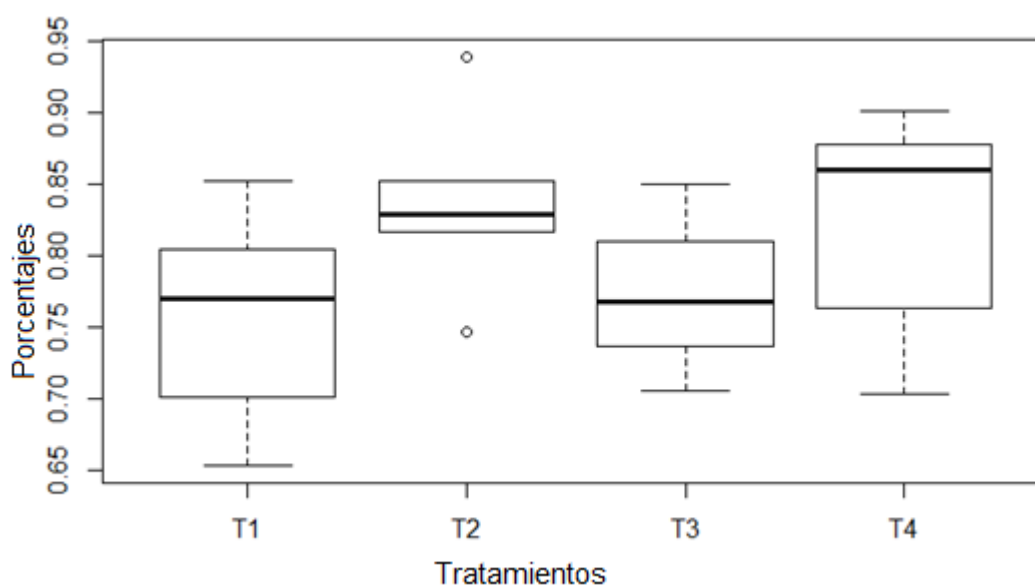


Figura 8: Diagrama de cajas para porcentaje de espermatozoides estáticos por tratamiento.

-Espermatozoides No Progresivos

La prueba Kolmogorov- Smirnov detectó diferencias significativas en la distribución del porcentaje de espermatozoides no progresivos entre T3 y T4 (p -valor=0,026), y entre T3 y T2 (p -valor=0,026).

Cuadro 7: p -valor de prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución de porcentaje de espermatozoides no progresivos entre tratamientos.

	T1	T2	T3	T4
T1	1	0,474	0,474	0,474
T2		1	0,026	0,931
T3			1	0,026
T4				1

Espermatozoides No Progresivos

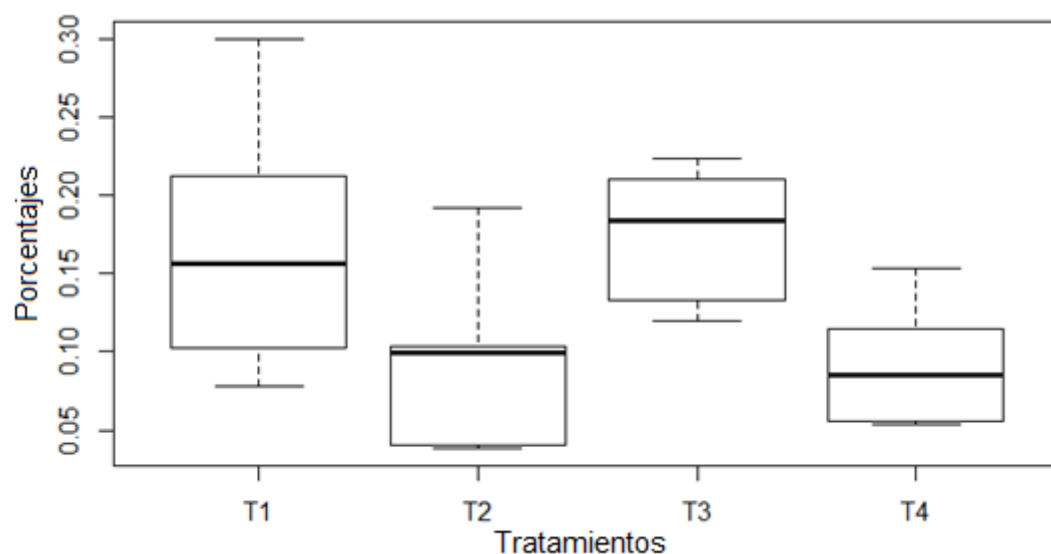


Figura 9: Diagrama de cajas para porcentaje de espermatozoides no progresivos por tratamiento.

-Espermatozoides Progresivos

La prueba de Kolmogorov- Smirnov detectó diferencias significativas en la distribución del porcentaje de espermatozoides progresivos entre T3 y T4 (p-valor=0,026), y entre T3 y T2 (p-valor=0,026).

Cuadro 8: p-valor de prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución de espermatozoides progresivos entre tratamientos.

	T1	T2	T3	T4
T1	1,000	0,931	0,143	0,474
T2		1,000	0,026	0,143
T3			1,000	0,026
T4				1,000

Espermatozoides Progresivos

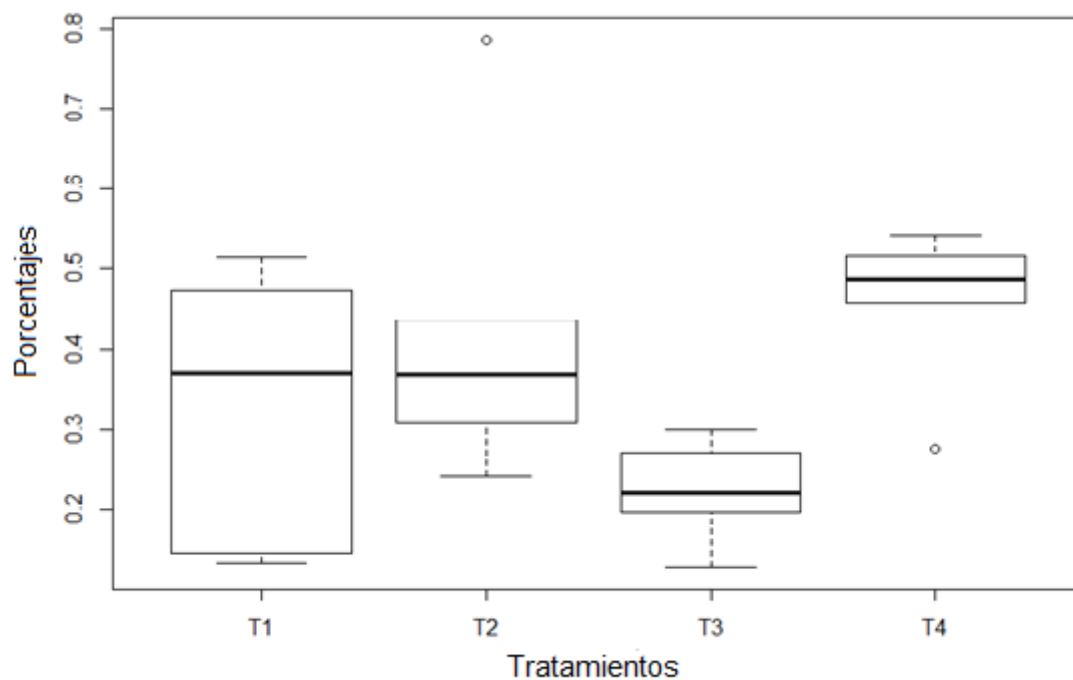


Figura 10: Diagrama de cajas para porcentaje de espermatozoides progresivos por tratamiento.

11.3.2 Análisis de la velocidad de movimiento de los espermatozoides

-Espermatozoides Lentos

La prueba de Kolmogorov- Smirnov no detectó diferencias significativas en la distribución del porcentaje de espermatozoides lentos entre los tratamientos.

Cuadro 9: p-valor de prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución de espermatozoides lentos entre tratamientos.

	T1	T2	T3	T4
T1	1,000	0,931	0,931	0,931
T2		1,000	0,931	0,931
T3			1,000	0,474
T4				1,000

Espermatozoides Lentos

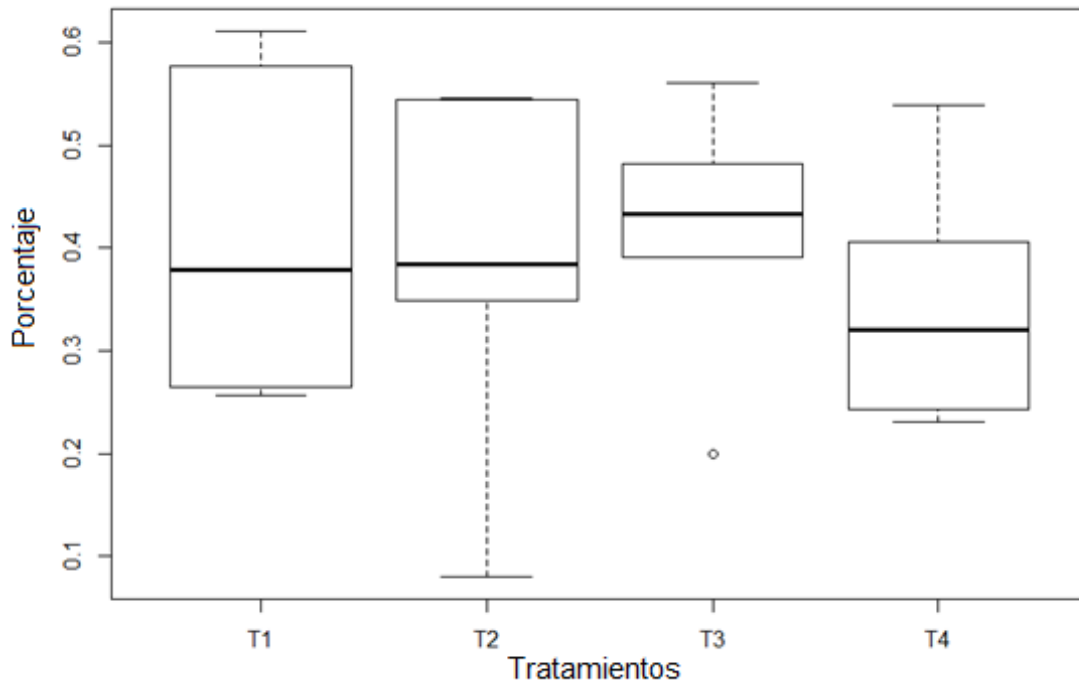


Figura 11: Diagrama de cajas para porcentajes de espermatozoides lentos por tratamiento.

