



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**TÉCNICA DE COLECCIÓN Y CRIO-RESISTENCIA SEMINAL EN
CHIVOS: MASAJE TRANSRECTAL DE LAS GLÁNDULAS
SEXUALES ACCESORIAS GUIADO POR ULTRASONIDO
(TUMASG) VS ELECTROEYACULACIÓN**

Criorresistencia seminal en chivos comparando dos métodos de colección

MARÍA MADELEINE GUERRERO GUTIERREZ

TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCION ANIMAL

**URUGUAY
2021**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**TÉCNICA DE COLECCIÓN Y CRIO-RESISTENCIA SEMINAL EN
CHIVOS: MASAJE TRANSRECTAL DE LAS GLÁNDULAS
SEXUALES ACCESORIAS GUIADO POR ULTRASONIDO
(TUMASG) VS ELECTROEYACULACIÓN**

Criorresistencia seminal en chivos comparando dos métodos de colección

MARÍA MADELEINE GUERRERO GUTIERREZ

Julia Giriboni, Ph.D.
Directora de Tesis

Rodolfo Ungerfeld, Ph.D.
Codirector

Julián Santiago Moreno, Ph.D.
Codirector

Estela Castillo, Ph.D.
Codirectora

2021

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Alejo Menchaca, DMV, Ph.D.
Instituto Reproducción Animal de Uruguay
Montevideo, Uruguay

Adolfo Toledano Díaz, DMV, Ph.D.
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
Madrid, España

Jeferson Ferreira da Fonseca, DMV, Ph.D.
Empresa Brasileira de Investigación Agropecuaria
Juiz de Fora, Brasil



**Unidad de Posgrados
-Oficina de Posgrados-**

**FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados ACTA**

DE APROBACIÓN DE TESIS

DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

**TÉCNICA DE COLECCIÓN Y CRIO-RESISTENCIA SEMINAL EN
CHIVOS: MASAJE TRANSRECTAL DE LAS GLÁNDULAS
SEXUALES ACCESORIAS GUIADO POR ULTRASONIDO
(TUMASG) VS ELECTROEYACULACIÓN**

Por: DCV. María Madeleine GUERRERO GUTIÉRREZ

DIRECTORA DE TESIS : Dra. Julia Giriboni
CODIRECTORES DE TESIS: Dr. Rodolfo Ungerfeld
Dr. Julián Santiago-Moreno
Dra. Estela Castillo

TRIBUNAL:

Presidente: DR. ALEJO MENCHACA

Segundo miembro: DR. JEFFERSON FERREIRA FONSECA

Tercer miembro: DR. ADOLFO TOLEDANO-DÍAZ

Fallo del tribunal: APROBADA CON MENCIÓN

Esta tesis aborda un tema de interés vinculado a la colecta de semen de machos cabríos mediante estrategias menos invasivas. La tesis aporta información novedosa y relevante sobre la base de la comparación de dos métodos de colecta de semen aplicados durante la estación de monta y durante la estación de anestro. El documento presentado reúne todas las condiciones necesarias para una tesis de maestría con un artículo enviado a una revista internacional. Durante la defensa la estudiante demostró solvencia y suficiencia científica, con conocimientos profundos sobre la temática abordada y respondió de manera correcta las preguntas del tribunal. Ha culminado su maestría con una tesis de gran calidad. Por esta razón la tesis ha sido aprobada con mención.

MIÉRCOLES 2 DE JUNIO

PLATAFORMA ZOOM

El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta),
Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primer lugar a Dios, por guiarme a lo largo de mi vida y haberme ayudado a tomar la decisión de introducirme en el ámbito de la investigación.

A mis directores de tesis Julia Giriboni y Rodolfo Ungerfeld por su paciencia, dedicación, constancia y apoyo a lo largo de todo el trabajo. Gracias por todo lo que me brindaron, la confianza que depositaron en mí y todo lo que me enseñaron. Ambos son grandes maestros, excelentes personas y realmente agradezco que formen parte de mi vida profesional.

A mis co-directores Julian Santiago-Moreno y Estela Castillo por sus aportes y sugerencias que enriquecieron esta maestría.

A Milton por estar siempre a disposición y cuidar tan bien de los animales.

A todas las personas que colaboraron en la parte experimental de la tesis, a Livia Varena, a Patricia Silveira, a Mariana Kako, a María Noel Viera, a Florencia Beracochea y a los estudiantes de grado de la Facultad de Veterinaria.

Y en especial dedicarle este trabajo y agradecerle a mi familia por el apoyo incondicional que me brindaron durante este proceso.

ÍNDICE

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	
AGRADECIMIENTOS.....	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	
PUBLICACIÓN.....	
RESUMEN.....	
ABSTRACT.....	

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Técnicas de colección de semen.....	2
1.1.2. Vagina artificial.....	2
1.1.3. Electroeyaculación	2
1.1.4. Masaje transrectal de las glándulas sexuales accesorias guiado por ultrasonido	3
1.2. Problemas de bienestar animal con el uso de la electroeyaculación	4
1.3. Influencia de los métodos de colecta en la calidad seminal	4
1.4. Estacionalidad reproductiva en pequeños rumiantes y su relación con las glándulas sexuales accesorias.....	5
1.5. Los estudios hemodinámicos de las glándulas sexuales accesorias y su relación con el semen.....	6
1.6. Características del plasma seminal y su relación con la criorresistencia del semen	7
1.7. Criorreservación del semen	8
2. HIPÓTESIS.....	10
3. OBJETIVOS	11
3.1. Objetivo general.....	11
3.2. Objetivos específicos	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1. Animales y manejo.....	12
4.2. Diseño experimental y procedimientos generales	12
4.3. Procedimientos: EE y TUMASG	12
.....	14
4.4 Ecografía Doppler	14
4.5. Evaluación seminal, congelación y descongelación.....	15
4.6. Análisis estadístico	16
5. RESULTADOS	18
5.1. Experimentos	18
5.1.2. Semen fresco y descongelado durante la estación reproductiva.....	18
5.1.3. Evaluación Doppler	18
5.2.1. Semen fresco y descongelado fuera de estación reproductiva	23
5.3. Criorresistencia del semen.....	23
6. DISCUSIÓN	27
7. CONCLUSIONES.....	30
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
9. ANEXO I.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

ALH	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza
BA	Bienestar animal
CR	Criorresistencia
PD	Power doppler
EE	Electroeyaculación
HOST	Test de incubación en un medio hipo osmótico
IA	Inseminación artificial
ISAS	Sistema de análisis de semen integrado
IP	Índice de pulsatilidad
IR	Índice restrictivo
MM	Motilidad espermática de masa
OT	Oxitocina
OTR	Receptor de oxitocina
PS	Plasma seminal
S/D	Relación sístole diástole
TUMASG	Masaje de las glándulas sexuales accesorias guiado por ultrasonido
VA	Vagina artificial
VAP	Velocidad media de trayectoria
VCL	Velocidad curvilínea
VDF	Final de la velocidad diastólica

VSL	Velocidad lineal
VSP	Velocidad sistólica máxima

PUBLICACIÓN

El siguiente artículo generado a partir de la información obtenida en los experimentos de esta Tesis fue enviado a publicación e incluido como Anexo I al final del documento:

Guerrero-Gutiérrez M, Ungerfeld R, García Kako Rodríguez M, Santiago-Moreno J, Giriboni J. Cryoresistance of buck' sperm collected with transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands is greater than sperm collected with electroejaculation. Enviado a publicación *Theriogenology*. El manuscrito se encuentra bajo revisión, actualmente con *major revisions*.

RESUMEN

La electroeyaculación (EE) es una técnica ampliamente utilizada ya que permite colectar semen de machos en una gran cantidad de situaciones. Sin embargo, su aplicación provoca estrés y dolor. Como método alternativo a la EE, se utilizó el masaje transrectal de las glándulas sexuales accesorias guiado por ultrasonido (TUMASG), que requiere menos estímulos eléctricos (o ninguno), afectando menos el bienestar animal. Las técnicas utilizadas para colectar semen pueden modificar la composición y calidad del mismo, incluyendo el plasma seminal. A su vez, tanto la cantidad como la composición del plasma seminal determinan la criorresistencia del semen cuando éste se somete a un proceso de congelación/descongelación. En esta Tesis se comparó la criorresistencia del semen de chivos colectado por TUMASG y EE durante la estación reproductiva (Experimento 1) y fuera de la estación reproductiva (Experimento 2). El semen se colectó en 10 chivos de Gabón con ambos métodos en cada estación. El tiempo necesario para la eyaculación, el número de pulsos eléctricos aplicados, la suma de los pulsos eléctricos aplicados * voltaje y el número total de vocalizaciones emitidas durante la colección por cada animal, fueron registrados. En las muestras frescas se procedió al análisis de diferentes parámetros seminales, incluyendo volumen, concentración, motilidad de masa, el vigor espermático, porcentaje de espermatozoides motiles, con motilidad progresiva, con membrana funcional, porcentaje de espermatozoides vivos y normales. En las muestras de semen congeladas se evaluaron las mismas variables. En el Experimento 1, TUMASG requirió más tiempo ($P < 0.0001$) pero menos pulsos eléctricos ($P < 0.0001$) y una menor suma de pulsos*voltaje que EE ($P < 0.0001$). Los chivos vocalizaron menos veces durante TUMASG que durante EE ($P = 0.0002$). El semen colectado con TUMASG tuvo mayor concentración espermática ($P = 0.001$), cantidad total de espermatozoides ($P = 0.04$), motilidad de masa ($P = 0.003$), número total de espermatozoides móviles ($P = 0.04$) y un mayor número total de espermatozoides con motilidad ($P = 0.04$), mayor número total de espermatozoides con membrana funcional ($P = 0.02$) y mayor número total de espermatozoides con morfología normal que el semen colectado con EE ($P = 0.02$, respectivamente). Después del proceso de congelación-descongelación, los espermatozoides colectados con TUMASG tuvieron mayor vigor espermático ($P < 0.05$), número total de espermatozoides móviles ($P = 0.01$) y espermatozoides con motilidad progresiva ($P = 0.01$), mayor porcentaje de espermatozoides móviles ($P = 0.02$) y de espermatozoides con membrana funcional ($P = 0.01$), mayor número total de espermatozoides con membrana funcional ($P = 0.002$) y mayor número total de espermatozoides con morfología normal ($P = 0.03$) que el semen colectado con EE. En el Experimento 1 los espermatozoides colectados con TUMASG tuvieron mayor criorresistencia para casi todas las variables consideradas que cuando fueron colectados con EE. En el Experimento 1 se realizó la evaluación ecográfica Doppler de la irrigación de la glándula vesicular antes y después de la colecta de semen mediante ambos métodos en donde el IR, la VSP y la VDF medidos antes de la colecta de semen, no fueron diferentes con

TUMASG o EE. Se observó una interacción antes de la colecta en la S/D, siendo mayor con EE que con TUMASG. La VSP y VDF después de la colecta fueron mayores con TUMASG que con EE. En el Experimento 2, TUMASG requirió menos pulsos eléctricos ($P < 0,0001$) y una menor suma de pulsos * voltaje ($P = 0,0002$) que con EE. Sin embargo, el resto de las características espermáticas evaluadas no difirieron según el método de colecta tanto en las muestras de semen fresco como descongelado, y no hubo diferencias en la criorresistencia de ninguna variable. En conclusión, el TUMASG fue eficaz para colectar el semen en chivos durante la estación reproductiva, ya sea para usarlo fresco o para criopreservarlo, afectando menos el bienestar animal que la EE. Sin embargo, fuera de la estación reproductiva, las ventajas del TUMASG sobre la EE tanto en el bienestar animal como en la calidad espermática y la criorresistencia fueron menores que durante la estación reproductiva.

ABSTRACT

Electroejaculation (EE) is a widely used technique that allows the collection of semen from males in a large number of situations. However, its application causes stress and pain. As an alternative method to EE, our working group used transrectal massage of the accessory sex glands guided by ultrasound (TUMASG), which requires less (or no) electrical stimuli, affecting less animal welfare. The techniques used to collect semen can modify its composition and quality, including seminal plasma. In turn, both the quantity and the composition of the seminal plasma determine the cryosistance of the semen when it is subjected to a freezing/thawing process. This Thesis compares the cryoresistance of goat semen collected by TUMASG and EE during the reproductive season (Experiment 1) and outside the reproductive season (Experiment 2). Semen was collected from 10 Gabonese goats with both methods at each station. The time required for ejaculation, the number of electrical pulses applied, the sum of the electrical pulses applied * voltage, and the total number of vocalizations emitted during the collection by each animal was recorded. In fresh samples, different seminal parameters were analyzed, including volume, concentration, mass motility, quality of motility, percentage of motile sperm, with progressive motility, with functional membrane, percentage of live and normal sperm. The same variables were evaluated in the frozen semen samples. In Experiment 1, TUMASG required more time ($P < 0.0001$) but fewer electrical pulses ($P < 0.0001$) and a lower sum of pulses * voltage than EE ($P < 0.0001$). The goats vocalized fewer times during TUMASG than during EE ($P = 0.0002$). The semen collected with TUMASG had a higher sperm concentration ($P = 0.001$), total number of sperm ($P = 0.04$), mass motility ($P = 0.003$), total number of motile sperm ($P = 0.04$) and a greater total number of spermatozoa with motility ($P = 0.04$), greater total number of spermatozoa with functional membrane ($P = 0.02$) and greater total number of spermatozoa with normal morphology than semen collected with EE ($P = 0, 02$, respectively). After the frozen-thawed process, the spermatozoa collected with TUMASG had a higher quality of motility ($P < 0.05$), the total number of motile spermatozoa ($P = 0.01$) and spermatozoa with progressive motility ($P = 0.01$), a higher percentage of motile spermatozoa ($P = 0.02$) and spermatozoa with functional membrane ($P = 0.01$), had greater total number of spermatozoa with functional membrane ($P = 0.002$) and greater total number of spermatozoa with normal morphology ($P = 0.03$) than the semen collected with EE. In Experiment 1 the spermatozoa collected with TUMASG had higher cryosistance for almost all the variables considered than when they were collected with EE. In Experiment 1, the Doppler ultrasound evaluation of the vesicular gland irrigation was carried out before and after semen collection using both methods, where the IR, VSP, and VDF measured before semen collection were not different with TUMASG or EE. An interaction was observed before the collection in the S / D, being greater with EE than with TUMASG. The VSP and VDF after collection were higher with TUMASG than with EE. In Experiment 2, TUMASG required fewer electrical pulses ($P < 0.0001$) and a lower sum of pulses * voltage ($P =$

0.0002) than with EE. However, the rest of the sperm characteristics evaluated did not differ according to the collection method in both fresh and frozen-thawed samples, and there were no differences in the cryosistance of any variable. In conclusion, the TUMASG was effective to collect semen from goats during the reproductive season, either to use it fresh or to cryopreserve it, affecting animal welfare less than the EE. However, outside the reproductive season, the advantages of TUMASG over EE both in animal welfare and sperm quality and cryosistance were lower than during the reproductive season.

1. INTRODUCCIÓN

Las biotecnologías reproductivas comprenden técnicas que favorecen la eficiencia reproductiva y las tasas de mejoramiento genético de los animales, contribuyendo de esta forma a desarrollar la producción animal y a incrementar favorablemente la multiplicación y transporte de material genético. Asimismo, algunas biotecnologías permiten conservar las especies en peligro de extinción, a través del almacenamiento de recursos genéticos únicos que puedan disponerse con relativa facilidad para su utilización. Hace ya unos años, la criopreservación de semen es una herramienta indispensable en la producción animal ya que se prolonga la capacidad fecundante de los espermatozoides al disminuir o detener su motilidad y reacciones metabólicas (Salamon & Maxwell, 2000).

El semen se puede conservar en estado líquido o congelado dependiendo el objetivo con el que se vaya a utilizar. Para su uso a corto plazo alcanza con conservarlo en estado líquido a temperatura ambiente, o a bajas temperaturas (refrigerado). En cambio, para periodos largos de conservación, se recurre a la congelación de dosis seminales mantenidas a -196°C (semen congelado) (Evans & Maxwell, 1990). Esta forma de conservación permite que el semen pueda ser utilizado mucho tiempo después de su colecta y también en lugares alejados al lugar donde se colectó.

Aunque la criopreservación de semen tiene muchas ventajas desde el punto de vista práctico, se debe considerar que los espermatozoides experimentan daño durante el proceso de congelación y descongelación. Se ha descrito que el semen con alto porcentaje de espermatozoides móviles, viables y morfológicamente normales, al ser sometido a técnicas convencionales de criopreservación experimentan una reducción de la motilidad espermática, fenómeno que se asocia con modificaciones en el metabolismo celular y daños en la membrana plasmática (Watson, 2000). El proceso de criopreservación incluye 5 etapas: la dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación. Mientras que algunas fases son relativamente inocuas, otras son muy estresantes para los espermatozoides, como es el caso de la refrigeración y la congelación (Watson, 1995). Además las etapas de enfriamiento iniciales del proceso de criopreservación exponen a los espermatozoides a la fluctuación de membrana y a cambios osmóticos que eventualmente conducen a un estado de estrés oxidativo (Martorana et al. 2014). Cuando los espermatozoides están expuestos a bajas temperaturas, aumenta la producción celular de especies reactivas de oxígeno y esto se traduce en una mayor susceptibilidad del ADN y la membrana plasmática al ataque oxidativo mitocondrial en comparación con el semen fresco (Ortega et al. 2010). Cada etapa del protocolo de criopreservación desempeña una interacción especial con la estructura, la función de la membrana y con el metabolismo celular (Hammerstedt et al. 1990).

1.1. Técnicas de colección de semen

Para llevar a cabo técnicas de inseminación artificial (IA) o para congelamiento y almacenamiento para su posterior utilización, primero es necesario realizar la colecta de semen. Aunque a menudo se pasa por alto, la colección de semen es el primer paso importante del proceso de criopreservación (Leboeuf et al. 2000). Existen varios métodos de colección seminal. Dentro de los más comunes y estudiados en pequeños rumiantes se encuentran la vagina artificial (VA) o la electroeyaculación (EE) (Jiménez-Rabadán et al. 2016). También se han desarrollado alternativas a la EE, como el masaje transrectal, pero esta técnica ha estado limitada al uso en toros (Palmer et al. 2004). Sin embargo, recientemente se ha desarrollado el uso del masaje transrectal guiado por ultrasonidos de las glándulas sexuales accesorias (TUMASG) para coleccionar semen en pequeños rumiantes domésticos y salvajes (Santiago-Moreno et al. 2013; Ungerfeld et al., 2015; Abril-Sánchez et al. 2017).

1.1.2. Vagina artificial

Para la colección de un eyaculado de buena calidad es necesario usar un método eficaz de colecta de semen. En los animales domésticos, el método de opción es la VA (Leboeuf et al. 2000). La VA consiste en una parte externa rígida de 15-20 cm x 5-6 cm y una camisa interna de látex o caucho, ésta se repliega y asegura sobre los extremos del tubo externo con bandas elásticas. Entre la cubierta y la camisa se forma un compartimento hermético donde se agrega agua a 50 – 55 °C. A uno de los extremos de la VA se adosa una copa de colección de semen. Al momento de la colecta del semen la temperatura interna de la vagina debe mantenerse a 42-45 °C (Steyn, 2003). Este método es el que imita en forma más precisa las condiciones de la monta natural y tiene como ventajas la obtención de eyaculados de alta calidad, con baja contaminación, es de bajo costo y permite evaluar la conducta sexual (Barth et al. 2004). Tiene la desventaja que se requiere un animal relativamente entrenado y dócil, y que la eficiencia de la colecta depende del comportamiento sexual del animal.

1.1.3. Electroeyaculación

La EE fue introducida en el campo de la medicina veterinaria como método para la colección de semen en diferentes animales desde mitad del siglo pasado (Dziuk et al. 1954). El procedimiento de EE consiste en la aplicación de estímulos eléctricos en el recto de los machos, mediante el uso de una sonda con electrodos orientados hacia la región ventral, administrando pulsos de baja tensión e intensidad eléctrica (Palmer et al. 2005a). Esta aplicación estimula al sistema nervioso simpático desencadenando la eyaculación. Para que esto ocurra actúan tres grupos de nervios: un grupo superior que se distribuye de forma

pósterio-superior a los testículos; un grupo medio que inerva al epidídimo e inicio del vaso deferente y un grupo inferior que inerva a los conductos deferentes superiores y la parte distal del epidídimo (Semans & Langworthy, 1938). Por otro lado, la estimulación de los nervios hipogástricos provoca la contracción de los vasos deferentes, vesículas seminales y músculos de la próstata (Bors, 1952) y de esta manera se induce la emisión de semen desde la cola del epidídimo hacia la uretra prostática.

La EE permite coleccionar muestras de semen en situaciones variadas, por ejemplo, fuera de la estación reproductiva en especies de reproducción estacional (Lincoln & Davidson, 1977), a machos de especies silvestres (Santiago-Moreno et al. 2009), machos pre púberes (Lacuesta et al. 2015), o machos que han sido aislado de hembras (Giriboni et al. 2017). Sin embargo, la EE tiene efectos negativos sobre el bienestar animal (BA) ya que la aplicación de pulsos eléctricos produce aumentos en las concentraciones séricas de cortisol, temperatura rectal, pulso, respiración y frecuencia cardíaca, así como modificaciones en variables hematológicas y bioquímicas indicadoras de la respuesta de estrés (Damian & Ungerfeld, 2011; Abril-Sánchez et al. 2017).

Aunque la EE es un método efectivo de colección de semen (Palmer, 2005a), el estrés y el dolor inducidos han llevado a cuestionar su uso en varios países (Hopper et al. 2014). Por tanto, recientemente se ha desarrollado para pequeños rumiantes una técnica de colección de semen con masaje transrectal de las glándulas sexuales accesorias guiado por ultrasonido (TUMASG) (Santiago-Moreno et al. 2013) que se puede utilizar alternativamente a la EE (Ungerfeld et al. 2015; Abril-Sánchez et al. 2017).

1.1.4. Masaje transrectal de las glándulas sexuales accesorias guiado por ultrasonido

El TUMASG se utilizó inicialmente en elefantes, basado en el uso de la ecografía para observar la ampolla del conducto deferente y monitorizar la respuesta eyaculatoria (Hildebrandt et al. 1998).

El procedimiento consiste en masajear la ampolla del conducto deferente con la sonda ultrasónica, alternando con vigoroso masaje manual de la glándula bulbouretral, presionándola contra la sínfisis del pubis. Simultáneamente, la parte peneana, perineal y pélvica se masajean para facilitar el transporte del semen. La ampolla del conducto deferente es monitoreada por ecografía para evaluar cuando está vacía, evitando así estímulos eléctricos innecesarios como resultado de la detención del procedimiento cuando no haya más semen disponible para la colección. El contenido de la ampolla del conducto deferente aparece anecoico y tiene forma tubular antes del procedimiento TUMASG, pero después de la eyaculación se vuelve más ecogénico, más pequeño en tamaño y en forma de serpentina (Santiago-Moreno et al. 2013). En general, para lograr la eyaculación el TUMASG requiere pocos pulsos eléctricos o incluso ninguno, lo que induce una respuesta de estrés menor y probablemente menos dolorosa que la EE (Ungerfeld et al. 2015) y, por lo tanto, tendría un impacto negativo menor sobre el BA. En un estudio reciente, Abril-Sánchez et al. (2017) observaron en chivos que el TUMASG es menos estresante y probablemente menos doloroso

que la EE sin afectar el vigor espermático. Sin embargo, los efectos del TUMASG sobre la calidad del semen varían entre especies (Abril-Sánchez et al. 2019). Por ejemplo, en muflones (Ungerfeld et al. 2015) y en la cabra montés (Coloma et al. 2013), el uso de EE da como resultado la obtención de semen con mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad que el colectado mediante TUMASG.

1.2. Problemas de bienestar animal con el uso de la electroeyaculación

El estrés es una perturbación real o percibida de la homeostasis o del bienestar psicológico de un animal, desencadenada por la percepción de diversos factores denominados estresores (Moberg, 2000). El uso de EE induce respuestas de estrés típicas, como fisiológicas (aumentos de la temperatura rectal, frecuencias respiratorias y cardíacas), ocurren alteraciones endocrinas (aumento de la concentración de cortisol sérico), bioquímicas (cambios en el hematocrito y hemoglobina) y hematológicas (Damián & Ungerfeld, 2011; Abril-Sánchez et al. 2017).

Por otro lado, el dolor está asociado a alteraciones del comportamiento dentro de las cuales las más obvias incluyen inquietud y vocalizaciones mientras se aplican procedimientos dolorosos (Napolitano et al. 2020). Las vocalizaciones suelen ser indicadores confiables de dolor (Prunier et al. 2013). En este sentido, las vocalizaciones están asociadas a la aplicación de los pulsos eléctricos durante la EE en toros (Whitlock et al. 2012) y carneros (Damián & Ungerfeld, 2011). Más aún, la EE induce vocalizaciones en pequeños rumiantes incluso bajo anestesia general (Fumagalli et al. 2015). Por lo descripto anteriormente y otras evidencias la EE ha sido considerada como dolorosa por varios autores (Bath, 1998; Orihuela et al. 2009).

En algunos países, se requiere el uso de anestesia general para reducir el estrés y el dolor asociados con la EE (Falk et al. 2001), pero la información disponible sobre su uso es muy escasa y tiene algunas desventajas. Los rumiantes anestesiados deben estar en ayunas durante 12 a 24 h para prevenir el timpanismo y la regurgitación ruminal (Carroll & Hartsfield, 1996), lo que agrega tiempo de manipulación. Además, la anestesia puede afectar el comportamiento normal; por ejemplo, disminuye el apetito y los animales pueden permanecer afectados durante muchas horas (Provenza et al. 1994). Por tanto, TUMASG se puede utilizar alternativamente a la EE para colectar semen, ya que no requiere de anestesia.

1.3. Influencia de los métodos de colecta en la calidad seminal

La EE ejerce su acción estimulante directamente sobre los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos y sobre las glándulas anexas, por lo que aumenta la proporción de plasma seminal (PS) en el eyaculado (Austin et al. 1961; Hulet et al. 1964). Por lo tanto, cuando se colecta semen con EE la concentración espermática es menor que cuando se colecta con VA en chivos (Memon et al. 1986) y toros (León et al. 1991). Asimismo, la

cantidad de espermatozoides vivos y la motilidad de masa es menor que la del semen colectado con VA (Memon et al. 1986; León et al. 1991). Además, tanto en chivos (Jimenez-Rabadán et al. 2012) como en toros (León et al. 1991), los espermatozoides de los eyaculados colectados con EE son menos resistentes a la criopreservación que los espermatozoides colectados con VA. En cambio en carneros, se observó mayor cantidad de espermatozoides con la membrana plasmática intacta y con una función mitocondrial normal en el semen colectado con EE que en el colectado con VA (Ledesma et al. 2014). En este contexto, se debe considerar que la composición del PS tiene un papel crucial en muchas funciones de los espermatozoides. En efecto, la composición del PS afecta directamente la motilidad (Maxwell et al. 2007) y la viabilidad de los espermatozoides después de la criopreservación (Soleilhavoup et al. 2014) así como los resultados de preñez (Bromfield, 2016; Druart et al. 2019).

Por otra parte, el semen colectado con masaje transrectal de la región ampular tiene menos espermatozoides con motilidad que el colectado con EE en toros (Palmer, 2005b). En la misma dirección, mediante TUMASG se obtiene menor volumen de semen con menor motilidad espermática que con EE en muflones anestesiados (Ungerfeld et al. 2015). Esta variabilidad en la calidad de semen puede deberse a que el método de colección modifica la secreción de las glándulas sexuales accesorias y por lo tanto la de PS (Yeoman et al. 1998; Christensen et al. 2011). En contraposición, Sarsaifi et al. (2015) obtuvieron una mejor calidad espermática en el semen descongelado de toros colectado mediante masaje transrectal que en el colectado mediante EE durante la estación reproductiva. Como los espermatozoides se obtuvieron de los mismos animales con ambos métodos, las principales diferencias pueden estar relacionadas con el proceso de eyaculación. Estas diferencias también pueden explicarse parcialmente por las diferencias en el estímulo recibido, ya que en el caso del masaje éste se produce en una zona del recto y en el caso de la EE una intensa contracción muscular en la zona pélvica (Sarsaifi et al. 2015).

En función de lo anterior, es necesario entender la base fisiológica de las diferencias observadas en diferentes especies en respuesta a la inducción de la eyaculación. De igual forma, es necesario determinar las características de los espermatozoides colectados utilizando diferentes técnicas diseñadas para reducir el dolor.

1.4. Estacionalidad reproductiva en pequeños rumiantes y su relación con las glándulas sexuales accesorias

En carneros y chivos existen grandes variaciones estacionales que se manifiestan en el comportamiento sexual, dimensiones testiculares (masa y volumen), secreción hormonal y en la espermatogénesis (Langford et al. 1987; Delgadillo et al. 2004). En estas especies, en los animales que habitan zonas templadas, los cambios en el fotoperiodo influyen sobre el comportamiento sexual y la actividad testicular (Menchaca & Ungerfeld, 2010). El cambio de estaciones es percibido principalmente a través de cambios del día a día en la cantidad de horas de luz (fotoperiodo), es decir, perciben el aumento o la disminución

de la duración del día (Malpaux, 2006). El estímulo del fotoperiodo se transforma en una señal endógena a través de la secreción de melatonina por parte de la glándula pineal (Chemineau et al. 2008). El aumento de la cantidad de horas de oscuridad, es decir, la disminución de la duración del día estimula la actividad reproductiva (Delgadillo y Chemineau, 1992). El fotoperiodo decreciente provoca un estímulo de liberación de GnRH, y como consecuencia de las gonadotrofinas (LH y FSH). Este aumento de secreción de LH y FSH genera un aumento del tamaño testicular (Lincoln et al. 1981), de la actividad de las glándulas accesorias (Goeritz et al. 2003) y de la calidad seminal. Los chivos Gabón, raza utilizada en esta Tesis, tienen una concentración máxima de testosterona y su actividad reproductiva aumenta de noviembre a abril (desde finales de primavera hasta mediados de otoño) en Uruguay (Giriboni et al. 2017).

La actividad de las glándulas sexuales accesorias también aumenta durante la estación reproductiva (Santiago-Moreno et al. 2005), por lo que la contribución relativa de las glándulas al eyaculado, y las posibles consecuencias del uso de una u otra técnica sobre la calidad del semen también puede diferir si el semen se colecta durante la estación reproductiva o fuera de la misma.