-Espermatozoides Rápidos

La prueba de Kolmogorov- Smirnov no detectó diferencias significativas en la distribución de los porcentajes de espermatozoides rápidos entre tratamientos ($p > 0,05$).

Cuadro 10: p-valor de prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución de espermatozoides rápidos entre tratamientos.

	T1	T2	T3	T4
T1	1,000	0,893	0,931	0,474
T2		1,000	0,893	0,441
T3			1,000	0,474
T4				1,000

Espermatozoides Rápidos

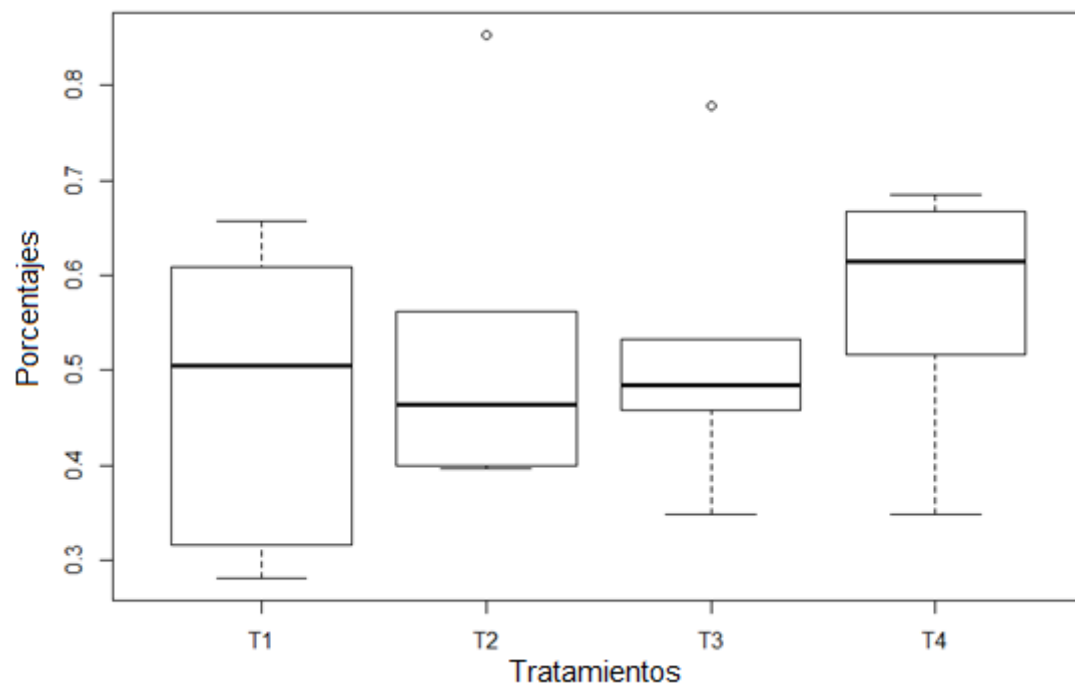


Figura 12: Diagrama de cajas para porcentaje de espermatozoides rápidos por tratamiento.

-Espermatozoides Rápidos Progresivos

La prueba de Kolmogorov- Smirnov detectó diferencias significativas en la distribución de los porcentajes de espermatozoides rápidos progresivos entre T3 y T4 (p-valor=0,026).

Cuadro 11: p-valor de prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución de porcentaje espermatozoides rápidos progresivos entre tratamientos.

	T1	T2	T3	T4
T1	1,000	0,931	0,143	0,143
T2		1,000	0,143	0,143
T3			1,000	0,026
T4				1,000

Espermatozoides Rápidos Progresivos

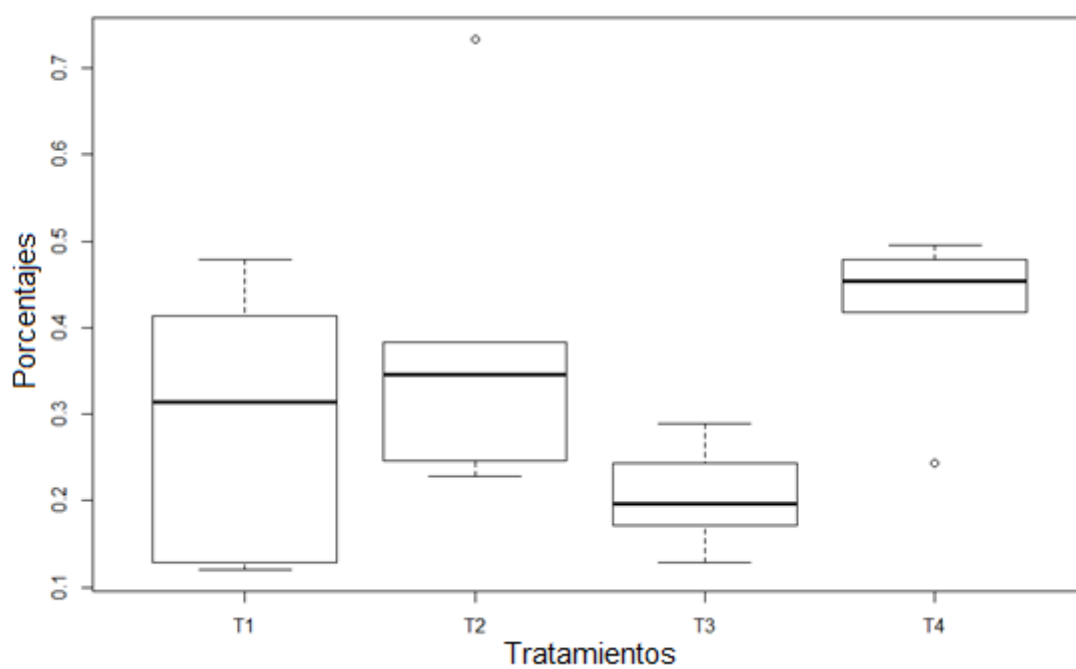


Figura 13: Diagrama de cajas para porcentaje de espermatozoides rápidos progresivos por tratamiento.

11.3.3. Análisis de los parámetros de velocidad

-Análisis de valores atípicos intratratamiento:

Ninguna pajuela del T1 presentó valores atípicos en cuanto a la media de VCL, VSL y VAP. En contrapartida, el T2 presenta una pajuela con valores de media de VCL, VSL y VAP atípicos. Por último, el análisis del T3 y T4 permitió determinar que existía una pajuela en cada uno de ellos con valores medios atípicos para las variables VCL y VAP. En la Figura 14 se visualizan dichos valores atípicos para estas dos últimas variables en los tratamientos.

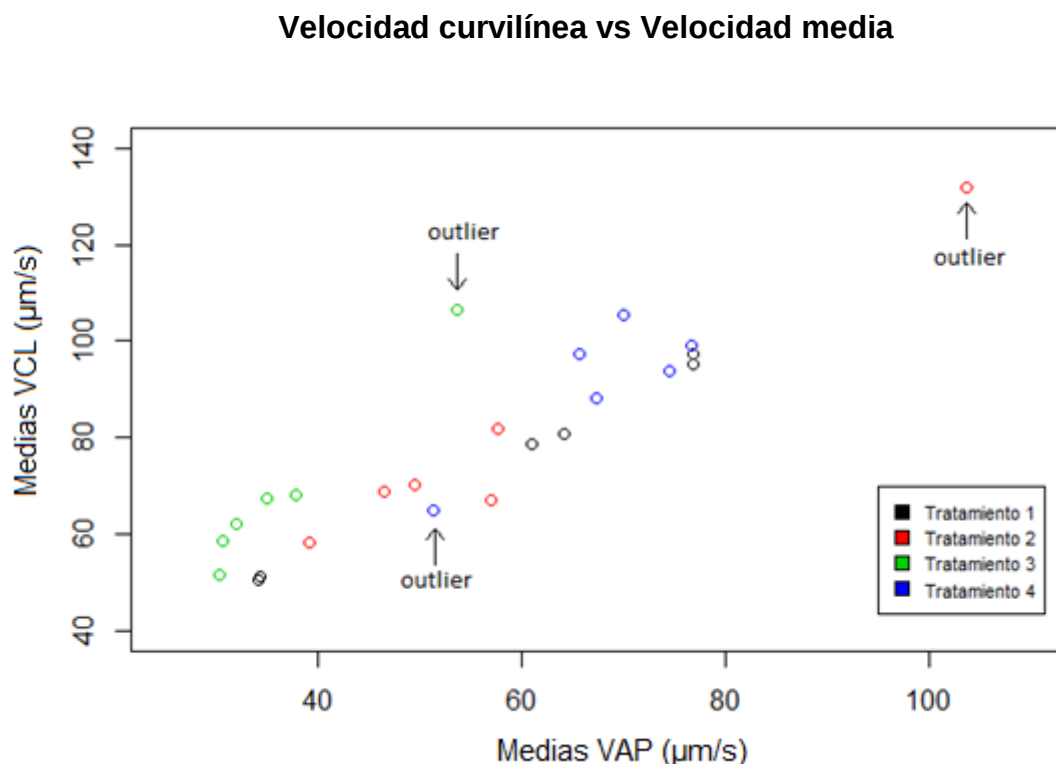


Figura 14: Medias VCL vs Medias VAP en los tratamientos.