1.5. Los estudios hemodinámicos de las glándulas sexuales accesorias y su relación con el semen

La ecografía es una técnica de diagnóstico que se aplica a gran escala en la práctica veterinaria dado que permite investigar en forma precisa la integridad de los órganos y el seguimiento de los procesos fisiológicos (Abdel-Razek & Ali, 2005). En particular la ecografía Power Doppler (PD) permite estudiar con precisión la perfusión tisular y determinar variaciones en los flujos sanguíneos (Zelli et al. 2013). El flujo sanguíneo se puede mostrar como un gráfico que representa el análisis espectral Doppler de la velocidad de la sangre, en un área pequeña de un vaso sanguíneo (Doppler espectral; Ginther, 2007). La tecnología se basa en frecuencias en las que los rayos de ultrasonido reflejados por los eritrocitos en movimiento varían a medida que las células se mueven con diferente velocidad y también si se acercan o se alejan del transductor de ultrasonido. El ángulo en el que se emiten los rayos de ultrasonido al encontrar el vaso sanguíneo, o la sangre en movimiento se denomina ángulo Doppler o ángulo de insonación. Por lo general, se establece un ángulo Doppler de $<60^\circ$ y se obtienen formas de onda espectrales / ciclos cardíacos consecutivos.

Por ejemplo, Camela et al. (2017) informaron que los índices de flujo sanguíneo de las arterias ilíacas internas, que irrigan los órganos reproductores ubicados en la región pélvica son importantes predictores de la motilidad progresiva de los espermatozoides, la motilidad de masa y la concentración espermática en carneros. Se propuso también que los parámetros de flujo sanguíneo medidos en la arteria testicular, como la resistencia al flujo sanguíneo (índice de resistencia, IR) y el índice de pulsatilidad (IP) son predictores importantes de la calidad del semen (Gumbsch et al. 2002; Carrillo et al. 2012; Zelli et al. 2013). El IR es el índice que refleja la resistencia del flujo arterial originado por el vaso

distal al vaso medido (Wood 2010), mientras que el IP evalúa la resistencia del vaso sanguíneo medido. Hedia et al. (2019) documentaron cambios estacionales en los índices de velocidad de la arteria testicular en carneros. Los valores medios para el IR fueron más bajos durante el otoño e invierno (estación reproductiva), aumentaron significativamente en primavera y alcanzaron valores máximos en verano (fuera de estación reproductiva). En el mismo sentido, el IP de carneros aumentó significativamente durante el invierno y luego alcanzó un pico en el verano. Los aumentos en el volumen de flujo sanguíneo testicular (es decir, una disminución tanto en IR como en IP) durante la estación reproductiva se debieron principalmente al marcado aumento en el volumen testicular y las concentraciones plasmáticas de 17β -estradiol registradas durante ese período. Además, los valores de IR y IP se correlacionaron negativamente con la concentración de células espermáticas y la motilidad progresiva.

Los estudios en esta área, sin embargo, son preliminares y los resultados no son del todo concluyentes. Por otro lado, el estudio hemodinámico de las glándulas sexuales accesorias es importante dado que estos órganos contribuyen a la producción de los fluidos que constituyen el PS (Gonçalves et al. 2014) y por lo tanto influyen sobre la calidad del semen que se colecta. En vista de esto, el estímulo distinto causado por diferentes métodos de colecta de semen sobre las glándulas sexuales accesorias tanto por el TUMASG como por la EE puede contribuir en la obtención de información sobre la fisiología de los órganos reproductores masculinos, aumentando el valor predictivo y la sensibilidad de las evaluaciones ultrasonográficas para determinar la fertilidad.

1.6. Características del plasma seminal y su relación con la criorresistencia del semen

El PS está compuesto por secreciones del testículo, epidídimo y de las glándulas sexuales accesorias (las glándulas vesiculares, glándulas bulbouretrales y próstata) siendo fundamental en la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Soleilhavoup et al. 2014). Inicialmente se creía que las secreciones del PS actuaban simplemente como un medio de transporte para los espermatozoides, pero actualmente es muy claro que tiene una profunda influencia sobre la fisiología del semen (Maxwell et al. 2007; Laflamme & Wolfner 2013). El PS difiere entre especies (Mortarino et al. 1998; Villemure et al. 2003; Caballero et al. 2012), así como entre machos dentro de la misma especie (Strzezek et al. 2005), y contiene una gran variedad de componentes bioquímicos (Mann & Lutwak-Mann, 1981). Esto incluye abundantes carbohidratos, lípidos, proteínas y aminoácidos, enzimas, vitaminas hidrosolubles y minerales (La Falci et al. 2002).

La criopreservación del semen caprino presenta algunas dificultades dado que las glándulas bulbouretrales secretan lipasas. Estas lipasas interactúan con algunos componentes de los diluyentes, produciendo sustancias tóxicas para los espermatozoides, lo que reduce la efectividad la congelación (Coloma et al. 2010). Para tratar de minimizar estos efectos se recomienda la eliminación del PS mediante la centrifugación (lavado del semen) (Leboeuf

et al. 2000). Sin embargo, se trata de evitar esto por ser un proceso tedioso y puede dar lugar a pérdida o daño de los espermatozoides (Tuli y Holtz, 1994).

Los componentes del PS son esenciales para mantener el metabolismo, el pH y la osmolaridad de los espermatozoides, siendo las proteínas los contribuyentes más importantes en el mantenimiento de la función de los espermatozoides de mamíferos (Maxwell et al. 2007). La mayoría de las proteínas del PS son producidas en las glándulas vesiculares (Dostalova et al. 1995; Rodríguez-Martínez, 2003). Las variaciones en el perfil proteico del PS a lo largo del año se relacionan con variaciones en el porcentaje de espermatozoides con motilidad, con la viabilidad espermática y con la concentración espermática del eyaculado, lo que como se mencionó anteriormente, aumentan durante la estación reproductiva (Cardozo et al. 2006). Las proteínas en el PS están implicadas en varios procesos como la preservación de la viabilidad de los espermatozoides en su proceso de maduración, y las interacciones con el tracto reproductivo femenino. Además, participa en la protección y mantenimiento de la membrana celular frente a agentes externos, incluyendo eventos que producirían una prematura capacitación y/o reacción acrosómica, como ocurre durante el proceso de criopreservación (Manjunath et al. 2002). En el mismo sentido, las proteínas contenidas en el PS, denominadas como GSP en el macho cabrío (*goat seminal plasma proteins*; Villemure et al. 2003), son importantes para la adecuada funcionalidad de los espermatozoides (Cardozo et al. 2006), protegiéndolos del choque térmico (Colás et al. 2009).

El efecto crioprotector del PS de los carneros aumenta cuando se lo colecta durante la estación reproductiva comparado con la colección fuera de la misma (Leahy et al. 2010). En el mismo sentido, la efectividad de la criopreservación seminal varía de acuerdo a la estación del año, lo que probablemente se asocia con la concentración de testosterona (Coloma et al. 2011). Por lo tanto, la cantidad y composición del PS varía estacionalmente e influye tanto sobre la calidad del semen fresco como en la calidad del semen congelado-descongelado.

1.7. Criopreservación del semen

Como ya se mencionó, la colección de semen para la criopreservación es un paso clave para los programas de IA en pequeños rumiantes. El método de colección seminal (Marco-Jiménez et al. 2005; Giuliano et al. 2008) y la estación del año en varios mamíferos (Fiser & Fairfull, 1983; Koonjaenak et al. 2007) afectan la respuesta de los espermatozoides a la congelación-descongelación. Por ejemplo, Marco-Jiménez et al. (2005) observaron que los espermatozoides colectados por EE fueron más resistentes al daño por el choque de térmico que los colectados mediante el uso de VA. Por el contrario, Jiménez-Rabadán et al. (2012) obtuvieron una mejor calidad de semen colectado con VA después de la descongelación frente al de EE en ciervos.

Por otro lado, se sabe que la susceptibilidad de los espermatozoides a los daños por la congelación varía entre individuos de una misma especie. Tales diferencias entre individuos han sido reportadas en el toro (Parkinson & Withfield, 1987), caballo (Janett et al. 2003) y cerdo (Yeste et al. 2013). En el cerdo existe una base genética para la variación en la calidad del semen después de la descongelación, habiéndose identificado marcadores moleculares ligados a genes que controlan la congelabilidad del semen (Benson et al. 2012). En este sentido, Casas et al. (2010) determinaron que la proteína HSP90 del cerdo está presente en el semen de “buenos congeladores” en mayor proporción que en los de “malos congeladores”. Tales diferencias en la calidad, podrían estar relacionadas con una distinta composición lipídica o proteica de la membrana plasmática, o podrían deberse a variaciones en la composición del PS o a la funcionalidad de las glándulas accesorias (Holt et al., 2005).

Como se mencionó anteriormente, algunas de las proteínas presentes en PS pueden desempeñar un papel importante en la prevención del daño causado por el choque térmico (Barrios et al. 2005), los cambios en su proporción relativa en el PS pueden influir en la criorresistencia de las muestras de semen. Teniendo en cuenta toda esta información, las posibles ventajas de TUMASG pueden estar relacionadas no solo con el BA, sino también con mejorar la calidad del semen, incluida su criorresistencia.

2. HIPÓTESIS

La calidad del semen fresco de chivos de Gabón es mejor cuando se colecta mediante TUMASG durante y fuera de la estación reproductiva que cuando se colecta mediante EE.

La técnica de colecta del semen -TUMASG o EE- modifica la criorresistencia del semen de chivos tanto durante como fuera de la estación reproductiva.

El TUMASG es un procedimiento menos estresante y probablemente menos doloroso que la EE sin afectar la calidad del semen de chivos.

El flujo sanguíneo de las glándulas sexuales accesorias de chivos difiere cuando el semen se colecta mediante TUMASG o EE.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Comparar la respuesta de estrés, el flujo sanguíneo de la rama de la arteria deferente, las características del semen fresco y la criorresistencia del semen de chivos colectado mediante TUMASG o EE durante el otoño (estación reproductiva) y la primavera (estación no reproductiva).

3.2. Objetivos específicos

Comparar el espermiograma básico del semen fresco de chivos colectado mediante TUMASG o electroeyaculación tanto durante estación reproductiva como fuera de esta.

Comparar la criorresistencia del semen de chivos colectado mediante TUMASG o electroeyaculación tanto durante estación reproductiva como fuera de esta.

Comparar la respuesta de estrés de chivos durante la colección de semen durante estación reproductiva como fuera de esta cuando el semen se colecta mediante TUMASG o EE.

Comparar las variables cuantitativas (IR, S/D, VDF y VSP) del flujo sanguíneo de las glándulas sexuales accesorias durante la colecta de semen de chivos mediante TUMASG o EE durante la estación reproductiva.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Animales y manejo

Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Veterinaria (Universidad de la República, Uruguay). Los estudios se realizaron en la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay (35° S, Montevideo, Uruguay) con 10 chivos adultos de Gabón [$36,9 \pm 1,7$ kg (media $\pm$ SEM)], una raza que se ha utilizado en estudios anteriores similares relacionados con el desarrollo de TUMASG (Ungerfeld et al. 2016; Abril-Sánchez et al. 2017). El Experimento 1 se realizó durante la estación reproductiva (marzo, otoño en el hemisferio sur) y el Experimento 2 fuera de la estación reproductiva (octubre, primavera en el hemisferio sur). Todos los animales utilizados en estos estudios se sometieron previamente varias veces a ambas técnicas, EE y TUMASG. Antes del inicio del experimento, se colectó semen de todos los machos para asegurar la eliminación de las reservas de semen envejecido.

4.2. Diseño experimental y procedimientos generales

En cada Experimento se colectó semen con TUMASG en cinco animales, y con EE en los otros cinco. Dos días después, cada procedimiento se aplicó a los otros cinco animales, por lo que finalmente se colectó semen de todos los animales con ambas técnicas, en un diseño cruzado. Debido a la disponibilidad del equipo, el electroeyaculador (y la sonda) utilizados durante la época de reproducción y la temporada de no reproducción diferían (ver sección 4.3), ambos estudios se consideraron y analizaron como experimentos independientes. Durante la colección de semen se registró el tiempo requerido para la eyaculación considerando el inicio de la aplicación del procedimiento hasta no visualizar más emisión de semen. Asimismo, se registró el número total de pulsos eléctricos aplicados (ver sección 4.3). Además, se calculó la suma de pulsos*voltaje aplicados. En el Experimento 1 también se registró el número de vocalizaciones y se midieron los índices vasculares de la rama de la arteria deferente a la glándula vesicular mediante ecografía Doppler espectral. Finalmente, en cada experimento se evaluó el espermograma básico del semen fresco y descongelado y se calculó su CR.

4.3. Procedimientos: EE y TUMASG

En el Experimento 1 la EE se realizó utilizando un electroeyaculador automático equipado con una sonda de 16,0 cm x 2,5 cm, con tres electrodos longitudinales (ePORVAC, modelo e325, Argentina) (Fig 1A). Cuando se insertó la sonda y se ubicó en su lugar, se aplicó un voltaje creciente para comenzar con pulsos eléctricos de 2 V, aumentando 1 V hasta cada 10 pulsos. La sonda no se movió, por lo que no se aplicó masaje. Cada pulso duró

2 s, con intervalos de 2 s entre ellos. Previo a realizar la electroeyaculación, se vació el recto de heces y se lavó el prepucio para evitar que se contaminara la muestra seminal. Se aplicó un gel a la sonda antes de introducir la misma en el recto para proceder a la colección de la muestra de semen con el animal de pie. En el Experimento 2, la EE se realizó con un equipo provisto de una sonda de 30,0 cm x 1,5 cm, con electrodos circulares de 1 cm (Fuhijira Industry, Tokio, Japón) (Fig 1B), cubiertos con cinta aisladora en la parte superior para evitar estimular la región dorsal del animal. Los machos fueron estimulados con 10 pulsos de 2 V, aumentando 1 V en cada serie de 10 pulsos, hasta la eyaculación. El equipo contaba con control manual de pulsos, aplicando pulsos de 2 s alternados con periodos de descanso de aproximadamente 2 s.

El procedimiento TUMASG requirió inmovilizar los animales en la posición cuadrúpeda. Después de recortar el pelo alrededor del pene y limpiar el área circundante con suero fisiológico, se procedió a la exteriorización del mismo manualmente; se mantuvo sobresaliendo, sujetándolo con la ayuda de una gasa apenas caudal al glande. Esto último garantizaba que la uretra no colapsara durante la eyaculación (Santiago-Moreno et al., 2013). Brevemente, las glándulas bulbouretrales, las vesículas seminales y los conductos deferentes fueron observados por ultrasonido en tiempo real utilizando una sonda lineal de 7,5 MHz (United Imaging, 120 IUStar 160 modelo Vet, Ucrania) (Figs 2A, 2B y 2C). La sonda ecográfica también se utilizó para masajear vigorosamente en la ampolla del conducto deferente, con un movimiento hacia adelante y hacia atrás para promover la expulsión de los espermatozoides. El procedimiento se repitió varias veces hasta que se produjo la eyaculación. Si el animal no eyaculaba, se aplicaba uno o dos pulsos eléctricos de 4 a 7 V durante 3 s, seguido nuevamente por el masaje con la sonda ecográfica. El proceso fue monitoreado mediante ecografía de la ampolla de conducto deferente, verificando que al finalizar las glándulas estaban completamente vacías. El contenido de la ampolla del conducto deferente antes de comenzar con el procedimiento TUMASG, aparece anecoico y de forma tubular, pero después de la eyaculación se vuelve más ecogénico, más pequeño en tamaño y en forma de serpentina (Santiago-Moreno et al. 2013). Todos los machos eyacularon cuando fueron sometidos a cada una de las técnicas y para asegurar que las muestras de semen no se contaminen con suciedad, el pene fue exteriorizado antes del inicio de la colección ya sea por TUMASG o EE. Ningún animal orinó durante la recolección de semen usando TUMASG o EE.

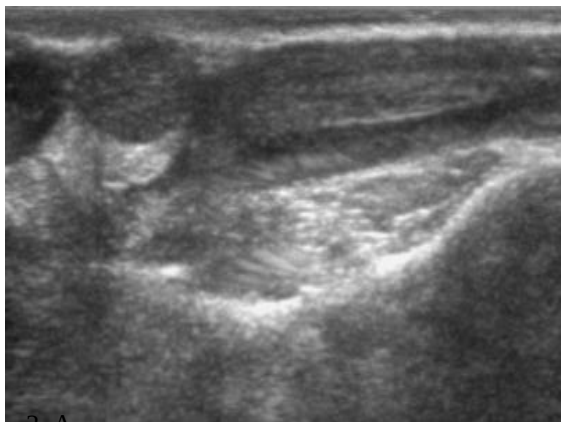


1. A

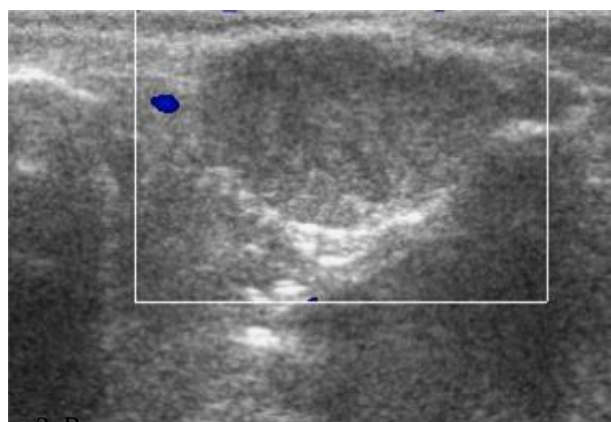


1. B

Figura 1. Electroeyaculador automático con electrodos longitudinales (A) v electroeyaculador manual con electrodos circulares (B)



2. A



2. B



2. C

Tomado de Gofur, M. R. (2015)

Figura 2. Ultrasonograma de las glándulas bulboetrales, próstata (A) y glándula vesicular (B) e imagen de las glándulas sexuales accesorias disecadas (C) de chivos (a-vesícula seminal b-Uretra y parte diseminada de la glándula prostática c-glándula bulbouretal d-vejiga urinaria)

4.4 Ecografía Doppler

En el Experimento 1 se realizó evaluación ecográfica Doppler de la irrigación de la glándula vesicular antes y después de la colecta de semen mediante ambos métodos, utilizando el mismo equipo que se utilizó para realizar el TUMASG. Se midieron los índices vasculares de la rama de la arteria deferente a la glándula vesicular mediante ecografía Doppler espectral. Se registró la velocidad sistólica máxima (VSP), el final de la velocidad diastólica (VDF), el índice resistivo (IR) y la relación sístole/diástole (S/D). Para hacer estas determinaciones, se colocó el calibrador en el centro del lumen de la arteria de tal manera que abarcara al menos 2/3 del diámetro del vaso y el ángulo de insonación se ajustó a $< 60^\circ$ (Fig 3). Los índices de Doppler espectral se obtuvieron mediante rastreo manual utilizando el instrumento ultrasónico software en un mínimo de dos ondas consecutivas formadas. Todos los índices vasculares se determinaron automáticamente.

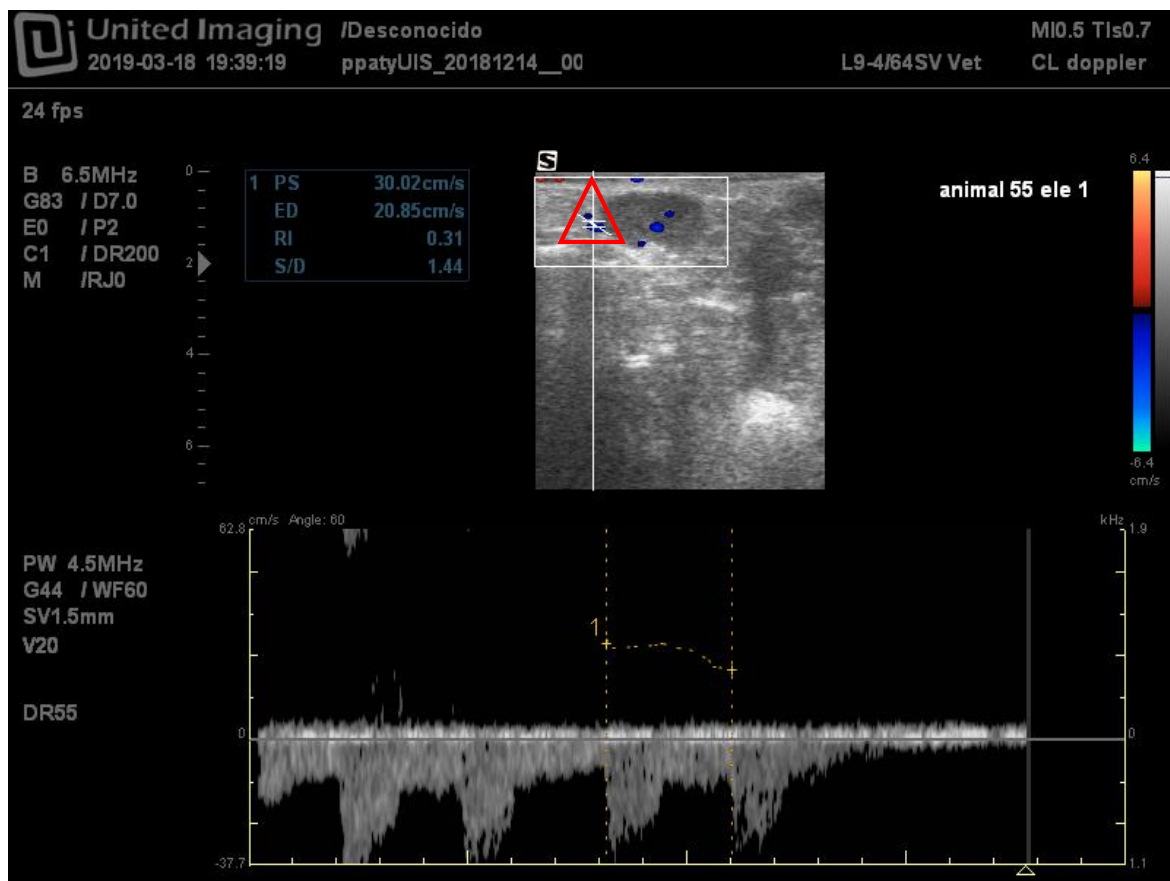


Fig 3. Evaluación ecográfica Doppler espectral de la rama de la arteria deferente a la glándula vesicular de chivos. El triángulo rojo en el panel representa la posición del área central del vaso sanguíneo (azul claro) con las aberturas para determinar la traza espectral del flujo sanguíneo, su velocidad e índice.

4.5. Evaluación seminal, congelación y descongelación

En ambos procedimientos (TUMASG y EE) y experimentos las muestras se colectaron directamente en copas de vidrio templadas a 37 °C. En el semen fresco (etapa 1) se determinó el volumen eyaculado y la motilidad de masa (escala de 0 a 5). Además, el vigor espermático se determinó subjetivamente, y los porcentajes de espermatozoides con motilidad y con motilidad progresiva, la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad lineal (VSL), la velocidad media de trayectoria (VAP) y la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) se determinaron utilizando un software específico [Sistema de Análisis de Semen Integrado (ISAS, Valencia, España)]. Las variables cinéticas se determinaron en un mínimo de 4 campos y 400 pistas de semen (tasa de adquisición de imágenes de 25 cuadros/s). Luego se determinó la concentración espermática utilizando una cámara de Neubauer, y se determinó el porcentaje de espermatozoides con morfología y acrosoma normal mediante observación subjetiva (Pursel & Johnson 1974). Por último, se evaluó la integridad funcional de la membrana espermática después de 15 min de incubación en un medio hipo osmótico (HOST) (Jeyendran et al. 1984) y se determinó el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional. Además, se calculó el número total de espermatozoides eyaculados, el número total de espermatozoides con motilidad, con motilidad progresiva, con membrana funcional, con morfología y con acrosoma normal.

El semen se congeló en pajuelas de 0,5 mL con un total de 50 millones de espermatozoides después de agregar un diluyente de semen comercial (Andromed, Minitube, Tienfenbach, Alemania), siguiendo el protocolo de congelación descrito por Beracochea et al. (2018). Después de agregar el diluyente (etapa 2), se colocaron las muestras en un recipiente de vidrio con agua a 20 °C que se colocó en heladera hasta alcanzar los 5 °C (curva de enfriamiento de aproximadamente 90 min, 1,7 °C/min). Luego, las pajuelas se colocaron en vapores de nitrógeno (5 cm sobre la superficie del nitrógeno en una caja de almacenamiento criogénica, aproximadamente -120 °C) durante 10 min (11,5 °C/min) antes de sumergirlos en nitrógeno líquido (-196°C). Las muestras se almacenaron a -196°C durante 6 semanas y luego se descongelaron (etapa 3) en baño maría a 37 °C durante 30 s. Nuevamente, se determinaron los porcentajes de espermatozoides con motilidad y con motilidad progresiva, VCL, VSL, VAP y ALH mediante el ISAS. En las muestras de semen descongeladas también se determinaron los porcentajes de espermatozoides con morfología y acrosoma normal, y con membrana funcional.

Para cada variable registrada en el semen descongelado (excepto para las variables cinéticas) se calculó un índice de criorresistencia (CR), como $CR = (\text{semen descongelado/semen fresco}) \times 100$.

4.6. Análisis estadístico

La distribución normal de datos se probó con la prueba de Shapiro-Wilk, y se aplicaron transformaciones cuando los datos no se distribuían normalmente antes de analizarlos. Cada transformación se presenta en las Tablas correspondientes, en las que tanto el dato bruto y los datos transformados, están incluidos. Todos los procedimientos y

variables espermáticas que fueron distribuidos normalmente, o normalizados con transformaciones adecuadas, se compararon entre tratamientos con un modelo mixto (proc mixed; SAS, University Edition), incluyendo la técnica de colección como efecto principal y el día de colecta como efecto aleatorio. Las variables Doppler se compararon con un modelo mixto, incluida la técnica de colecta como efecto principal, el tiempo (antes y después de la colecta de semen) como medida repetida, y la interacción entre tratamiento y tiempo. Los datos que no se normalizaron (Vigor espermático y motilidad de la masa de espermatozoides) se compararon con Prueba de Wilcoxon. Los datos brutos que se transformaron se presentan como media de mínimos cuadrados $\pm$ error estándar de la media y datos brutos normalmente distribuidos o transformados se presentan como media $\pm$ error estándar de la media. Las diferencias medias se consideraron significativas cuando hubo una $P \leq 0.05$, y las tendencias para diferencias cuando fue $0.05 < P \leq 0.1$.

5. RESULTADOS

5.1. Experimentos

En este experimento se observó que el TUMASG requirió más tiempo, pero requirió menos pulsos eléctricos y la suma de pulsos*voltaje fue menor que con la EE. Los chivos vocalizaron menos veces durante el TUMASG que durante la EE todo esto se muestra en la Tabla 1.

5.1.2. Semen fresco y descongelado durante la estación reproductiva.

El semen fresco y descongelado colectado durante la estación reproductiva (Experimento 1) con TUMASG tuvo mayor concentración espermática, motilidad de masa, cantidad total de espermatozoides eyaculados, espermatozoides con motilidad, con membrana funcional y con morfología normal (Tabla 2). Después del proceso de congelación-descongelación, los espermatozoides colectados con TUMASG tuvieron una mayor vigor espermático, mayores porcentajes de espermatozoides motiles y espermatozoides con membrana funcional, cantidad total de espermatozoides con motilidad, de espermatozoides con motilidad progresiva, espermatozoides con membrana funcional y espermatozoides con morfología normal (Tabla 3).

5.1.3. Evaluación Doppler

El VPS y el VDF no difirieron según la técnica (VPS: $48,7 \pm 2,5$ cm / s vs $49,6 \pm 2,6$ cm / s; VDF: $44,3 \pm 3,1$ cm / s vs $43,8 \pm 3,3$ cm / s para EE y TUMASG respectivamente). Sin embargo, ambos tendieron a aumentar después de la eyaculación (VPS: $46,7 \pm 2,2$ cm / s frente a $51,6 \pm 2,2$ cm / s; VDF: $41,2 \pm 2,7$ cm / s frente a $46,9 \pm 2,7$ cm / s; $p = 0,077$ para ambas variables). El IR no difirió según el tiempo del tratamiento (EE: $0,1 \pm 0,1$; TUMASG: $0,3 \pm 0,1$). Hubo una interacción significativa entre las técnicas y el momento (antes o después de la eyaculación) en la relación S / D ($P = 0,02$). Si bien disminuyó después de EE ($1,18 \pm 0,05$ vs $1,05 \pm 0,05$; $P = 0,02$), no hubo cambios con TUMASG ($1,15 \pm 0,05$ vs $1,20 \pm 0,05$, ns).

Tabla 1. Tiempo requerido para la eyaculación, número de pulsos eléctricos y suma de pulsos*voltaje durante la colecta de semen con electroeyaculación (EE) o masaje transrectal de las glándulas sexuales accesorias guiado por ultrasonido (TUMASG) durante la estación reproductiva (Experimento 1) y fuera de la estación reproductiva (Experimento 2) en chivos. El Experimento 1 también incluyó el registro del número de vocalizaciones durante cada procedimiento.

	Datos brutos		Transformación	Datos transformados		P
	EE	TUMASG		EE	TUMASG	
Experimento 1						
Tiempo (min)	5,0 ± 0,9	10,5 ± 0,9	$\sqrt{x}$	2,24 ± 0,14	3,21 ± 0,15	<0,0001
Pulsos	54,1 ± 2,9	3,8 ± 3,0		-	-	<0,0001
Suma de pulsos*voltage	238,7 ± 20,4	18,3 ± 21,5	$\sqrt{x}$	15,3 ± 0,88	3,4 ± 0,93	<0,0001
Vocalizaciones	36,3 ± 4,8	4,8 ± 5,0	$\sqrt{x}$	5,69 ± 0,55	1,83 ± 0,58	0,0002
Experimento 2						
Tiempo (min)	6,7 ± 1,2	8,6 ± 1,2	Log (x)	0,77 ± 0,09	0,87 ± 0,09	ns
Pulsos	53,7 ± 3,1	2,2 ± 3,1		-	-	<0,0001
Suma de pulsos*voltage	212,7 ± 30,4	11,8 ± 30,4	Log (x)	2,21 ± 0,11	1,00 ± 0,11	0,0002

Los datos brutos que se transformaron se presentan como media de mínimos cuadrados ± error estándar de la media y datos brutos normalmente distribuidos o transformados se presentan como media ± error estándar de la media; ns: no significativo.