A partir del análisis estadístico de valores atípicos y considerando los factores que pueden incidir en las diferencias de medición entre pajuelas intratratamiento (posibles errores en manipulación, descongelación, operador y medición de las variables en las muestras), no se consideraron aquellas pajuelas que mostraban valores atípicos en cuanto a media de VCL, VSL y VAP respecto a la distribución determinada por el conjunto de pajuelas.

En las figuras 15, 16 y 17 se observa el posicionamiento relativo de las pajuelas en cuanto a la media de VCL, VSL y VAP para los cuatro tratamientos, sin considerar los valores atípicos.

Velocidad curvilínea vs Velocidad media

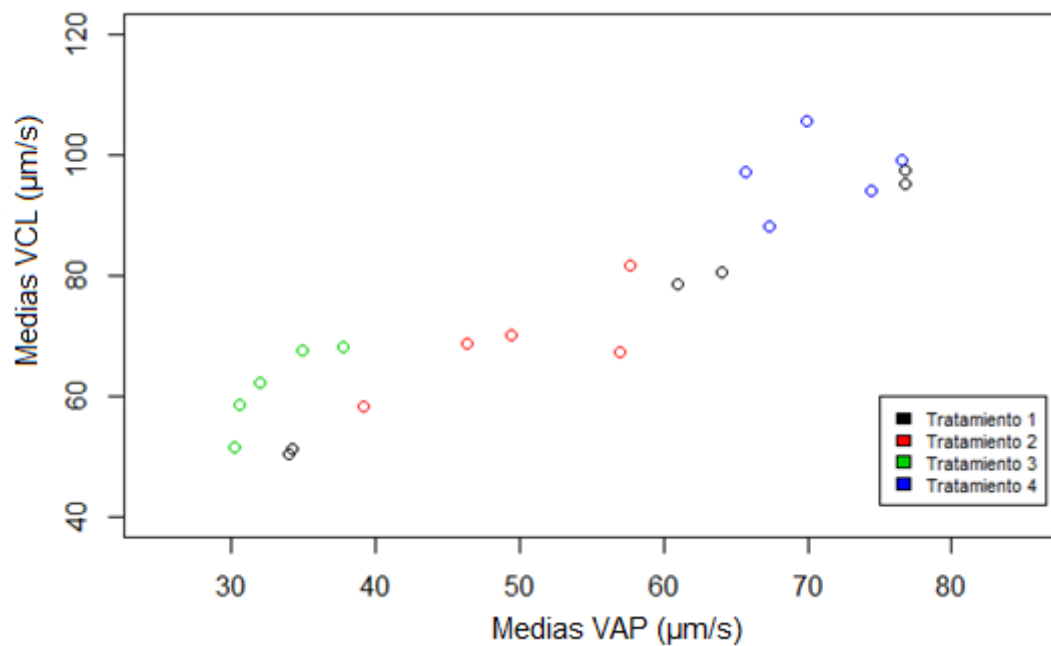


Figura 15: Gráfica de posicionamiento relativo de las pajuelas en cuanto a media de VCL vs VAP para los cuatro tratamientos.

Velocidad rectilínea vs Velocidad media

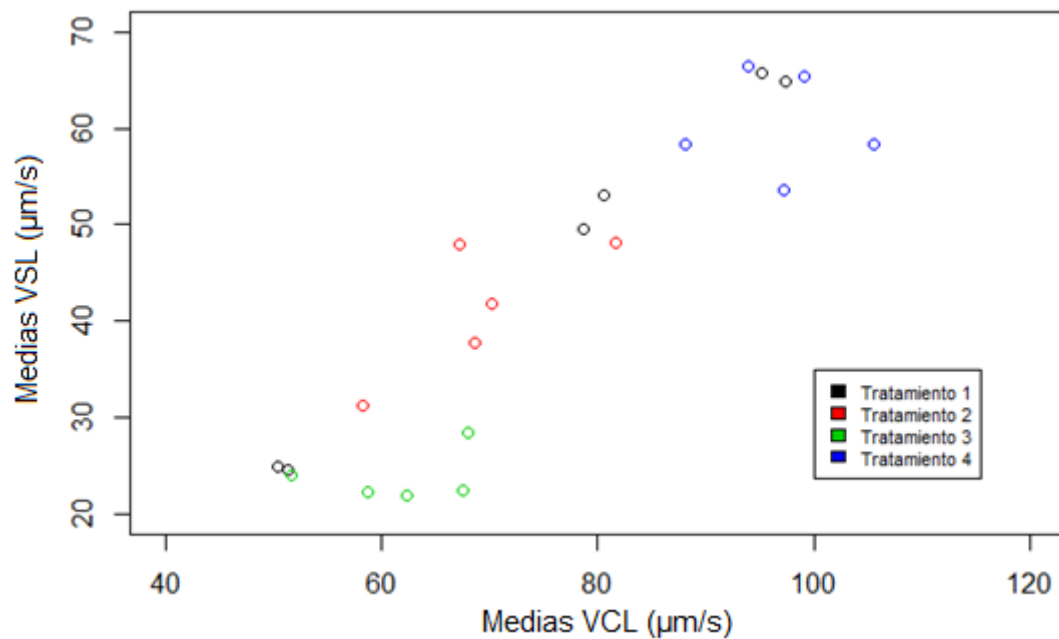


Figura 16: Gráfica de posicionamiento relativo de las pajuelas en cuanto a media de VSL vs VCL para los cuatro tratamientos.

Velocidad media vs Velocidad rectilínea

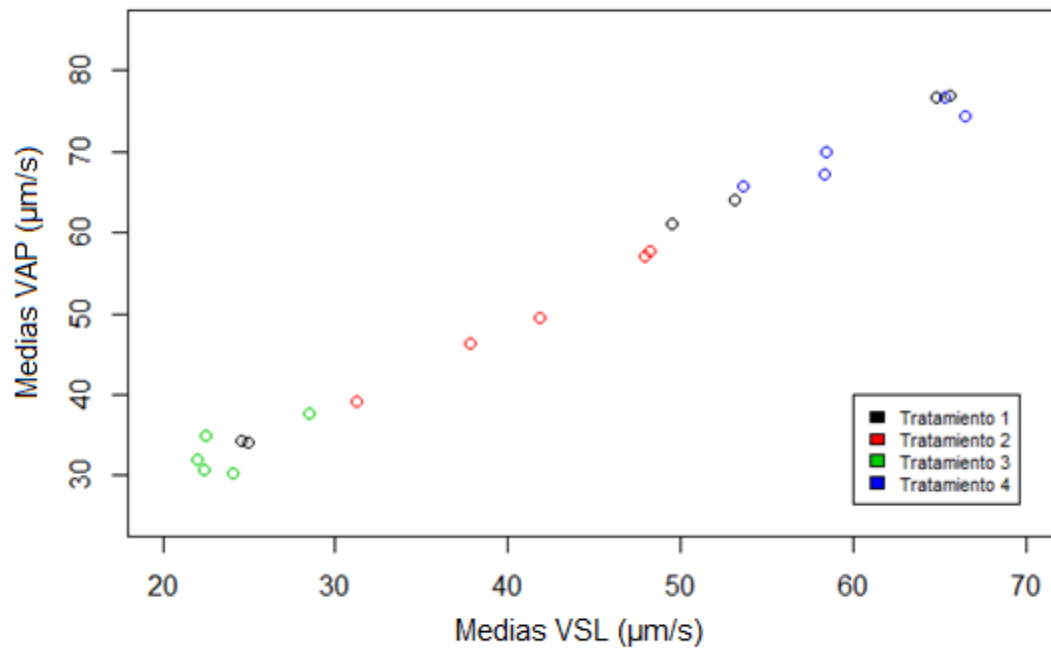


Figura 17: Gráfica de posicionamiento relativo de las pajuelas en cuanto a media de VAP vs VSL para los cuatro tratamientos.

En el T4 se observan los mayores valores medios de VCL, VSL y VAP, al tiempo que las pajuelas del T3 muestran los valores medios más bajos. Mientras que las pajuelas del T2 muestran valores medios moderados para las variables VSL y VAP, y de moderados a bajos para la variable VCL. Por último, las pajuelas del T1 registran valores bajos, medios y altos para las tres variables.

11.4. Pruebas de igualdad de distribución para VCL, VSL y VAP

En términos generales y de acuerdo a los resultados de la prueba de Kolmogorov-Smirnov hay una tendencia a aceptar la igualdad de distribución cuando las pajuelas son del mismo tratamiento, y una tendencia a rechazar cuando se involucran tratamientos diferentes. A esta regla no adhieren las pajuelas del tratamiento 1, las cuales mostraron una tasa de rechazo superior al 85% entre ellas, determinando claramente que no siguen una distribución común para las variables VCL, VSL y VAP. En contrapartida, las pajuelas de los tratamientos 2, 3 y 4 mostraron tasas de rechazo entre el 10% y el 50% de las comparaciones efectuadas dentro del mismo tratamiento, para las tres variables analizadas. Cabe resaltar que estas cifras serían aún inferiores si se considerara un nivel de significación de la prueba de $\alpha=0,01$.

Para las comparaciones efectuadas entre pajuelas de tratamientos diferentes la prueba rechazó la igualdad de distribución en la gran mayoría de los casos (más de 80% de rechazos). Como excepción a esta regla se destacan las comparaciones realizadas para la variable VCL entre las pajuelas de los tratamientos 2 y 3 (apenas 44% de rechazos) y entre las pajuelas de los tratamientos 1 y 4 (63% de rechazos).