Tabla 2. Características de las muestras de semen fresco colectadas con electroeyaculación (EE) o masaje transrectal de las glándulas sexuales accesorias guiado por ultrasonido (TUMASG) durante la estación reproductiva en chivos.

	Datos brutos		Transf	Datos transformados		P
	EE	TUMASG		EE	TUMASG	
Volumen (μL)	1355,6 ± 469,1	1986,0 ± 501,4	Log (x)	3,11 ± 0,10	3,18 ± 0,11	ns
Concentración espermática x10 ⁶ /mL	592,9 ± 232,5	1699,1 ± 258,7	1/ x	0,002 ± 0,0002	0,0008 ± 0,0002	0,001
Cantidad total de Espermatozoides (x10 ⁶)	776,4 ± 1427,1	4425,7 ± 1591,9	1/ x	0,0015 ± 0,0002	0,0008 ± 0,0002	0,04
Vigor espermático (0-5)	3,1 ± 0,5	3,2 ± 1,1	-	-	-	ns
Motilidad de masa (0-5)	1,4 ± 0,7	2,9 ± 0,7	-	-	-	0,003
Motilidad espermática						
Porcentaje (%)	88,9 ± 5,4	75,0 ± 6,5	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	681,1 ± 505,8	2796,8 ± 565,5	Log (x)	2,80 ± 0,14	3,22 ± 0,15	0,04
Espermatozoides con motilidad progresiva						
Porcentaje (%)	64,0 ± 5,5	48,6 ± 6,1	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	497,0 ± 320,7	1667,8 ± 358,5	Log (x)	2,65 ± 0,15	3,00 ± 0,17	ns
Espermatozoides con membrana funcional						
Porcentaje (%)	67,5 ± 6,0	65,7 ± 6,3	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	516,6 ± 582,4	2547,8 ± 650,2	Log (x)	2,70 ± 0,13	3,17 ± 0,15	0,02
Espermatozoides con morfología normal						
Porcentaje (%)	62,3 ± 2,9	65,9 ± 3,0	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	473,0 ± 690,6	2547,7 ± 771,9	1/ x	0,002 ± 0,0004	0,001 ± 0,0004	0,02
VCL (μm/s)	119,5 ± 5,4	104,9 ± 6,0	-	-	-	ns
VSL (μm/s)	77,5 ± 5,3	66,0 ± 6,0	-	-	-	ns
VAP (μm/s)	90,6 ± 6,4	78,1 ± 7,2	-	-	-	ns

AHL (μm)	$3,3 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,2$	-	-	-	ns
-----------------------	---------------	---------------	---	---	---	----

Transf: transformación; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad lineal; VAP: velocidad media de trayectoria y ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; (-): no evaluado. Los datos brutos que se transformaron se presentan como media de mínimos cuadrados $\pm$ error estándar de la media y datos brutos normalmente distribuidos o transformados se presentan como media $\pm$ error estándar de la media; ns: no significativo.

Tabla 3. Características de las muestras de semen descongeladas colectadas con electroeyaculación (EE) o masaje transrectal guiado por ultrasonido de las glándulas sexuales accesorias (TUMASG) durante la estación reproductiva en chivos.

	Datos Brutos		Transf	Datos Transformados		P
	EE	TUMASG		EE	TUMASG	
Vigor espermático (0-5)	$0,8 \pm 0,5$	$1,2 \pm 1,1$	-	-	-	$<0,05$
Motilidad espermática						
Porcentaje (%)	$20,1 \pm 6,4$	$45,8 \pm 7,1$	-	-	-	0,02
Total ($\times 10^6$)	$131,4 \pm 399,6$	$1757,6 \pm 446,7$	Log (x)	$2,02 \pm 0,18$	$2,90 \pm 0,20$	0,01
Espermatozoides con motilidad progresiva						
Porcentaje (%)	$7,8 \pm 5,5$	$15,5 \pm 6,1$	Arcos $\sqrt{(x/100)}$	$0,24 \pm 3,00$	$5,46 \pm 3,36$	ns
Total ($\times 10^6$)	$47,8 \pm 103,7$	$513,3 \pm 116,0$	Log (x)	$1,37 \pm 0,23$	$2,34 \pm 0,26$	0,01
Espermatozoides con membrana funcional						
Porcentaje (%)	$19,7 \pm 3,0$	$28,8 \pm 3,2$	-	-	-	0,01
Total ($\times 10^6$)	$153,2 \pm 460,4$	$1310,8 \pm 511,5$	Log (x)	$2,12 \pm 0,16$	$2,80 \pm 0,17$	0,002
Espermatozoides con morfología normal						

Porcentaje (%)	68,2 ± 3,4	66,4 ± 3,8	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	455,3 ± 672,1	2523,8 ± 750,8	1/ <i>x</i>	0,002 ± 0,0004	0,001 ± 0,001	0,03
VCL (µm/s)	48,6 ± 7,0	56,3 ± 7,7	-	-	-	ns
VSL (µm/s)	26,7 ± 4,3	26,9 ± 4,8	-	-	-	ns
VAP (µm/s)	30,6 ± 5,1	34,0 ± 5,7	-	-	-	ns
AHL (µm)	1,9 ± 0,2	2,3 ± 0,2	-	-	-	ns

Transf: transformación; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad lineal; VAP: velocidad media de trayectoria y ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; (-): no evaluado. Los datos brutos que se transformaron se presentan como media de mínimos cuadrados ± error estándar de la media y datos brutos normalmente distribuidos o transformados se presentan como media ± error estándar de la media; ns: no significativo

5.2. Experimento 2

El tiempo necesario para la eyaculación no se vio afectado por la técnica de colección de semen. El número de pulsos eléctricos y la suma de pulsos*voltaje fueron mayores con EE que con TUMASG (Tabla 1).

5.2.1. Semen fresco y descongelado fuera de estación reproductiva

El semen fresco y semen descongelado colectado fuera de estación reproductiva con TUMASG y EE no se observó ninguna diferencia en las variables (Tabla 4 y 5).

5.3. Criorresistencia del semen

La criorresistencia del semen colectado por TUMASG y EE durante y fuera de la estación reproductiva fue evaluada midiendo algunas variables que se presentan en la Tabla 6. En el Experimento 1, los espermatozoides colectados con TUMASG tuvieron mayor CR en el vigor espermático, en el porcentaje de espermatozoides con motilidad, y de espermatozoides con motilidad progresiva y tendieron a tener mayor CR en espermatozoides con integridad de la membrana. En el Experimento 2, no hubo diferencias en la CR de ninguna variable.

Tabla 4. Características de las muestras de semen fresco colectadas con electroeyaculación (EE) o masaje transrectal de las glándulas sexuales accesorias guiado por ultrasonido (TUMASG) fuera de estación reproductiva en chivos.

	Datos brutos		Transf	Datos transformados		P
	EE	TUMASG		EE	TUMASG	
Volumen (μL)	2199,8 ± 301,2	1836,8 ± 368,6	-	-	-	ns
Concentración espermática (x10 ⁶ /mL)	2031,1 ± 1188,4	2464,0 ± 2910,9	$\sqrt{x}$	37,35 ± 7,07	33,71 ± 7,45	ns
Cantidad total de espermatozoides (x10 ⁶)	5000,4 ± 1847,8	3429,7 ± 1947,8	$\sqrt{x}$	57,11 ± 12,87	47,27 ± 13,56	ns
Vigor espermático (0-5)	3,7 ± 0,5	3,7 ± 1,3	-	-	-	ns
Motilidad masal (0-5)	2,8 ± 0,5	2,5 ± 1,3	-	-	-	ns
Motilidad espermática						
Porcentaje (%)	71,2 ± 5,4	69,6 ± 5,6	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	2813,1 ± 937,5	1973,7 ± 988,3	Log (x)	2,97 ± 0,33	2,86 ± 0,33	ns
Espermatozoides con motilidad progresiva						
Porcentaje (%)	47,9 ± 6,6	45,3 ± 6,6	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	1874,2 ± 758,8	1339,7 ± 783,3	Log (x)	2,72 ± 0,37	2,71 ± 0,37	ns
Espermatozoides con membrana funcional						
Porcentaje (%)	66,4 ± 6,0	76,4 ± 6,2	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	3309,1 ± 1351,7	3010,0 ± 1424,8	Log (x)	2,92 ± 0,34	2,90 ± 0,35	ns
Espermatozoides con morfología normal						
Porcentaje (%)	69,1 ± 6,5	68,1 ± 6,5	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	3693,8 ± 1485,2	2049,7 ± 1554,1	Log (x)	2,94 ± 0,36	2,84 ± 0,36	ns
VCL (μm/s)	95,6 ± 7,5	98,0 ± 6,4	-	-	-	ns
VSL (μm/s)	60,8 ± 8,2	68,1 ± 7,1	$\sqrt{x}$	8,10 ± 0,56	7,65 ± 0,65	ns
VAP (μm/s)	65,9 ± 8,4	75,2 ± 7,3	-	-	-	ns
AHL (μm)	2,8 ± 0,2	2,7 ± 0,2	-	-	-	ns

Transf: transformación; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad lineal; VAP: velocidad media de trayectoria y ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; (-): no evaluado. Los datos brutos que se transformaron se presentan como media de mínimos cuadrados ± error estándar de la media y datos brutos normalmente distribuidos o transformados se presentan como media ± error estándar de la media; ns: no significativo

Tabla 5. Características de las muestras de semen descongeladas recolectadas con electroeyaculación (EE) o masaje transrectal guiado por ultrasonido de las glándulas sexuales accesorias (TUMASG) fuera de estación reproductiva en chivos.

	Datos brutos		Transf	Datos transformados		P
	EE	TUMASG		EE	TUMASG	
Vigor espermático (0-5)	0,9 ± 0,5	1,94 ± 1,3	-	-	-	ns
Motilidad espermática						
Porcentaje (%)	20,2 ± 6,2	16,2 ± 6,5	Arcoseno $\sqrt{x}/100$	0,42 ± 0,09	0,39 ± 0,09	ns
Total (x10 ⁶)	956,3 ± 473,0	761,0 ± 490,0	Log (x)	2,02 ± 0,50	2,02 ± 0,49	ns
Espermatozoides con morilidad progresiva						
Porcentaje (%)	47,9 ± 6,6	45,3 ± 6,6	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	215,0 ± 222,7	239,7 ± 218,4	-	-	-	ns
Espermatozoides con membrana funcional						
Porcentaje (%)	48,0 ± 6,5	54,7 ± 6,4	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	2086,8 ± 945,8	2231,8 ± 996,9	Log (x)	2,83 ± 0,31	2,76 ± 0,32	ns
Espermatozoides con membrana funcional						
Porcentaje (%)	71,8 ± 3,2	66,8 ± 3,2	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	3740,7 ± 1498,9	2300,0 ± 1580,0	Log (x)	2,94 ± 0,36	2,87 ± 0,36	ns
VCL (µm/s)	41,3 ± 6,4	38,2 ± 7,5	-	-	-	ns
VSL (µm/s)	20,5 ± 7,1	16,9 ± 8,2	-	-	-	ns
VAP (µm/s)	26,0 ± 7,3	21,4 ± 8,4	$\sqrt{x}$	5,02 ± 0,30	4,63 ± 0,36	ns
AHL (µm)	1,8 ± 0,2	2,0 ± 0,2	-	-	-	ns

Transf: transformación; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad lineal; VAP: velocidad media de trayectoria y ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; (-): no evaluado. Los datos brutos que se transformaron se presentan como media de mínimos cuadrados ± error estándar de la media y datos brutos normalmente distribuidos o transformados se presentan como media ± error estándar de la media; ns: no significativo

Tabla 6. Criorresistencia de muestras de semen colectadas con electroeyaculación (EE) o masaje transrectal guiado por ultrasonido de las glándulas sexuales accesorias (TUMASG) durante la estación reproductiva y fuera de estación en chivos.

Variable	Criorresistencia (estación reproductiva)			Criorresistencia (fuera de estación reproductiva)		
	EE	TUMASG	P	EE	TUMASG	P
Vigor espermático (%)	35,0 ± 6,8	61,3 ± 7,5	0,03	43,1 ± 11,5	49,0 ± 13,9	ns
Motilidad espermática (%)	21,8 ± 6,0	51,2 ± 7,2	-	34,0 ± 9,8	24,6 ± 12,3	ns
Arcsen $\sqrt{x/100}$	0,47 ± 0,07	0,79 ± 0,08	0,009	0,59 ± 0,10	0,44 ± 0,11	ns
Espermatozoides con motilidad progrsiva (%)	13,5 ± 4,7	28,3 ± 4,7	-	10,1 ± 5,2	12,0 ± 6,9	ns
Arcsen $\sqrt{x/100}$	0,30 ± 0,08	0,55 ± 0,09	0,05	0,13 ± 0,11	0,38 ± 0,11	ns
Espermatozoides con membrana funcional (%)	27,9 ± 7,1	44,4 ± 7,6	0,04	74,4 ± 23,3	79,5 ± 23,4	ns
Espermatozoides con morfología normal (%)	89,5 ± 2,4	92,3 ± 2,7	ns	83,2	86,0 ± 14,0	ns

Los datos brutos que se transformaron se presentan como media de minimos cuadrados ± error estándar de la media y datos brutos normalmente distribuidos o transformados se presentan como media ± error estándar de la media; ns: no significativo.

6. DISCUSIÓN

El trabajo realizado durante esta tesis mostró en general que el semen fresco y descongelado colectado durante la estación reproductiva con TUMASG presenta una mejor calidad que el colectado con EE, y es más resistente a los procesos de congelación-descongelación. Esta Tesis aporta nuevos datos sobre la ventajas descritas anteriormente del TUMASG sobre el bienestar animal (Ungerfeld et al. 2015; Abril-Sánchez et al. 2017) y demuestra que el semen colectado con TUMASG tiene mejor calidad que el colectado con EE, especialmente durante la estación reproductiva. Sin embargo, y considerando que la facilidad para responder a TUMASG es específica de la especie (Abril-Sánchez et al., 2019), antes de asumir las ventajas del TUMASG en forma general, éste trabajo debería replicarse en otras especies, y como se demostró en esta Tesis, en diferentes condiciones (por ejemplo, estaciones). Otro aporte destacable es que aunque TUMASG requiere un entrenamiento especializado de los técnicos, parece una alternativa muy interesante para la colección de semen en animales no entrenados, en los que no es posible colectar fácilmente con VA o cuando debe evitarse la EE. Por otra parte el uso de ultrasonido para evaluar el estado de las glándulas sexuales accesorias, específicamente de la ampolla (y por lo tanto la respuesta a la eyaculación) es útil antes de intentar colectar semen para evitar estímulos eléctricos innecesarios.

La ventaja de TUMASG sobre la EE en la calidad del semen difirió según las estaciones, con mayores ventajas durante estación reproductiva, pero leves fuera de la misma. Aunque en esta Tesis la EE se realizó con diferentes equipos en ambas estaciones y por lo tanto, los resultados no se pueden comparar directamente, la diferencia podría estar relacionada principalmente con la capacidad de respuesta de las glándulas sexuales accesorias según su función normal en cada temporada. En este sentido, el tamaño de las glándulas sexuales accesorias aumenta durante la estación reproductiva en la cabra montés ibérica (Coloma et al. 2011; Santiago-Moreno et al. 2013) y en el venado cola blanca (Stewart et al. 2018), coincidiendo con las concentraciones máximas de testosterona. Así, la mayor concentración de testosterona durante la estación reproductiva puede ser uno de los factores que contribuyen a una mayor sensibilidad a esta técnica que a la EE. Por lo que el uso de una técnica que estimule directamente su vaciado podría explicar los mejores resultados. En general, la colección de una mayor cantidad de espermatozoides con mayor resistencia a la congelación-descongelación aumenta el posible impacto de esta técnica, ya que la cantidad de colecciones de semen también podría reducirse para lograr los mismos resultados.

De acuerdo con Giriboni et al. (2017), los chivos Gabón utilizados en esta Tesis tienen una concentración máxima de testosterona en otoño, y su actividad reproductiva aumenta de noviembre a abril (desde finales de primavera hasta mediados de otoño). Por otro lado, se ha demostrado que la administración de oxitocina disminuye el tiempo hasta la eyaculación en toros sometidos a EE (Palmer et al. 2004). En el mismo sentido, la administración de oxitocina antes del procedimiento TUMASG en chivos tendió a disminuir el tiempo de colecta (Ungerfeld et al. 2016). También Ungerfeld et al. (2016)

sugirieron que el estímulo recibido sobre las glándulas sexuales accesorias con el masaje también puede desencadenar la liberación de endógena de oxitocina en toros (Sharma et al. 1973; Peeters et al. 1983) favoreciendo el tránsito de los espermatozoides por los conductos deferentes. Aunque la sensibilidad estacional del tracto genital a la oxitocina no se ha estudiado en rumiantes, la expresión de los receptores de oxitocina es mayor durante la estación reproductiva que durante el resto del año en roedores con reproducción estacional (Liu et al. 2019). Los resultados inmunohistoquímicos mostraron que tanto la oxitocina como sus receptores se encuentran en el citoplasma de células epiteliales y células de músculo liso dentro del epidídimo en estación reproductiva. Adicionalmente, varias regiones del aparato reproductor masculino, incluido el epidídimo, la túnica albugínea, y la vesícula seminal tienen receptores de oxitocina (Filippi et al. 2002). Dado estos antecedentes es posible que TUMASG también desencadene la liberación de oxitocina y que sus efectos positivos sobre la calidad del semen al promover el transporte de los espermatozoides y que por eso sean más importantes durante la estación reproductiva. Por lo tanto, se puede inferir que un estímulo directo sobre las glándulas sexuales accesorias tenga mayor impacto positivo en la composición del eyaculado durante la estación reproductiva debido a las diferencias estacionales tanto en su actividad como en su sensibilidad.

En cuanto a la criopreservación, durante la estación reproductiva, el semen descongelado colectado con TUMASG presento mejor calidad que el semen colectado con EE, coincidiendo con estudios similares en los que se colectó semen de toros mediante masaje transrectal (Sarsaifi et al. 2015). Esta mejor calidad del semen descongelado puede explicarse por la mejor calidad inicial del semen fresco, pero también por la mayor CR de estas muestras. Dado que se colectó semen de los mismos animales con ambos métodos, las diferencias principales pueden estar relacionadas con el proceso de eyaculación, y probablemente, con diferencias en la composición del PS inducidas por el estímulo diferencial recibido por ambos métodos (Sarsaifi et al. 2015) al eliminar la influencia del individuo. Parece que esta mayor calidad del semen de las muestras colectadas con TUMASG durante la estación reproductiva podría estar relacionada principalmente con una mayor capacidad de respuesta de las glándulas sexuales accesorias a la estimulación del masaje durante esta época del año. Es ampliamente conocido que la composición del plasma seminal está directamente relacionada con la criorresistencia de los espermatozoides, queda por determinar si las principales ventajas del uso de TUMASG durante la estación reproductiva probablemente estén relacionadas con diferencias en su composición. En efecto, la composición del PS es una de las principales determinantes de la eficacia de la criopreservación, especialmente mejorando la criorresistencia del semen (Soleihavoup et al. 2014). La interacción del PS con los espermatozoides induce cambios en el metabolismo, unión de proteínas seminales a la superficie de los espermatozoides y remodelación de su membrana plasmática. Aunque no se puede demostrar sin analizar la composición del PS, estos resultados indican que su composición o proporción en sus componentes difiere según el método de colecta empleado, probablemente debido a diferencias en la intensidad de la estimulación de las vesículas seminales, próstata, glándula bulbouretral y ampolla del conducto deferente,

modificando los componentes del PS, y por lo tanto, la capacidad del semen para sobrevivir al procesos de congelación-descongelación.

Existen escasos estudios hemodinámicos de las glándulas sexuales accesorias en pequeños rumiantes como los realizados en esta tesis (Camela et al. 2017). Hasta el momento, no se han publicado resultados en chivos sobre las variables analizadas en este estudio. Tanto VPS y VDF de la rama de los conductos deferentes a la glándula vesicular tendieron a aumentar después de la eyaculación, tanto por la colección con TUMASG como por EE, lo que sugiere que el proceso de eyaculación promovió un aumento de la perfusión sanguínea de la glándula vesicular. Estos hallazgos son consistentes con los de Alonge et al. (2018) y Keener et al. (2000) quienes observaron aumentos en el flujo vascular de la próstata después de la eyaculación en perros y hombres, respectivamente. Nuestros resultados en esta Tesis muestran que la relación S/D disminuyó después de la colección seminal cuando se realizó con EE. La disminución de la relación S/D revela que hubo un mayor aumento en el flujo sanguíneo de la glándula vesicular cuando el semen fue colectado por EE que cuando fue colectado por TUMASG, lo que podría ser consecuencia de un mayor flujo promovido por las contracciones musculares focalizadas. También debe considerarse que el S/D tiene una correlación negativa con cambios en frecuencia cardíaca, los cambios en la frecuencia cardíaca pueden alterar la forma de la onda de flujo y causar cambios significativos en los valores de los índices vasculares (Maulik, 2005). En este sentido, una de las respuestas que se destaca con el uso de EE es el aumento de la frecuencia cardíaca debido al estrés y posiblemente al dolor (Abril-Sánchez et al. 2019). Por tanto, este resultado refuerza el concepto de que la EE induce una mayor respuesta al estrés y/o al dolor que TUMASG.

Otro de las observaciones destacables durante el desarrollo de la tesis es que en ambas estaciones TUMASG implicó el uso de menos pulsos eléctricos, con menor voltaje, induciendo también menos vocalizaciones en la estación reproductiva. Este resultado que muestra que el uso de TUMASG evitó o disminuyó el uso de pulsos eléctricos nos permite proponer que esta puede ser una técnica alternativa práctica para la colección de semen que ofrece ventajas desde el punto de vista del BA y por lo tanto es una opción de gran relevancia que permite colectar semen de buena calidad en chivos, ya sea fresco o para conservarlo.

Finalmente encontramos que los espermatozoides colectados con TUMASG durante la estación reproductiva presentaron mejor calidad, y resistieron en mayor medida los procesos de congelación-descongelación. Aunque estas diferencias fueron claras durante la estación reproductiva, solo hubo diferencias leves fuera de la estación reproductiva. Además, si la cantidad y calidad de semen necesaria no limita su uso (como puede suceder cuando se utiliza semen fresco para IA), TUMASG podría ser la técnica de elección ya que permite obtener suficiente cantidad de semen de buena calidad con menos efectos negativos sobre el BA. Por lo tanto, el semen colectado con TUMASG es de calidad similar al colectado con EE, y en estación reproductiva puede ser efectivamente congelado y/o utilizado eficazmente como alternativa a la EE.

7. CONCLUSIONES

- El semen colectado durante la estación reproductiva mediante TUMASG tuvo mayor calidad, tanto en el fresco como tras el proceso de congelación-descongelación, presentando mayor criorresistencia que el colectado mediante EE en chivos.
- Fuera de la estación reproductiva, la calidad de semen colectado mediante TUMASG solo tuvo ventajas leves con respecto a la calidad del semen colectado mediante EE en chivos.
- El TUMASG parece ser un método muy adecuado para colectar semen durante la estación reproductiva y fuera de la misma para usarlo fresco o para preservarlo con menos efectos negativos sobre el bienestar animal en chivos.
- La disminución de la relación S/D obtenida revela que hubo un mayor aumento en el flujo sanguíneo de la glándula vesicular cuando el semen fue colectado por EE que cuando fue colectado por TUMASG. Por tanto, este resultado refuerza el concepto de que la EE induce una mayor respuesta al estrés y/o al dolor que TUMASG.
- El TUMASG utilizado en chivos durante la estación reproductiva provee de un semen con mayor criorresistencia del mismo. Asimismo, fuera de estación reproductiva la calidad de este no presenta desventajas con respecto a la EE. Como punto a destacar, el uso del TUMASG tiene promisorias ventajas en términos de bienestar animal.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Razek A, Ali A. (2005). Developmental changes of bull (*Bos taurus*) genitalia as evaluated by caliper and ultrasonography. *Reprod Dom Anim* 40:23-27.

Abril-Sánchez S, Freitas-de-Melo A, Beracochea F, Damián J, Giriboni J, Santiago-Moreno, J, Ungerfeld, R. (2017). Sperm collection by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands is less stressful than electroejaculation without altering sperm characteristics in conscious goat bucks. *Theriogenology* 98:82-87.

Abril-Sánchez S, Freitas-de-Melo A, Giriboni J, Santiago-Moreno J, Ungerfeld, R. (2019). Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: a review on welfare problems and alternative techniques. *Anim Reprod Sci* 205:1-9.

Alonge S, Melandri M, Fanciullo L, Lacalandra G, Aiudi G. (2018). Prostate vascular flow: The effect of the ejaculation on the power doppler ultrasonographic examination. *Reprod Dom Anim* 53:110-115.

Austin J, Hupp E, Murphree, R. (1961). Comparison of quality of bull semen collected in the artificial vagina and by electroejaculation. *J Dairy Sci* 44:2292-2297.

Barth A, Arteaga A, Brito L, Palmer C. (2004). Use of internal artificial vaginas for breeding soundness evaluation in range bulls: an alternative for electroejaculation allowing observation of sex drive and mating ability. *Anim Reprod Sci* 84: 315-325.

Bath G. (1998). Management of pain in production animals. *Appl Anim Behav Sci*. 59:147-156.

Benson J, Woods E, Walters E, Critser J. (2012). The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology* 78:1682-1699.

Beracochea F, Viera M, Acevedo L, Santiago-Moreno J, Ungerfeld R. (2018) Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) improves bucks' semen quality during the nonbreeding season. *Reprod Dom Anim* 53:1096-1102.

Bors, E. (1952). Segmental and peripheral innervation of the urinary bladder. *J Nerv Ment Dis* 116:572-578.

Brodbelt D, Blissitt K, Hammond R, Neath P, Young L, Pfeiffer D, Wood J. (2008). The risk of death: the confidential enquiry into perioperative small animal fatalities. *Vet Anaesth Analg* 35:365-373.

Bromfield J. (2016). A role for seminal plasma in modulating pregnancy outcomes in domestic species. *Reproduction* 152:223-32.

Caballero I, Parrilla I, Almiñana C, Del Olmo D, Roca J, Martínez E, Vázquez J. (2012). Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies. *Reprod Dom Anim* 47:12-21.

Camela E, Nociti R, Santos V, Macente B, Maciel G, Feliciano M, Vicente W, Gill I, Bartlewski P, Olivera M. (2017). Ultrasonographic characteristics of accessory sex glands and spectral Doppler indices of the internal iliac arteries in peri- and post-pubertal Dorper rams raised in a subtropical climate. *Anim Reprod Sci* 184:29-35

Cardozo J, Fernández-Juan M, Forcada F, Abecia A, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez J. (2006). Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology* 66:841-850.

Carrillo J, Soler M, Lucas X, Agut A. (2012). Colour and pulsed Doppler ultrasonographic study of the canine testis. *Reprod Dom Anim* 47:655-659.

Carroll G, Hartsfield S. (1996). General anesthetic techniques in ruminants. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 12:627-661.

Casas I, Sancho S, Ballester J, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Fábrega A, Rodríguez-Gil J, Bonet, S. (2010). The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. *Theriogenology* 74:940-950.

Chemineau P, Guillaume D, Migaud M, Thiéry J, Pellicer-Rubio M, Malpoux B. (2008). Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reprod Dom Anim* 43: 40-47.

Christensen B, Asa C, Wang C, Vansandt L, Bauman K, Callahan, M., Jens J, Ellinwood N. (2011). Effect of semen collection method on sperm motility of gray wolves (*Canis lupus*) and domestic dogs (*C. l. familiaris*). *Theriogenology* 76:975-980.

Coloma M, Gómez-Brunet A, Velázquez R, Toledano-Díaz A, López-Sebastián A, Santiago-Moreno J. (2010). Freezability of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa according to the glycerolization temperature and plasma testosterone concentration. *Cryobiology* 61: 204-210.

Coloma M, Toledano-Díaz A, Castaño C, Velázquez R, Gómez-Brunet A, López-Sebastián A, Santiago-Moreno J. (2011). Seasonal variation in reproductive physiological status in the Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) and its relationship with sperm freezability. *Theriogenology* 76:1695-1705.

Coloma M. (2013). Criopreservación de espermatozoides de macho montés ("*Capra pyrenaica*") obtenidos mediante electroeyaculación. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, UCM, Madrid, España.

Damian J, Ungerfeld R. (2011). The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural parameters. *Reprod Dom Anim* 46:646-65.

Delgadillo J, Chemineau P. (1992). Abolition of the seasonal release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. *J Reprod Fertil* 94: 45-55.

Delgadillo J, Fitz-Rodríguez G, Duarte G, Véliz F, Carrillo E, Flores J, Vielma J, Hernandez H, Malpaux B. (2004). Management of photoperiod to control caprine reproduction in the subtropics. *Reprod Fertil Dev* 16:471-478.

Dostalova Z, Calvete J, Topferpetersen E. (1995). Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376:237-242.

Druart X, Rickard J, Tsikis G, de Graaf S. (2019). Seminal plasma proteins as markers of sperm fertility. *Theriogenology* 137:30-5.

Dziuk P, Graham E, Petersen W. (1954). The technique of electroejaculation and its use in dairy bulls. *J Dairy Sci* 37:1035-1041.

Evans G, Maxwell W, Salamon S. (1990). Inseminación artificial de ovejas y cabras. No. SF 376.25. E9218.

Falk A, Waldner C, Cotter B, Gudmundson J, Barth A. (2001). Effects of epidural lidocaine anesthesia on bulls during electroejaculation. *Can Vet J* 42:116.

Filippi S, Vannelli G, Granchi S, Luconi M, Crescioli C, Mancina R, Natali A, Brocchi S, Vignozzi L, Bencini E, Noci I, Ledda F, Forti G, Maggi M. (2002). Identification, localization and functional activity of oxytocin receptors in epididymis. *Mol Cell Endocrinol* 193:89-100.

Fiser P, Fairfull R. (1983). Effects of changes in photoperiod on freezability of ram x throughout the year enhances testicular activity and improves seminal traits of male goats. *Cryobiology* 20:684-689.

Ginther O. (2007) Ultrasonic imaging and animal reproduction: Book 2, Horses. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 394p.