Cuadro 12: Prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución para la velocidad VAP entre el total de pajuelas y tratamientos.

VAP																						
	11	12	13	14	15	16	21	22	23	25	26	31	32	34	35	36	41	42	43	45	46	
11	1,00	0,00	0,00	0,00	0,42	0,00	0,10	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
12		1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	
13			1,00	0,91	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,40	0,13	
14				1,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03	0,00	0,38	0,20	
15					1,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
16						1,00	0,01	0,03	0,02	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	
21							1,00	0,00	0,10	0,33	0,53	0,02	0,02	0,03	0,05	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
22								1,00	0,08	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	
23									1,00	0,00	0,44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
25										1,00	0,01	0,04	0,01	0,02	0,01	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
26											1,00	0,02	0,01	0,02	0,02	0,03	0,04	0,04	0,00	0,06	0,00	
31												1,00	0,30	0,92	0,04	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
32													1,00	0,10	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
34														1,00	0,10	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
35															1,00	0,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
36																1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
41																	1,00	0,89	0,37	0,03	0,02	
42																		1,00	0,20	0,10	0,07	
43																			1,00	0,01	0,00	
45																				1,00	0,67	
46																					1,00	

Cuadro 13: Prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución para la velocidad VCL entre el total de pajuelas y tratamientos

VCL																						
	11	12	13	14	15	16	21	22	23	25	26	31	32	34	35	36	41	42	43	45	46	
11	1,00	0,00	0,00	0,00	0,35	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
12		1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	
13			1,00	0,57	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,23	0,12	0,52	0,48	
14				1,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,08	0,38	0,24	0,18	
15					1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
16						1,00	0,24	0,19	0,06	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	
21							1,00	0,05	0,31	0,07	0,30	0,25	0,05	0,47	0,18	0,52	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	
22								1,00	0,15	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	
23									1,00	0,00	0,18	0,10	0,00	0,21	0,43	0,95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
25										1,00	0,05	0,07	0,01	0,03	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
26											1,00	0,18	0,03	0,40	0,09	0,40	0,03	0,00	0,00	0,04	0,00	
31												1,00	0,03	0,99	0,04	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
32													1,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
34														1,00	0,13	0,59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
35															1,00	0,95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
36																1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
41																	1,00	0,01	0,00	0,07	0,02	
42																		1,00	0,01	0,06	0,13	
43																			1,00	0,06	0,08	
45																				1,00	0,26	
46																					1,00	

Cuadro 14: Prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución para la velocidad VSL entre el total de pajuelas y tratamientos

VSL																							
	11	12	13	14	15	16	21	22	23	25	26	31	32	34	35	36	41	42	43	45	46		
11	1,00	0,00	0,00	0,00	0,64	0,00	0,02	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
12		1,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
13			1,00	0,75	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06	0,00	0,61	0,07		
14				1,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06	0,00	0,73	0,27		
15					1,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
16						1,00	0,02	0,19	0,04	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,05	0,03	0,00		
21							1,00	0,01	0,18	0,14	0,53	0,04	0,04	0,04	0,07	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
22								1,00	0,11	0,00	0,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,04	0,00	0,00	0,00	
23									1,00	0,00	0,44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
25										1,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
26											1,00	0,02	0,03	0,03	0,05	0,05	0,00	0,01	0,02	0,02	0,00	0,00	
31												1,00	0,63	0,95	0,05	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
32													1,00	0,60	0,10	0,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
34														1,00	0,13	0,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
35															1,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
36																1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
41																	1,00	0,28	0,00	0,02	0,01	0,00	
42																		1,00	0,12	0,07	0,16	0,00	
43																			1,00	0,00	0,00	0,00	
45																				1,00	0,33	0,00	
46																					1,00	0,00	

Se construyeron histogramas de frecuencias para las variables VCL, VSL y VAP, representando la distribución de dichas variables por tratamiento. Debido a que las pajuelas del T1 presentan distribuciones muy disímiles entre sí, el análisis de los histogramas generados a partir de la agrupación de las mismas no es conveniente.

Los T2, T3 y T4 muestran patrones que se repiten para las tres variables analizadas. En particular, T3 es el que muestra mayor cantidad de espermatozoides con velocidades cercanas a 0. Por su parte, T4 además de ser el que menos concentra valores cercanos a 0, muestra mayor proporción de datos en el rango más alto de velocidades. Por último, T2 muestra una distribución de forma muy similar a la de T3 con una leve tendencia a alcanzar velocidades más altas, sobre todo para VSL y VAP.

Velocidad media

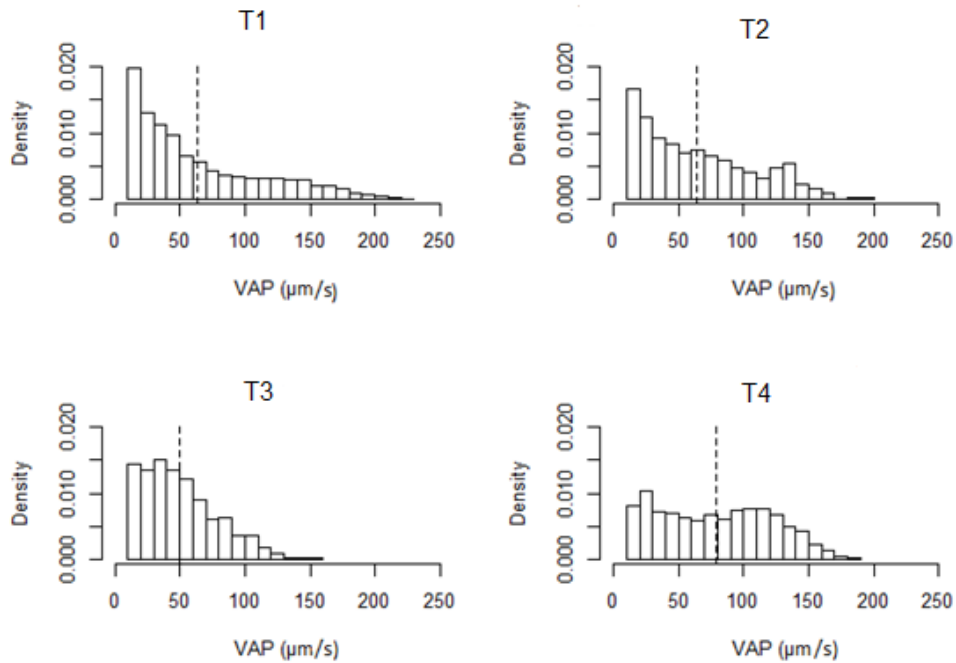


Figura 18: Histogramas de velocidad VAP para los cuatro tratamientos. La media se indica mediante la línea punteada.

Velocidad curvilínea

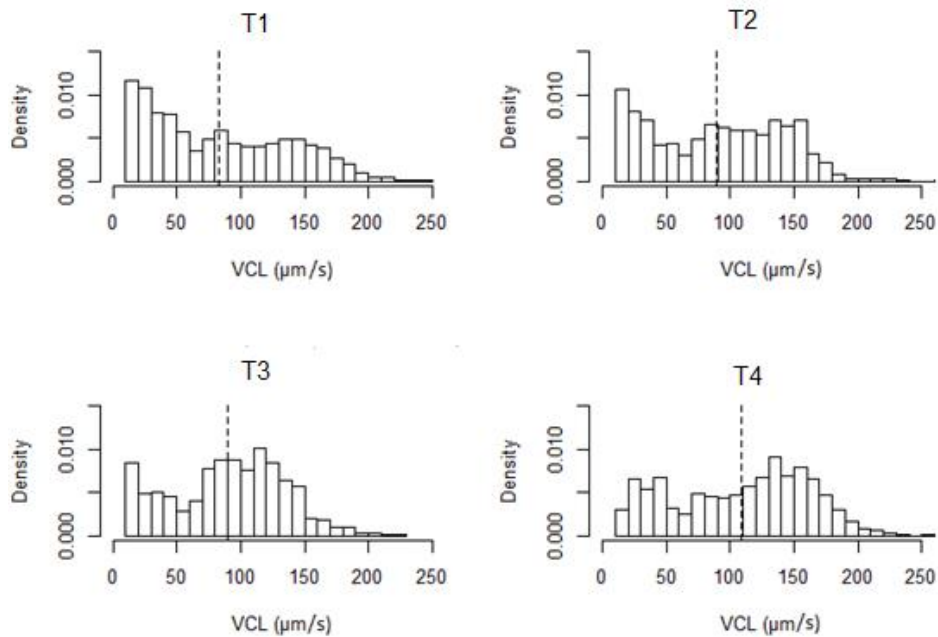


Figura 19: Histogramas de velocidad VCL para los cuatro tratamientos. La media se indica mediante la línea punteada.

Velocidad rectilínea.

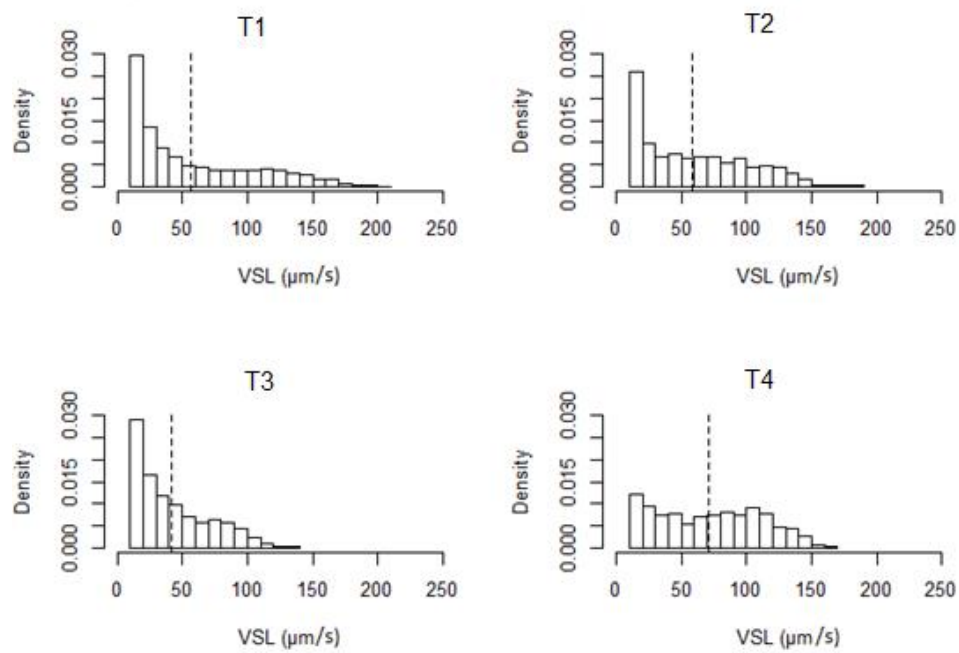


Figura 20: Histogramas de velocidad VSL para los cuatro tratamientos. La media se encuentra indicada mediante la línea punteada.

12. DISCUSION

Los animales utilizados en este ensayo conformaron un grupo homogéneo de machos Merino Australiano pertenecientes a la categoría de 2 dientes. Su utilización fue planteada por el establecimiento comercial. Para la selección de estos animales se utilizaron las variables de caracterización CC, PV, CE e ICE, se fijaron límites inferiores por debajo de los cuales los animales se rechazaban, basados en estudios anteriores (Silva y Fassana, 2017) quienes reportan que los valores utilizados permiten considerar animales con buen desempeño dentro de la categoría. Si bien en la bibliografía se expresa que dicha categoría no es la de mejor desempeño reproductivo, siendo los carneros más activos y fértiles los de 4 y 6 dientes (Ostrowski, 1980; Morón Cedillo y col., 2012; Silva y Fassana, 2017), este establecimiento tiene como principal rubro la venta de reproductores y se plantea el desafío de seleccionar los reproductores en forma temprana. Esto genera la necesidad de incluir nuevos criterios de selección además del análisis tradicional de aptitud reproductiva (Pacheco y Quirino, 2010).

La concentración de espermatozoides no presenta diferencias significativas entre tratamientos y sus valores medios (241-308 millones/mL) aseguran dosis inseminantes en el rango recomendado a utilizar en IA con semen de carnero congelado (Fernández Abella, 2015).

La disminución de la motilidad o aumento del porcentaje de espermatozoides estáticos en el proceso de criopreservación es ampliamente reportado (Karthikeya, 2003, Martínez-Pastor y col., 2005, Dorado y col., 2009, Hashida y col., 2013). Esto impacta negativamente en la capacidad fecundante del semen criopreservado, por lo que al ser usado en programas de IA se obtienen menores tasas de concepción (Watson, 2000). Los resultados obtenidos en este ensayo muestran una importante disminución en la motilidad, el porcentaje de spz que permanecen móviles post congelamiento-descongelamiento no supera el 20% en ninguno de los tratamientos. Salamon y Maxwell (2000) reportan que 40 a 60% de los spz mantienen su motilidad y sólo un 20-30 % permanece fisiológicamente sin daño luego de estos procesos. Asimismo, Fernández Abella (2015) recomienda rechazar pajuelas con menos del 35% de motilidad cuando se trabaja con semen de carnero. Los porcentajes inferiores obtenidos en este ensayo podrían deberse a la categoría de los machos utilizados.

La presencia de varias subpoblaciones dentro de las muestras de semen es ampliamente aceptada hoy en día, aunque los mecanismos de su formación y su rol fisiológico sigue siendo motivo de estudio. Varios autores han encontrado que la susceptibilidad a la capacitación y la fertilidad varía según la subpoblación (Martínez Pastor y col., 2005).

Los equipos CASA permiten el estudio de los espermatozoides en forma individual y los parámetros de motilidad pueden utilizarse para el análisis y caracterización de las subpoblaciones. Varios autores reportan correlación positiva entre la subpoblación de spz móviles progresivos y la fertilidad (Davis y col., 1995, Holt, 1995, Abaigar y col., 1999, Martínez-Pastor y col., 2005, Ramón y col., 2013, Muiño y col., 2015, Yániz y col., 2015). Según Fernández Abella (2015) el movimiento progresivo o normal es el que determina que el espermatozoide avance y pueda fecundar, interesando por esto la existencia de un alto número de espermatozoides con dicho movimiento.

Si observamos los porcentajes de spz móviles progresivos y no progresivos obtenidos utilizando los valores medios de los parámetros cinéticos, existen diferencias

significativas entre T3 y T2 y entre T3 y T4, siendo el T4 el que presenta los mayores porcentajes de spz progresivos.

Maxwell y col (1995) recomiendan utilizar temperaturas entre 4-6°C durante el empaquetado del semen. Los resultados de este ensayo, en el cual se trabaja con machos de 2 dientes y se analiza la muestra en forma automatizada, concuerdan con lo recomendado por estos autores cuando se lleva a cabo el empaquetado previo al equilibramiento, no mostrando concordancia cuando el equilibramiento se realiza previo al empaquetado donde T4 muestra los mejores resultados. Esto podría relacionarse a la mayor superficie de contacto al frío frente al recipiente donde se realiza el equilibramiento (pajuela > tubo de vidrio) en este período de disminución de temperatura entre 35 a 5°C, el cual se da entre 0.5 a 3 horas (Aisen y col., 2000; Gil y col., 2003a, 2003b).

Maxwell y col (1995) encontraron interacción entre la temperatura y el empaquetado en pajuelas (0,25 y 0,5 mL) y minitubos (0,25 mL) cuando la temperatura de empaquetado era 30°C, no así al usar 5°C. Estos autores realizaron los controles de motilidad post descongelamiento manualmente y el semen utilizado fue un pool de carneros de diferentes edades. La fase de equilibrio es el tiempo total en que los espermatozoides toman contacto con el glicerol y todos los componentes del diluyente que sean osmóticamente activos antes de ser congelados, durante el mismo penetran a la célula espermática para establecer un balance entre las concentraciones intra y extracelulares. Asimismo, este período es una adaptación del spz al metabolismo reducido (Salamon y Maxwell, 2000).

En las condiciones de este ensayo los resultados no muestran diferencias significativas para el porcentaje de espermatozoides progresivos entre T1 (20°C) y el resto de los tratamientos. Asimismo, Fernández Abella (2015) recomienda en condiciones “a campo” donde no se cuenta con cámara de frío realizar el empaquetado a 20- 25°C y luego equilibrar, condiciones equivalentes a T1.

La mayoría de los investigadores, trabajando en diferentes especies y con diferentes estudios estadísticos, reportan la existencia de un bajo número de subpoblaciones de espermatozoides (3- 4), cuando se analiza la motilidad de los mismos en las muestras de semen. En estos estudios se observan similitudes en los patrones de las subpoblaciones, de hecho los mismos proponen que la presencia de la subpoblación “rápida y lineal” es un marcador de buena calidad seminal, mientras que la de “lentos y no lineales” lo es de calidad pobre (Martínez- Pastor y col., 2011).

En las condiciones de este trabajo, en los resultados se observa únicamente diferencia significativa en esta subpoblación rápida y progresiva entre T3 y T4, presentando el T4 los valores más altos. Asimismo dentro de esta subpoblación los valores máximos de las velocidades (VAP, VCL y VSL) pueden ser muy diferentes aunque las medias no muestran diferencias. En el T4 se observan los mayores valores medios de VCL, VSL y VAP, al tiempo que en el T3 se observan los valores medios más bajos. En el T2 los valores medios son moderados para las variables VSL y VAP, y de moderados a bajos para la variable VCL. Por último, en el T1 se registran valores bajos, medios y altos para las tres variables.

La mayoría de los estudios solo han utilizado los valores medios y el desvío standard brindados por los softwares de los sistemas CASA para posteriores análisis estadísticos, hay una gran cantidad de información que se pierde al hacerlo ya que se considera toda la muestra como homogénea. Consecuentemente su variabilidad interna no se tiene en cuenta y por lo tanto perjudica el análisis de la relación entre

motilidad y calidad espermática y finalmente fertilidad (Martínez Pastor y col., 2005; Holt y col., 2007).

Holt y col (2007) trabajando con espermatozoides de epidídimo de primates (*Callithrix jacchus*), observó a través de histogramas que la población de espermatozoides no presenta distribución normal y por lo tanto la estadística paramétrica no es apropiada para su análisis lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. Los histogramas son muy interesantes para observar la distribución en las subpoblaciones de spz presentes, este autor a su vez reporta la existencia de una subpoblación (~5%) de spz de movimiento muy rápido (hasta 200 $\mu\text{m/s}$).

Teniendo en cuenta que al estudiar la igualdad de distribución para las variables VCL, VSL y VAP de las pajuelas intratratamiento, en el T1 existe un porcentaje de rechazo superior al 85% determinando que no siguen una distribución común, no es posible comparar la distribución en el T1 con los restantes tratamientos donde el porcentaje de rechazo intratratamiento es inferior (10 a 50%). Estos resultados podrían sugerir un comportamiento menos reproducible, post congelamiento- descongelamiento, en los spz al realizar el empaquetado a 20°C.