Giriboni J, Lacuesta L, Ungerfeld R. (2017). Continuous contact with females in estrus throughout the year enhances testicular activity and improves seminal traits of male goats. *Theriogenology* 87:284-289.

Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. (2008). Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim Reprod Sci* 104:359-369.

Goeritz F, Quest M, Wagener A, Fassbender M, Broich A, Hildebrandt T, Hofmann R, Blottner S. (2003). Seasonal timing of sperm production in roe deer: interrelationship among changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands. *Theriogenology* 59:1487-1502.

Gofur M. (2015). Anatomy and histomorphometry of accessory reproductive glands of the Black Bengal buck. *Eur J Anat* 19:171-178.

Gonçalves P, Figueiredo J, Freitas, V. (2014). *Biotecnicas Aplicadas a Reproducao Animal*, second ed. Roca, Sao Paulo.

Gumbsch P, Holzmann A, Gabler C. (2002). Colour-coded duplex sonography of the testes os dogs. *Vet Rec* 151:140-144.

Hammerstedt R, Graham J, Nolan J. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11:73-88.

Hedia M, E-Belely M, Ismail S, El-Maaty A. (2019). Monthly changes in testicular blood flow dynamics and their association with testicular volume, plasma steroid hormones profile and semen characteristics in rams. *Theriogenology* 123:68-73

Holt W, Medrano A, Thurston L, Watson P. (2005). The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* 63:370-382.

Hopper R, King, E. (2014). Evaluation of breeding soundness: basic examination of the semen. *Bov Reprod* 68-78.

Hulet C, Foote W, Blackwell R. (1964). Effects of natural and electrical ejaculation on predicting fertility in the ram. *J Anim Sci*, 23:418-424.

Janett F, Thun R, Bettschen, S, Burger D, Hassig M. (2003). Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches–Montagnes stallions. *Anim Reprod Sci* 77:213-221.

Jeyendran R, Van der Ven H, Perez-Pelaez M, Crabo B, Zaneveld L. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction* 70:219-228.

Jimenez-Rabadán P, Ramon M, Garcia-alvarez O, Maroto-Morales A, del Olmo E, Perez-Guzman M, Bisbal A, Fernández-Santos M, Garde J, Soler A. (2012). Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtiberica buck ejaculates. *Anim Reprod Sci* 132:88-95.

Keener T, Winter T, Berger R, Krieger J, Nodell C, Rothman I, Hanh V. (2000). Prostate vascular flow: e of ejaculation as revealed on transrectal power doppler sonography. *Am J Roentgenol* 175:1169-1172.

Koonjaenak S, Pongpeng P, Wirojwuthikul S, Johannisson A, Kunavongkrit A, Rodriguez-Martinez H. (2007). Seasonality affects post-thaw plasma membrane intactness and sperm velocities in spermatozoa from Thai AI swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 67:1424-35.

La Falci V, Tortorella H, Rodrigues J, Brandelli, A. (2002). Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology* 57:1035-1048.

Lacuesta L, Orihuela A, Ungerfeld, R. (2015). Reproductive development of male goat kids reared with or without permanent contact with adult females until 10 months of age. *Theriogenology* 83:139-143.

Laflamme B, Wolfner M. (2013). Identification and function of proteolysis regulators in seminal fluid. *Mol Reprod Dev* 80:80-101.

Langford G, Ainsworth L, Marcus G, Shrestha J. (1987). Photoperiod entrainment of testosterone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and prolactin cycles in rams in relation to testis size and semen quality. *Biol Reprod* 37:489-499.

Leahy T, Marti J, Evans G, Maxwell W. (2010). Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 119:147-153.

Leboeuf B, Restall B, Salamon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 62:113-141.

Ledesma A, Manes J, Cesari A, Alberio R, Hozbor F. (2014). Electroejaculation Increases Low Molecular Weight Proteins in Seminal Plasma Modifying Sperm Quality in Corriedale Rams. *Reprod Dom Anim* 49:324-332.

León H, Porras A, Galina C, Navarro-Fierro R. (1991). Effect of the collection method on semen characteristics of Zebu and European type cattle in the tropics. *Theriogenology* 36:349-355

Lincoln G & Davidson W. (1977). The relationship between sexual and aggressive behaviour, and pituitary and testicular activity during the seasonal sexual cycle of rams, and the influence of photoperiod. *Reproduction* 49:267-276.

Lincoln G, Almeida O, Arendt J. (1981). Role of melatonin and circadian rhythms in seasonal reproduction in rams. *J Reprod Fertil* 30:23-31.

Liu Q, Xie W, Xiao Y, Gao F, Gao Q, Zhang H, Han Y, Yuan Z, Weng Q. (2019). Seasonal expressions of oxytocin and oxytocin receptor in epididymis of the male muskrat (*Ondatra zibethicus*). *Theriogenology* 124:24-31.

Malpoux B. (2006). Seasonal regulation of reproduction in mammals. En: Neill JD (ed.), Knobil and Neill's Physiology of reproduction. 3^a ed. Amsterdam, Elsevier, pp. 2231-2281.

Manjunath P, Therien I. (2002). Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 53:109-119.

Mann T & Lutwak-Mann C. (1981). Male reproductive function and the composition of semen: general considerations. En: *Male Reproductive Function and Semen* Springer. (1981), London pp. 1-37

Marco-Jiménez F, Puchades S, Gadea J, Vicente J, Viudes M. (2005). Effect of semen collection method on pre- and post- thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology* 64:1756-1765.

Martorana K, Klooster K, Meyers S. (2014). Suprazero cooling rate, rather than freezing rate, determines post thaw quality of rhesus macaque sperm. *Theriogenology* 81:381-388.

Maulik D. (2005) Spectral doppler sonography: waveforms analysis and hemodynamic interpretation. En: *Doppler ultrasound in obstetrics and gynecology*. Ed. Maulik D, Zalud I, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 35-56.

Maxwell W, de Graaf S, Ghaoui Rel H, Evans G. (2007). Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl* 64:13-38.

Memon M, Bretzlaff K, Ott R. (1986). Comparison of semen collection techniques in goats. *Theriogenology* 26:823-827.

Menchaca A & Ungerfeld R. (2010). Fisiología reproductiva de la hembra ovina y caprina. *La revista del borrego* 66p.

Moberg G. (2000) Biological response to stress: implications for animal welfare. En: Moberg GP. (2000) The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare. Ed Mench JA. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK pp. 1-22.

Mortarino M, Tedeschi G, Negri A, Cecilian F, Gottardi L, Maffeo G, Ronchi S. (1998). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. Electrophoresis 19:797-801.

Napolitano F, Arney D, Mota-Rojas D, De Rosa G. (2020). Reproductive technologies and animal welfare. Reprod Technol Anim 275-286.

Orihuela A, Aguirre V, Hernandez C, Flores-Perez I, Vazquez R. (2009). Breaking down the effect of electro-ejaculation on the serum cortisol response, heart and respiratory rates in hair sheep (*Ovis aries*). J Anim Vet Adv 8:1968-1972.

Ortega C, Gonzalez L, Salazar C, Macias B, Rodriguez H, Tapia J. (2010). Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces "apoptosis like" changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. Theriogenology 74:458-465.

Palmer C, Amundson S, Brito L, Waldner C, Barth A. (2004). Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. Anim Reprod Sci 80:213-223.

Palmer C. (2005a). Welfare aspects of theriogenology: investigating alternatives to electroejaculation of bulls. Theriogenology 64:469-479.

Palmer C, Brito L, Arteaga A, Söderquist L, Persson Y, Barth A. (2005b). Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. Anim Reprod Sci 87: 25-31

Parkinson T & Whitfield C. (1987). Optimisation of freezing conditions for bovine spermatozoa. Theriogenology 27:781-797.

Peeters G, Legros J, Piron-Bossuyt C, Reynaert R, Driessche R, Vannieuwenhuyse E. (1983). Release of neurophysin I and oxytocin by stimulation of the genital organs in bulls. J Endocrinol 99:161-171.

Prunier A, Mounier, L, Le Neindre P, Leterrier C, Mormède P, Paulmier V, Prunet P, Terlouw C, Guatteo, R. (2013). Identifying and monitoring pain in farm animals: a review. Animal 7:998-1010.

Provenza F, Lynch J, Nolan, J. (1994). Food aversion conditioned in anesthetized sheep. Physiol Behav 55:429-432.

Pursel V, Johnson L. (1974) Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. Theriogenology 1:63-68.

- Salamon S, Maxwell, W. (2000). Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62: 77-111.
- Santiago-Moreno J, Gómez-Brunet A, Gonzalez-Bulnes A, Toledano-Díaz A, Malpoux, B, López-Sebastián, A. (2005). Differences in reproductive pattern between wild and domestic rams are not associated with inter-specific annual variations in plasma prolactin and melatonin concentrations. *Domest Anim Endocrinol* 28:416-29.
- Santiago-Moreno J, Coloma M, Dorado J, Pulido-Pastor A, Gomez-Guillamon F, Salas-Vega R, Gomez-Brunet A, Lopez-Sebastian, A. (2009). Cryopreservation of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm obtained by electroejaculation outside the rutting season. *Theriogenology* 71:1253-1260.
- Santiago-Moreno J, Castaño C, Toledano-Díaz A, Esteso M, López-Sebastián A, Guerra R, Ruiz M, Mendoza N, Luna C, Cebrain-Pérez J, Hildebrandt T. (2013). Cryopreservation of aoudad (*Ammotragus lervia sahariensis*) sperm obtained by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands and electroejaculation. *Theriogenology* 79:383-91.
- Sarsaifi K, Vejayan J, Haron A, Yusoff R, Hani H, Rasoli M, Ariff M, Othman A. (2015). Protein profile and functionality of spermatozoa from two semen collection methods in Bali bulls. *Livest Sci* 172:96-105.
- Semans J, Langworthy O. (1938). Observations on the neurophysiology of sexual function in the male cat. *J Urol* 40:836-846.
- Sharma OP, Hays R. (1973). Release of an oxytocic substance following genital stimulation in bulls. *J Reprod Fertil* 35:359-362.
- Soleilhavoup C, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Kohnke P, Dacheux J, Guérin Y, Gatti J, de Graaf S, Druart X. (2014). Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. *J Proteomics* 109:245-60.
- Stewart J, Shipley C, Ellerbrock R, Schmidt L, Lima FS, Canisso I. (2018). Physiological variations in reproductive and metabolic features of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) bucks throughout the rutting season. *Theriogenology* 114:308-16.
- Steyn, J. (2003). Application of Artificial Insemination (AI) on commercial sheep and goat production. *Proceeding Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte* 2:367-379.
- Strzezek J, Wysocki P, Kordan W, Kuklinska M. (2005). Proteomics of boar seminal plasma current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod Biol* 5:279-290.

Tuli R & Holtz W. (1994). Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology* 42:547-555.

Ungerfeld R, López-Sebastián A, Estes M, Pradiee J, Toledano-Díaz A, Castaño C, Labrador B, Santiago-Moreno J. (2015). Physiological responses and characteristics of sperm collected after electroejaculation or transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands in anesthetized mouflons (*Ovis musimon*) and Iberian ibexes (*Capra pyrenaica*). *Theriogenology* 84:1067-74.

Ungerfeld R, Abril-Sánchez S, Toledano-Díaz A, Beracochea F, Castaño C, Giriboni, J Santiago-Moreno J. (2016). Oxytocin administration before sperm collection by transrectal ultrasonic-guided massage of the accessory sex glands in mouflons and bucks. *Anim Reprod Sci* 173:13-17.

Villemure M, Lazure C, Manjunath P. (2003). Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol* 1:39.

Vishwanath R. (2003). Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology* 59:571-584.

Watson P. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fert Dev* 7: 871-891.

Watson P. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60:481-492.

Whitlock B, Coffman E, Coetzee J, Daniel J. (2012). Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls. *Theriogenology* 78:737-746

Wood M, Romine L, Lee Y, Richman K, O'Boyle M, Paz D, Chu P, Pretorius D. (2010). Spectral Doppler signatures waveforms in ultrasonography. *Ultrasound Q.* 26:283-299.

Yeoman R, Sonksen J, Gibson S, Rizk B, Abee C. (1998). Penile vibratory stimulation yields increased spermatozoa and accessory gland production compared with rectal electroejaculation in aneurologically intact primate (*Saimiri boliviensis*). *Hum Reprod* 13:2527-2531.

Yeste M, Estrada E, Casas I, Bonet S, Rodríguez-Gil J. (2013). Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. *Theriogenology* 79:929-939.

Zelli R, Orlandi R, Troisi A, Cardinali L, Polisca A. (2013). Power and pulsed doppler evaluation of prostatic artery blood flow in normal and benign prostatic hyperplasia-affected dogs. *Reprod Dom Anim* 48:768-773.

9. ANEXO I

Using transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands
for buck semen collection yields semen with greater cryoresistance than
electroejaculation alone during the breeding season

Madeleine Guerrero-Gutiérrez^a, Rodolfo Ungerfeld^{a,*}, Mariana García Kako
Rodríguez^b, Julián Santiago-Moreno^c, Julia Giriboni^a

^aDepartamento de Biociencias Veterinarias, Facultad de Veterinaria Universidad de la
República, Montevideo, Uruguay

^bDepartamento de Reproducción Animal, Universidad Estadual Paulista Julio de
Mesquita Filho, San Pablo, Brasil

^cDepartamento de Reproducción Animal, Instituto Nacional de Investigación y
Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, Spain

*Corresponding author: E-mail address: rungerfeld@gmail.com

Abstract

The cryoresistance of bucks' semen collected by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands (TUMASG) and electroejaculation (EE) was compared during the breeding season (Study 1) or the late non-breeding season (Study 2). Semen was collected from 10 Gabon bucks with both methods in each season and then frozen according to a standardized protocol. The time required for ejaculation, the number of electrical pulses applied, the sum of the electrical pulses applied*voltage and the total number of vocalizations emitted during the collection by each animal were recorded. In Study 1, TUMASG required a longer time ($P = 0.0006$) but fewer electrical pulses and a lower sum of pulses*voltage than EE ($P < 0.0001$ for both comparisons). Bucks vocalized fewer times during TUMASG than during EE ($P < 0.0001$). Semen collected with TUMASG had greater sperm concentration, sperm mass motility, total number of motile sperm and of sperm with progressive motility, and tended to have greater total number of sperm with functional membrane than semen collected with EE ($P = 0.02$; $P = 0.003$; $P = 0.02$; $P = 0.02$; $P = 0.06$, respectively). After the freezing-thawing process, sperm collected with TUMASG had a greater quality of the motility, a total number of motile sperm and sperm with progressive motility, a greater percentage of motile sperm and sperm with functional membrane, and tended to have a greater total number of sperm with normal morphology than semen collected with EE ($P = 0.04$; $P = 0.04$; $P = 0.03$; $P = 0.02$; $P = 0.04$; $P = 0.06$, respectively). In Study 1 sperm collected with TUMASG had greater cryoresistance for almost all the variables considered than when it was collected with EE. In Study 2, the number of electrical pulses and the sum of pulses*voltage were greater with EE than with TUMASG ($P < 0.0001$; $P = 0.0002$, respectively). There were no differences in any sperm variable in fresh or thawed samples collected with TUMASG or EE. However, the other seminal characteristics evaluated did not differ according to the method, and there were no differences in the cryoresistance of any variable. Overall, TUMASG affected animal welfare less than EE and was suitable for collecting semen of good quality with high cryoresistance during the breeding season in bucks, with slight advantages compared to EE during the non-breeding season.