Una vez establecido que se excluirá T1 al comparar distribuciones, se puede observar que los tratamientos T2, T3 y T4 muestran en los histogramas patrones de distribución que se repiten para las tres variables analizadas. En particular, T3 es el que muestra mayor cantidad de espermatozoides con velocidades inferiores a 20 $\mu\text{m/s}$. Por su parte, T4 además de ser en el que menos se observan valores inferiores a 20 $\mu\text{m/s}$, muestra la mayor proporción de datos en el rango más alto de velocidades (> 200 $\mu\text{m/s}$ en VCL). Por último, T2 muestra una distribución de forma muy similar a la de T3 con una leve tendencia a alcanzar velocidades más altas, sobre todo para VSL y VAP. Para la variable VCL, se obtiene el menor porcentaje de rechazos entre pajuelas de los tratamientos T2 y T3, sugiriendo que a 4°C el momento del empaquetamiento no impactaría en esta variable.

Si se utiliza como marcador de buena calidad seminal la mayor cantidad de spz con velocidades superiores a 100 $\mu\text{m/s}$, en VCL, VSL y VAP, el T4 es el tratamiento que muestra mejores resultados. Esto se contrapone a lo reportado por Fernández Abella (2015), quien manifiesta que el empaque en nevera o refrigerador a temperaturas superiores a 6°C, posterior al equilibramiento realizado en un rango de 4- 6°C, condiciones similares a T4, provocaría un daño irreversible que afectaría la fertilidad. Para validar este marcador de calidad, y determinar su correlación con fertilidad se deberían probar los tratamientos en programas de IA.

13. CONCLUSIONES

En las condiciones de este ensayo:

1. Los porcentajes de espermatozoides estáticos post congelamiento-descongelamiento son superiores a lo esperado, lo cual podría deberse a la categoría de machos utilizados.
2. El porcentaje de espermatozoides móviles progresivos:
 - 2.1. Los tratamientos T1, T2 y T4 no presentan diferencias significativas.
 - 2.2. A 4°C sería incrementado al realizar el empaquetamiento previo al equilibramiento.
3. El porcentaje de espermatozoides rápidos progresivos sería afectado por la temperatura a la cual se empaqueta post equilibramiento, obteniéndose los mejores resultados en T4.
4. Respecto a las velocidades de los espermatozoides y su distribución en las poblaciones presentes en las muestras:
 - 4.1. Se afectaría la distribución intratratamiento al empaquetar a 20°C.
 - 4.2. Los mejores resultados se obtendrían en las condiciones de T4.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Abaigar, T., Cano, M., Espeso, G., Ortiz, J. (1997). Introduction of Mhorh gazelle *Gazella dama mhorh* in Bou-Hedma National Park, Tunisia. *International Zoo Yearbook* 35: 311-316.
2. Abaigar T., Holt WV, Harrison RAP, del Barrio G. (1999). Subpoblaciones de espermatozoides en semen de jabalí (*Sus scrofa*) y gacela (*Gazella dama mhorh*) como lo revela el análisis de patrones de evaluaciones de motilidad asistida por computadora. *Biol. Reprod.* 60: 32-41.
3. Abaigar, T., Cano, M., Pickard, A.R., Holt, W.V. (2001), Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorh*): effects of body weight, electroejaculation technique and short-term semen storage. *Reproduction* 122: 265-273.
4. Abaigar, T., Holt, W.V., Harrison, R.A.P., Del Barrio, G. (1999), Sperm subpopulations in Boar (*Sus scrofa*) and Gazelle (*Gazella dama mhorh*) semen as revealed by pattern analysis of computer- assisted motility assessments. *Biol of Reproduction* 60: 32-41.
5. Agarwal, A., Said, T.M. (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility, *Human Reproduction Update*, 9: 331-345.
6. Aisen, E.G., Álvarez, H.L., Venturino, A., Garde, J.J. (2000). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*. 53: 1053-1061.
7. Aitken R.J., Krausz C.G. (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122: 497-506.
8. Aliaga Z. (2006). Producción de ovinos. Lima, Edit. Gutenberg 295p.
9. Álvarez, M., García-Macías, V., Martínez-Pastor, F., Martínez, F., Borragán, S., Mata, M., Garde, J., Anel, L., De Paz, P., (2008). Effects of cryopreservation on head morphometry and its relationship with chromatin status in brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa. *Theriogenology* 70: 1498-1506.
10. Anel, E. (1999). Automatización en la contrastación espermática. II Congreso Ibérico de Reproducción animal, Lugo, España. p 292-296.
11. Anghel A., Zamfirescu S., Coprean D., (2013). The oxidative stress, cryopreservation and fertility. Aspects of molecular oxidation and its effect on the reproductive function off ram, Academy of Romanian Scientists, *Annals Series on Biological Sciences* 2: 73-104.
12. Banday, Mohamed Naiem., (2017). Use of Antioxidants Reduce Lipid Peroxidation and Improve Quality of Crossbred Ram Sperm during Its Cryopreservation. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.12.008>. Fecha de consulta: 25 de abril de 2018.
13. Bank, H.L., Brockbank, GM. (1987). Basic principles of cryobiology. *J. Cardiac Surg. (suppl.)* 2: 137-143.

14. Bearden, H.J., Fuquay J. (1982). Introducción e historia de la inseminación artificial. En: Reproducción animal aplicada. Manual Moderno. México D. F. p. 135-140.
15. Bedford, J.M. (1970). Sperm capacitation and fertilization in mammals. Biol. Reprod. (Suppl.), 2: 128-158.
16. Bedford, J.M. (1983). Functional significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. Biol. Reprod. , 31: 143-154.
17. 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. InVet. 13 (2):25-38.
18. Boiso, I. (2001). Principios básicos de criobiología. Revista Iberoamericana de Fertilidad. 18: 127-131.
19. Bonino, J. (2000). Evaluación clínica reproductiva del carnero. Disponible en: https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R89/R89_41.htm. Fecha de consulta: 26 de julio de 2018
20. Bonino, J. (2004). Incremento de los procreos ovinos. XXXII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Buiatria, Paysandú, Uruguay, 45-51 p.
21. Boyers, S.P., Davis, R.O., Katz, D.F. (1989), Automated semen analysis. Current Problems in Obstetrics, Gynecology and Fertility 12: 165-200.
22. Brogliatti, M. (2008). Inseminación artificial a tiempo fijo: el porqué de los intentos fallidos. Centro de Inseminación Artificial La Argentina Chica. 10: 22-25. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar. Fecha de consulta: 20/09/18
23. Cameron, A.W.N., Tilbrook, A.J. (1990). The rate of production of spermatozoa by rams and its consequences for flock fertility. University of Western Australia, p 131-142 Disponible en C:/users/usuarios/Downloads/Reproductive physiology of merino sheep.pdf/. Fecha de consulta: 20 de octubre de 2018.
24. Cavestany, D. (1994). Procesamiento y congelación de semen de toro. Montevideo, Santa Catalina, 23 pp.
25. Chantler, E., Abraham-Peskir, J., Roberts, C. (2004), Consistent presence of two normally distributed sperm subpopulations within normozoospermic human semen: A kinematic study. International Journal of Andrology 27: 350-359.
26. Chemineau, P., Cagnie, Y., Guerin, Yorgueur, P., Vallet, J. C. (1991). Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats. Roma, FAO, 222p.
27. Colas, G. (1983). Factors affecting the quality of ram semen. En: Haresign, W. Sheep production. London. Butterworth. p. 453-465.
28. Coy F., (1995). Reproducción en ovejas y cabras. En: García S., A.; Castejón M., F.; de la Cruz P., L.; González G., J.; Murillo L., M.; Salido R., G.(eds.). Fisiología Veterinaria. Madrid, Mc Graw-Hill – Interamericana, p 937-950.

29. Cremades, T., Roca, J., Rodriguez-Martinez, H., Abaigar, T., Vazquez, J.M., Martinez, E.A. (2005), Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *Journal of Andrology* 26: 610-618.
30. Cuevas Buzón, A. (2013). Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer. Tesis. Universidad de Córdoba Facultad de Veterinaria, Argentina. 173p.
31. Cunningham, J., Klein, B. (2009). *Fisiología Veterinaria*. 4º ed. Barcelona, Elsevier, 700 p.
32. Dagnew, Y., Urge, M., Tadesse, Y., Gizaw, S., (2017). Sheep Production and Breeding Systems in North Western Lowlands of Amhara Region, Ethiopia: Implication for Conservation and Improvement of Gumz Sheep Breed. Disponible en: <https://doi.org/10.4236/ojas.2017.72015>. Fecha de consulta: 18 de abril de 2018.
33. Davis, R.O., Siemers, R.J., (1995). Derivation and reliability of kinematics measures of sperm motion. *Reprod. Fertil Dev.* 7, 857-869.
34. Del Pino, R. Inseminación Artificial en Ovinos (2000). Disponible en: <http://webs.demasiado.com/delpino/iavaginal.html>. Fecha de consulta: 20 de noviembre de 2018.
35. Davis RO, Drobnis EZ, Overstreet JW (1995). Application of multivariate cluster, discriminate function, and stepwise regression analyses to variable selection and predictive modeling of sperm criosurvival. *Fert. Steril* 63: 1051-1057. doi: 10.1016 / S0015-0282 (16) 57547-5.
36. Dogan, I., Nur, Z., Gunay, U., Soyulu, M K., Sonmez, C. (2004). Comparison of fluorgestone and medroxyprogesterone intravaginal sponges for oestrus synchronization in saanen does during the transition period. *South Afr. J. Anim. Sci.* 34(1): 18 – 22.
37. Dorado, J., Hidalgo, M., Muñoz, A., Rodríguez, I. (2009), Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Animal Reproduction Science* 112: 150-157.
38. Dorado, J., Molina, I., Muñoz-Serrano, A., Hidalgo, M. (2010), Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. *Theriogenology* 74: 795-804.
39. Dorado, J., Alcaráz, L., Duarte, N., Portero, J.M., Acha, D., Hidalgo, M., (2011a), Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on Pure Sperm® gradient. *Animal Reproduction Science* 125: 211-218.
40. Dorado, J., Gálvez, M.J., Murabito, M.R., Muñoz-Serrano, A., Hidalgo, M., (2011b), Identification of sperm subpopulations in canine ejaculates: Effects of cold storage and egg yolk concentration. *Animal Reproduction Science* 127: 106-113.
41. Dorado, J., Acha, D., Gálvez, M.J., Ortiz, I., Carrasco, J.J., Díaz, B., Gómez-Arrones, V., Calero-Carretero, R., Hidalgo, M. (2013), Sperm motility patterns in Andalusian donkey (*Equus asinus*) semen: Effects of body weight, age, and semen quality. *Theriogenology*. 79(7): 1100-1105.

42. Durán del Campo, A. (1980). Anatomía, Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en Ovinos. Montevideo, Hemisferio Sur, 264 p.
43. Dyce, Sack, Wensing 2da edición (1999). Anatomía Veterinaria. Madrid. Mc Graw-Hill. Interamericana, 797 p.
44. El-Alamy, M., Foote, R.H. (2001). Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. Anim. Reprod. Sci. 65: 245-254.
45. ESHRE Andrology Special Interest Group (1998), Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. Hum Reprod. 13: 142-145.
46. Evans, G.; Maxwell, W.M.C. (1990). Inseminación artificial en ovejas y cabras. Zaragoza, Acribia 192 p.
47. Farrell, P.B., Foote, R.H., Zinaman, M.J. (1996), Motility and other characteristics of human sperm can be measured by computer- assisted sperm analysis of samples stained with Hoechst 33342. Fertility and Sterility 66: 446-453.
48. Farrell, P.B., Presicce, G.A., Brockett, C.C., Foote, R.H. (1998), Quantification of bull sperm characteristics measured by computer- assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. Theriogenology 49: 871- 879.
49. 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.
50. Fernández Abella, D. (1993). Principios de Fisiología Reproductiva Ovina. Montevideo, Hemisferio Sur, 254 pp.
51. 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.
52. Fernández Abella, D.; Bonilla Riera, C.; Bonilla Riera, R.; Villegas, N.; Ibáñez, W. (2001). Efecto de la refrigeración del semen de carnero a 4-5° C sobre el transporte espermático. Producción Ovina. 14: 55-63.
53. Fernández Abella, D. (2003). Manual de inseminación artificial por vía cervical en ovinos. Montevideo, Secretariado Uruguayo de la Lana. 71 p.
54. Fernández Abella, D.; Bonilla Riera, C.; Irabuena, O.; Sterla, S. (2003). Importancia de la sincronización del celo y de la calidad del semen en la fertilidad obtenida por inseminación intrauterina. INIA. Serie de Actividades de Difusión 343 - Tacuarembó. 74 p.
55. Fernández Abella, D. (2006). Manual de Inseminación Artificial en Ovinos. Montevideo, Hemisferio Sur, 79 p.
56. Fernández Abella, D. (2015). Importancia del carnero en la fertilidad del rebaño. En: Tecnologías reproductivas bovinas y ovinas. Montevideo, Hemisferio Sur. 139-169-170-200p
57. Fiser, P.S., Fairfull, R. (1986). The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on survival of spermatozoa before *and* after freezing. Cryobiology. 23: 518-524.

58. Flores, E., Taberner, E., Rivera, M.M., Peña, A., Rigau, T., Miró, J., Rodríguez-Gil, J.E., (2008), Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. *Theriogenology* 70: 936- 945.
59. Garner, D.L., Hafez, E.S.E (2000). Spermatozoa and Seminal Plasma. En: Hafez, E.S.E. and Hafez B (eds)., *Reproduction in farm animals*, 7a ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins Company, p 96-109
60. Gaviria Scioville M.T., Arias Bernal L. (2005). Características seminales del jaguar (*Panthera onca*) en cautiverio en dos zoológicos colombianos. *Revista De Investigación (Bogotá)*. 5(2): 241 - 246.
61. 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 19 p. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-obtencion_procesamiento_y_conservacion_semen_ov.pdf. Fecha de consulta: 15 de Noviembre de 2018.
62. Gibbons, A., Cueto, M. (1995). Manual de Inseminación Artificial en la Especie Ovina. INTA Bariloche, 15-16-17 p. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/267180031_MANUAL_DE_INSEMINACION_ARTIFICIAL_EN_LA_ESPECIE_OVINA. Fecha de consulta: 15 de Noviembre de 2018
63. Gibbons A., Cueto M., (2011). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Estación Experimental Agropecuaria Bariloche Centro Regional Patagonia Norte Manual De Inseminación Artificial En La Especie Ovina. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/07-manual_ia.pdf. Fecha de consulta: 18 de abril de 2018.
64. Gil, J., Söderquist, L. y Rodríguez-Martínez, H. (2000). Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*. 54: 93-108.
65. Gil, J., Rodríguez- Leazoqui, M., Lundeheim, N., Söderquist, L. y Rodríguez-Martínez, H. (2003a). Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*. 59: 1157-1170.
66. Gil. J., Lundeheim, N., Söderquist, L., Rodríguez-Martínez, H. (2003b). Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*. 59: 1241-1255.
67. Gea, G. (2007) *El ganado lanar en la Argentina*. 2ª ed. Río Cuarto, Córdoba. Universidad Nacional de Río Cuarto. 132p
68. 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.
69. Gómez Ma. Migliorisi A. (2013) *EVALUACIÓN de la APTITUD REPRODUCTIVA DEL OVINO/CAPRINO*. Cátedra Reproducción Animal. Facultad de Cs. Veterinarias – UNLP.

70. Graham, J.K. (1996). Cryopreservation of stallion spermatozoa. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice* 12:131-147.
71. Graham, J. Mocé, J. (2005). Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*. 64: 492-504.
72. Grossmann, M., Santaló, J. (1991). Aspectes teòrics de la congelació de gàmetes i d'embrions. *Treb Soc Cat Biol*. 42: 87-108.
73. Hafez, E.S.E. y Hafez B. (2000). Evaluación del semen. Inseminación artificial. En: *Reproducción e inseminación artificial en animales*. Ed. McGraw Hill Interamericana, 7ª ed. México, D.F. p. (375; 385; 387; 400).
74. Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive? *J. Androl*; 11 (1): 73-88.
75. Hashida, N. H., Nor Ashikin, M. N. K., Khaironizam, M. Z., Abdullah, R. B. (2013). Effects of freezing on sperm velocity in four different age groups of Jermasia buck. *Indian Journal of Animal Research*, 47: 54-57.
76. Hidalgo, M., (2003). Valoración de la calidad esperma y su correlación con la fertilidad. *I Jornadas de Reproducción Equina*. Valencia. España. p. (76-87)
77. Holt W. (1995). ¿Podemos predecir las tasas de fertilidad? Dar sentido a la motilidad del esperma. *Reprod. Domestico Anim* 31: 17–24. doi: 10.1111 / j.1439-0531.1995.tb00001.x
78. Holt, C., Holt, W.V., Moore, H.D. (1996). Choice of operating conditions to minimize sperm subpopulation sampling bias in the assessment of boar semen by computer- assisted semen analysis. *J Androl*, 17 (5): 587-596.
79. Holt, W.V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53: 47-58.
80. Holt W (2007). Applications and interpretation of computer- assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reproduction Fertility and Development Sci* 19: 709 – 718.
81. Ishwar, K. A., Momon, A. M. (1996). Embryo transfer in sheep and goats. A review. *Small Rumin. Res.* 19: 135-45.
82. Jefferies B.C. (1961). Body condition scoring and its use in management. *Tasmanian Journal of Agriculture*, 32: 19-21
83. Jasko D.J., Lein D.H., Foote R.H. (1990). Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987– 1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 197: 389–394.
84. Jiménez, R. A. O, Ortiz, H. A, Núñez, S. J, Mejia, V. O. (2004). Fertilidad y prolificidad obtenidas tras la transferencia de un embrión a ovejas receptoras con servicio previo. *XXVIII Congreso Nacional de Buiatria* Morelia, Michoacán, México. p. 296.
85. Karthikeya G. (2003). Computer automated motility and morphometric analysis of bull and buck spermatozoa. *MVSc Thesis, Tamil Nadu Veterinary and Animal Sciences University, Chennai, India*. 320 pp.

86. Katkov, I.I., Lulat, A.G.M.I. (2000). Do conventional CASA-parameters reflect recovery of kinematics after freezing? 'CASA paradox' in the analysis of recovery of spermatozoa after cryopreservation. *Cryo Letters* 21: 141-148.
87. Kumar, S., Millar, J.D., Watson, P.F. (2003). The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*. 46: 246-253.
88. Laing, J., Brinley, W. y Wagner, W. (1990). Fertilidad e Infertilidad en la práctica veterinaria. México DF. Ed. Acribia, pg. 55-67
89. Leibo, S.P. (1981). Conservación de ovocitos y embriones mediante congelación. *Avances en Zootecnia*. En: Brackett, G.B., *Nuevas Técnicas de Reproducción Animal* Ed. Acribia, pg. 143-157.
90. Luvoni G.C. (2006). Gamete cryopreservation in the domestic cat, *Theriogenology*, 66 (1):101-111.
91. Manual de Triladyl, Laboratorio Minitube (2003) Diluyente de Semen Bovino. Disponible en: <http://www.perulactea.com/wpcontent/uploads/2012/09/DILUYENTE-DE-SEMEN-BOVINOTRILADYL.pdf>. Fecha de consulta 11 de Octubre de 2019.
92. Manual Electrojac 5 ®, 2011. Disponible en www.giss.co.th/document/manual. Fecha de Consulta: 13 de Octubre de 2018.
93. Manual ISAS v1® (2015), disponible en <http://www.proiser.com>
94. Martínez-Pastor, F., García-Macias, V., Álvarez, M., Herráez, P., Anel, L., De Paz, P., (2005). Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biology of Reproduction* 72: 316-327.
95. Martínez-Pastor, F., Tizado, E.J., Garde, J.J., Anel, L., de Paz, P. (2011). Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology* 75: 783-795.
96. Maxwell, W.M.C., Johnson, L.A. (1999) Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 52: 1353-1362.
97. Maxwell, W. M. C. (1986). Artificial Insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronized oestrus 1. Effects of time of oestrus, ovulation and insemination on fertility. *Animal Reproduction Science* 10: 301-308.
98. Maxwell, W. M. C. (1986). Artificial Insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronized oestrus 2. Effects of time of onset of oestrus, ovulation and insemination on fertility. *Animal Reproduction Science*. 10: 309-316.
99. Maxwell W., A Landers. G Evans. (1995). Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology* 43: 1201 - 1210.
100. Maxwell, W.; Watson, P. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science* 42: 55-65.

101. Mazur. (1980). Aspectos fundamentales de la congelación de células especialmente óvulos y embriones de mamíferos. 4 ed. Madrid, C.A.R. 2: 110-114.
102. Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanism and implications. The American Journal of Physiology. 247: 125-142.
103. Medeiros, C.M., Forell, F., Oliveira, A.T., Rodrigues, J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology. 57: 327-344.
104. Mejía, G. P., Hernández, O. G. (1996). "Curso Teórico-Práctico sobre Reproducción Aplicada en Pequeños Rumiantes". Universidad Nacional Autónoma de México. Noviembre. p. 28-43.
105. MGAP-DIEA (2017). *Anuario Estadístico Agropecuario*. Disponible en <http://www2.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2015,O,es,O>, Fecha de consulta: 16 de abril de 2018.
106. Miró, J., Lobo, V., Quintero-Moreno, A., Medrano, A., Peña, A., Rigau, T. (2005). Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. Theriogenology 63: 1706-1716.
107. Molinia, F.C., Evans, G., Maxwell, W.M. (1994a). Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. Theriogenology. 42: 849-858.
108. Molinia, F.C., Evans, G., Quintana Casares, P.I., Maxwell, W.M. (1994b). Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluent on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. Anim. Reprod. 36: 113-122.
109. 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: 12 de febrero de 2019.
110. Marrant Al, Dunn RB. (1960). Artificial insemination of sheep II. Techniques and equipment used at Trangia Agricultural Experiment Station. Australian Veterinary Journal. 63 (1) : 1-7
111. Mortimer, S.T., Maxwell, W.M.C. (2004). Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. Reproduction 127: 285-291.
112. Moule, G.R. (1970). Australian research into reproduction in the ram. Animal Breeding Abstracts, 38: 185- 202.
113. Muíño, R., Fernández, M., Peña, A.I. (2006). Parámetros cinéticos de eyaculados bovinos de toros de raza Frisona y Rubia Gallega. ITEA: Información Técnica Económica Agraria. 102: 55-66.
114. Muíño, R., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., Peña, A.I. (2008) Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. Animal Reproduction Science 109: 27-39.

115. Muiño, R., Peña, A.I., Rodríguez, A., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., (2009). Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturian de los Valles bulls. *Theriogenology* 72: 860-868.
116. Muiño R., Peña AI, Quintela LA, Becerra J., Herradón P., González FH (2015). Manejo del almacenamiento de esperma crio conservado en granjas de ganado lechero. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 31: 85–100.
117. Núñez-Martínez, I., Moran, J.M., Peña, F.J. (2006a). A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: Changes after cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals* 41: 408-415.
118. Núñez-Martínez, I., Morán, J.M., Peña, F.J., (2006b). Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. *Journal of Andrology* 27: 596-603.
119. Ostrowski J.E.B, (1980) *Teriogenología. Temas sobre manejo reproductivo e inseminación artificial en bovinos y ovinos*. Montevideo. Ed Hemisferio Sur, V1.
120. Pacheco, A., Quirino, C. R. (2010). Comportamento sexual em ovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 34(2): 87-97.
121. Parks J.E., Graham J.K., (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes, *Theriogenology*, 38: 2:209-222.
122. Paulenz, H.; Söderquist, L.; Pérez-Pé, R.; Berg, K.A. (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology* 57: 823-836.
123. Pukazhenth B., Pelican K., Wildt D., Howard J. (1999). Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratozoospermic donors to cold-induced acrosomal damage, *Biology of Reproduction*, 61(1):135-141.
124. Quezada, C. A., Pérez, U. D. J. (2004). Sincronización del estro en ovejas mediante esponjas con progesterona y estradiol y fluorogestona, además de ecg. XXVIII Congreso Nacional de Buiatría Morelia, Michoacán, México. Agosto. p. 286.
125. Quintero-Moreno, A., Miró, J., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E. (2003) Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*. 59:1973-1990.
126. Quintero-Moreno, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E. (2004). Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* 61: 673-690.
127. Quintero-Moreno, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E. (2007). Multivariate Cluster Analysis Regression Procedures as Tools to Identify Motile Sperm Subpopulations in Rabbit Semen and to Predict Semen Fertility and Litter Size. *Reproduction in Domestic Animals* 42: 312-319.
128. Ramón M., Soler AJ, Ortiz JA, García-Álvarez O., Maroto-Morales A., Roldan ERS, Garde JJ (2013). Estructura de la población de esperma y fertilidad

masculina: un estudio intraespecífico del diseño y la velocidad del esperma en el ciervo. Biol. Reprod. 89: 110.

129. Rivera, M.M., Quintero-Moreno, A., Barrera, X., Palomo, M.J., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E. (2005). Natural Mediterranean photoperiod does not affect the main parameters of boar-semen quality analysis. *Theriogenology* 64: 934-946.
130. Rivera, M.M., Quintero-Moreno, A., Barrera, X., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E. (2006). Effects of constant, 9 and 16-h light cycles on sperm quality, semen storage ability and motile sperm subpopulations structure of boar semen. *Reproduction in Domestic Animals* 41: 386-393.
131. Robbiins, R.K., Saacke, R.G., Chandler, P.T. (1976). Influence of freeze rate, thaw rate mid glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in french straws. *J Anim. Sci.*, 42 (1): 145-154.
132. 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.
133. Salamon S. (1990). *Inseminación Artificial de ovejas y cabras*. Madrid. Ed. Acribia. p 1-171.
134. Salamon, S. Maxwell, W. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62: 77–111.
135. Salisbury, G.; Van Demark, N.; Lodge, J. (1978). *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial en los bóvidos*. Zaragoza, Acriba. 831 p.
136. Salazar, R., Gómez Coronado C.A. (2013). *Tesis Universidad Central de Ecuador*. 80p.
137. Sanford, L.; Dickson, K. A. (2008). Prolactin regulation of testicular development and sexual behavior in yearling Suffolk rams. *Small Ruminant Research* 77:1-10.
138. Senger, PL. (2003). Spermatogenesis en *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2ª ed. Pullman, Current Conceptions, 10: 220-225 p.
139. Sikka S.C. (2001). Relative impact of oxidative stress on male reproductive function, *Current Medicinal Chemistry*, 8(7):851-862.
140. Silva, V., Fassana, F. (2017). Evaluación de semen en corderos, borregos y carneros Merino Australiano a campo y en equipo computarizado de análisis de semen Tesis de grado. Udelar Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. 71 p.
141. Stornelli, M.A., De la Sota, R.L. (2005). Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. Instituto de Teriogenología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Pp.: 15-22.
142. SUL (2018). *Inicio de la producción ovina en el Uruguay*. Disponible en: <http://www.sul.org.uy/sitio/Inicios-de-la-producci%C3%B3n-ovina-en-Uruguay>. Fecha de consulta: 16 de abril de 2018.
143. Ungerfeld, R. (2002). Control hormonal del carnero En: *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea, V2, 291-293 p.

144. Vantman, D., Koukoulis, G., Dennison, L., Zinaman, M., Sherins, R.J., (1988). Computer- assisted semen analysis: Evaluation of method and assessment of the influence of sperm concentration on linear velocity determination. *Fertility and Sterility* 49: 510-515.
145. Varner, D.D., Vaughan, S.D., Johnson, L. (1991). Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoa motility. *Am. J. Vet. Res.* 52: 224–230.
146. Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57: 149-179.
147. Vila, L. (1984). Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico. *Biol Clin Hematol.* 6: 227-236.
148. Vila, L., Carretero, F. (1985). Manejo de congeladores programables. *Biol Clin Hematol.* 7: 61-67.
149. Vila, L., García, T. (1983). Revisión de los aspectos termodinámicos y cinéticos implicados en un proceso de criopreservación biológica. *Biol Clin Hematol.* 5: 135-142.
150. Watson P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen, *Animal Reproduction Science*, 60-61: 481-492.
151. 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.
152. Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L. (2007). Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 67: 661-672.
153. Yamasaki Maza, A., Pedraza Villagómez, P., Peralta, M., Yong, G., Rothsuh Villanueva, J. E., Yamasaki Maza, L. (2005). Diseño y construcción de electroeyaculador para ovinos y caprinos. *REDVET*, 1-23. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080505.html>. Fecha de consulta: 25 de setiembre 2018.
154. Yanagimachi, R. (1988). Mammalian fertilization. En: Knobil, E. y Neil, J y col. *The Physiology of Reproduction*. New York. Eds Raven Press. 135-185 p.
155. Yániz JL, Palacín I., Vicente-Fiel S., Sánchez-Nadal JA, Santolaria P. (2015). Estructura de la población de esperma en carneros de fertilidad de campo alto y bajo. *Anim Reprod. Sci.* 156: 128–134.