Keywords: semen collection, sperm freezability, animal welfare, ruminants.

1. Introduction

There are several techniques to collect semen, but the method should be chosen considering if the technique used affect sperm quality, an effect that may differ in accordance to the species [1, 2]. The semen collection technique most frequently used in domestic small ruminants is the artificial vagina, but when males are untrained or outside the breeding season semen cannot always be collected. In these situations, the most frequently used technique is electroejaculation (EE) (see review: [3]). However, EE has negative effects on animal welfare: it induces increases in serum cortisol concentration, rectal temperature, pulse, respiratory and heart rates, as well as modifications in hematological and biochemical variables indicative of the stress response [4,5]. An alternative technique to collect semen recently developed is the transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands (TUMASG) [2, 4, 6]. In general, TUMASG requires few or even no electrical pulses to achieve ejaculation, inducing a lower stress response and probably less pain than EE [2] and therefore would be less aversive for the animals. In effect, Abril-Sánchez et al. [4] observed that TUMASG is less stressful and probably less painful than EE and does not affect semen quality, although its effectiveness varies among species. On the other hand, one advantage of EE is the easiness of its application.

The techniques used to collect semen should stimulate ejaculation, including the stimulation of the accessory sex glands. According to the intensity of this stimulation, the relative contribution of each gland can modify the quantity, composition, and quality of the seminal plasma. These differences might be partially explained by the differences in the stimulus received since transrectal massage occurs in a localized area of the rectum and the EE implies an intense muscle contraction in the pelvic region [2]. In this sense, thawed semen of bulls collected by transrectal massage had better sperm

quality than that collected by EE during the reproductive season in bulls [7] probably related to differences in seminal plasma quantity and composition. In this context, it should be considered that the composition of the seminal plasma has a crucial role in many sperm functions. In effect, the composition of the seminal plasma directly affects sperm motility [8] and viability during and after cryopreservation [9], and pregnancy outcomes [10,11]. Moreover, the activity of the accessory sex glands increases during the breeding season [12], so the relative contribution of the glands to the ejaculate, and the possible consequences of using one or other technique on sperm quality might also differ if semen is collected during the breeding or the non-breeding season.

Blood flow parameters of the testicular artery or the internal iliac arteries, as resistance to blood flow (index resistance, IR) and pulsatility index (PI) are important predictors of semen quality [13], including, sperm concentration and motility [14]. As the accessory sex glands contribute to the production of the liquids that constitute the seminal plasma [15], its hemodynamic is also probably related with sperm quality. Therefore, how intensively the different semen collection procedures stimulate the blood flow perfusion of the accessory sex glands could clarify the relationship of the procedure and with sperm quality.

Considering all this information, the possible advantages of TUMASG may be related not only to animal welfare, but might also enhance sperm quality, including its' cryoresistance. Thus, the aims of this study were 1): compare the fresh semen quality and cryoresistance of semen collected with TUMASG with the aid of EE or EE during the breeding and the non-breeding season in adult bucks and 2) compare the blood flow in the branch of the deferent artery during collection with those techniques during the breeding season.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and handling

All the procedures were approved by the Comisión de Ética en el Uso de Animales (Ethical Committee) (CEUA) of the Facultad de Veterinaria (Universidad de la República, Uruguay). The studies were performed at the Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay (35° S, Montevideo, Uruguay) with 10 adult Gabon bucks [36.9 ± 1.7 kg (mean $\pm$ SEM)], a breed that has been used in similar previous studies related to the development of TUMASG [2, 4, 5, 16] and in which seasonal pattern in this location has been described [17]. Study 1 was performed during the breeding season (March, autumn in the SH), and Study 2 during the late non-breeding season (October, spring in the SH). All the animals used in these studies were previously submitted several times to both techniques, EE and TUMASG. Before the start of the experiment, semen was collected from all males to ensure the removal of aged sperm reserves.

2.2. Experimental design and general procedures

In each Study, semen was collected with TUMASG in five animals, and with EE in the other five. Two days later, each procedure was applied to the other five animals, so overall, semen was collected from all the animals with both techniques, in an overcrossing design. As due to availability of the equipment, the electroejaculator (and the probe) used during the breeding and the non-breeding seasons differed (see section 2.3), both Studies were considered as independent experiments. During semen collection, the time required for ejaculation and the total number of electrical pulses applied were recorded. Also, the sum of pulses*voltage was calculated. In Study 1 the number of vocalizations was also recorded.

2.3. EE and TUMASG procedures

The EE in Study 1 was performed using an automatic electroejaculator equipment with a 16 x 2.5 cm probe, equipped with three longitudinal electrodes (ePORVAC, model e325, Argentina). When the probe was inserted and located in its' place, an increasing voltage was applied to start with electrical pulses of 2 V, increasing 1 V until every 10 pulses. The probe was not moved, so no massage was applied. Each pulse lasted 2-3 s, with intervals of 2 s between them. In Experiment 2, EE was performed with an equipment provided with a probe of 30 cm length $\times$ 1.5 cm width, with 1 cm ring electrodes (Fuhijira Industry, Tokyo, Japan), covered with duct tape on the upper side to avoid stimulating the dorsal region of the animal. The bucks were stimulated with 10 pulses of 2 V, increasing 1 V in each series of 10 pulses, until ejaculation. The equipment had manual control of pulses, which were applied for 2 to 3 s alternated with rest periods of approximately 2 s.

The TUMASG procedure was previously described by Santiago-Moreno et al. [6]. In each Study, the TUMASG was performed always by the same operator. Briefly, the bulbourethral glands, seminal vesicles, and ampullae were observed by real-time transrectal ultrasound using a 7.5 MHz linear array probe (United Imaging, IUStar 160 Vet model, Ukraine). The probe was also used to massage vigorously in the ampullae, using a back and forth movement to promote the expulsion of the sperm. The procedure was repeated several times until ejaculation occurred. If the animal did not ejaculate, one or two electrical pulses of 4 to 7 V were applied during 3 s, followed again by the massage with the ultrasound probe. The process was monitored by ultrasound of the ampullae, verifying that glands were empty. All bucks ejaculated when were subjected to each of the techniques and to ensure that the semen samples were not contaminated with dirt, the penis was exteriorized before the start of the collection either by TUMASG or EE. No animal urinated during semen collection using TUMASG or EE,

2.4 Doppler ultrasound

According to Schaffer et al. [18], ultrasound may be used to monitor different seminal collection techniques. Through spectral Doppler ultrasonography of the iliac artery in rams [14], it is possible to detect the physiological status and hemodynamic characteristics of the male reproductive system, such as accessory sex glands. Thus, Doppler ultrasound evaluation was performed with the same equipment that TUMASG procedure in Study 1, before and after the application of the procedures. The bucks were restrained in a quadrupedal position and transrectal ultrasound was performed immediately after semen collection where the seminal vesicle was examined by the vascular indices of the branch of the deferent artery [19] to the vesicular gland using spectral Doppler ultrasound, such as peak systolic velocity (PSV), end-diastolic velocity (EDV), pulsatility index (PI), resistive index (RI) and systole/diastole relationship (S/D). For this, the caliper was placed into the lumen of the artery, and the angle of insonation was adjusted to $<60^\circ$. All the vascular indices were determined automatically.

2.5. Seminal evaluation, freezing, and thawing

The samples were collected in both procedures and Studies directly in glass cups tempered at 37 °C and rapidly transported to the lab. The ejaculated volume and sperm mass motility were determined in fresh semen (stage 1). The quality of motility was determined subjectively, and the percentages of motile sperm and sperm with progressive motility, the curvilinear speed (VCL), the linear speed (VSL), the average path speed (VAP), and the amplitude of lateral head displacement (ALH) were determined objectively using a specific software [Integrated Semen Analysis System (ISAS, Valencia, Spain)]. Kinetics variables were determined in a minimum of 4 fields and 400 sperm tracks (image acquisition rate 25 frames/s). Finally, sperm concentration

was determined with a Neubauer chamber, and the percentages of morphologically normal sperm and sperm with normal acrosome were determined [20]. The functional integrity of the sperm membrane was evaluated after 15 min of incubation in a hypo-osmotic medium test (HOST) [21]. The total number of sperm ejaculated was calculated as volume X concentration, and the total number of motile sperm, sperm with progressive motility, sperm with functional membrane, sperm with normal morphology, and sperm with normal acrosome in the ejaculate was calculated multiplying the total number of sperm ejaculated X the percentage of sperm with each characteristic.

Semen was frozen in 0.5 mL straws with a total of 50 million sperm after adding a commercial semen extender (Andromed, Minitube, Tienfenbach, Germany) according to a freezing protocol previously used in the same lab [22]. After adding the extender (stage 2), the samples were placed in a container with water at 20 °C, which was placed into a refrigerator until reaching 5 °C (cooling curve of approximately 90 min, 1.7 °C/min). Subsequently, the quality of motility was determined subjectively, and percentages of motile sperm and sperm with progressive motility, VCL, VSL and VAP, ALH were determined objectively by ISAS. Then, the straws were placed in nitrogen vapors (5 cm above the nitrogen surface in a cryogenic storage box, approximately -120 °C) for 10 min (11.5 °C/min) before immersing them in liquid nitrogen (-196 °C). The samples were stored at -196 °C for 6 weeks and then thawed (stage 3) in a water bath at 37 °C for 30 s. Again, the percentages of motile sperm and sperm with progressive motility, VCL, VSL, VAP, and ALH were also determined. The percentages of sperm with normal morphology and acrosome, and with the functional integrity of the membrane were also determined in thawed samples.

A cryoresistance index (CR) was calculated for each variable recorded in thawed semen (except for kinetics variables) such as $CR = (\text{thawed semen/fresh semen}) \times 100$.

2.6. Statistical analysis

Normal distribution of data was tested with the Shapiro-Wilk test, and adequate transformations were applied when data were not normally distributed before analyzed. Each transformation is presented in the corresponding Tables, in which both, the raw and the transformed data, are included. All the procedures and sperm variables that were normally distributed, or normalized with adequate transformations, were compared between treatments with a mixed model (proc mixed; SAS, University Edition), including the collection technique as the main effect and the day of collection as a random effect. Doppler variables were compared with a mixed model, including the collection technique as the main effect, the time (before and after semen collection) as a repeated measure, and the interaction between treatment and time. The data that could not be normalized (sperm quality and sperm mass motility) were compared with the Wilcoxon test. Raw data that were transformed are presented as mean $\pm$ SEM, and raw data normally distributed or transformed data are presented as LSmeans $\pm$ SEM. Mean differences were considered significant when there was a $P \leq 0.05$, and tendencies for differences when was $0.05 < P \leq 0.1$.

3. Results

3.1. Experiment 1

The TUMASG required a longer time, but less electrical pulses and sum of pulses*voltage than EE. Bucks vocalized fewer times during TUMASG than during EE (Table 1).

3.1.2. Fresh and thawed sperm during the breeding season

Semen collected with TUMASG had greater sperm concentration, sperm mass motility, a total number of ejaculated sperm ejaculated, motile sperm ejaculated, of sperm with functional membrane ejaculated, and sperm with normal morphology ejaculated (Table 2). After the freezing-thawing process, sperm collected with TUMASG had a greater quality of motility, greater percentages of motile sperm and sperm with functional membrane, a total number of motile sperm, of sperm with progressive motility, sperm with functional membrane, and sperm with normal morphology (Table 3).

3.1.3. Doppler evaluation

The VPS and the VDF did not differ according to the technique (VPS: 48.7 ± 2.5 cm/s vs 49.6 ± 2.6 cm/s; VDF: 44.3 ± 3.1 cm/s vs 43.8 ± 3.3 cm/s for EE and TUMASG respectively). However, both tended to increase after ejaculation (VPS: 46.7 ± 2.2 cm/s vs 51.6 ± 2.2 cm/s; VDF: 41.2 ± 2.7 cm/s vs 46.9 ± 2.7 cm/s; $P = 0.077$ for both variables). The RI did not differ according to the treatment or moment (EE: 0.1 ± 0.1 ; TUMASG: 0.3 ± 0.1). There was a significant interaction between the techniques and the moment (before or after ejaculation) in the S/D ratio ($P = 0.02$): while it decreased after EE (1.18 ± 0.05 vs 1.05 ± 0.05 ; $P = 0.02$), there were no changes with TUMASG (1.15 ± 0.05 vs 1.20 ± 0.05 , ns).

3.2. Experiment 2

The time required for ejaculation was not affected by the technique. The number of electrical pulses and the sum of pulses*voltage were greater with EE than with TUMASG (Table 1).

3.2.1. Fresh semen and thawed semen during the late non-breeding season

There were no differences in any sperm variable in fresh or thawed samples collected with TUMASG or EE (Tables 4 and 5).

3.3. Cryoresistance of semen

Cryoresistance of the semen collected by TUMASG and EE during the breeding season and the non-breeding season is presented in Table 6. In Study 1 (breeding season), sperm collected with TUMASG had greater CR of quality of motility, percentages of motile sperm, and sperm with progressive motility, and sperm with functional membrane. In Study 2 (non-breeding season), there were no differences in the CR of any variable.

4. Discussion

In general, fresh and thawed semen collected during the breeding season with TUMASG had better quality than that collected with EE and was more resistant to the freezing-thawing processes. This study expands the advantages of TUMASG on animal welfare [2, 4] to the sperm quality, especially during the breeding season, when it reached great differences compared to the sperm collected with EE. However, and considering that the easiness in responding to TUMASG is species-specific (see review: [3]), before assuming the advantages of TUMASG, it should be tested in other species and breeds, and as it was shown by this study, in different conditions (e.g., seasons). Although TUMASG has the disadvantage that it must be performed by a skilled technician, requires longer time and the use of an ultrasound equipment, the advantages in animal welfare and sperm quality offers an interesting alternative technique to EE when artificial vagina cannot be used.

The advantage of TUMASG compared with EE in semen quality differed according to the seasons, with great advantages during the breeding season, but slight ones during the non-breeding season. It seems that this greater semen quality of samples collected with TUMASG during the breeding season might be mainly related to greater responsiveness of the accessory sex glands to massage stimulation during this time of the year. It is widely known that the seminal plasma composition is directly related to sperm cryoresistance, it remains to be determined if the main advantages of the use of TUMASG during the breeding season is probably related to differences in its' composition. The size of the accessory sex glands increases during the breeding season in Iberian ibex [6, 14] and white-tailed deer [23], coinciding with the maximum testosterone concentrations, so the use of a technique that directly stimulates emptying them could explain the better results. Overall, the collection of greater number of sperm

with greater resistance to freezing-thawing increases the possible impact of this technique, as the number of sperm collections could also be reduced to achieve the same results,

The greater testosterone concentration during the breeding season may be one of the factors contributing to the greater sensitivity to this technique than to EE. In our location, Gabon bucks have maximum concentration of testosterone, and their reproductive activity increases from November to April (from late spring to mid-autumn) [17]. In addition, Ungerfeld et al. [16] suggested that the stimulus received on the accessory sex glands with the massage may also trigger the release of endogenous oxytocin as it occurs during transrectal massage in bulls [24-25], favoring a greater transit of sperm through the ampullae. Although to the best of our knowledge the seasonal sensitivity of the genital tract to oxytocin has not been studied in ruminants, the expression of oxytocin receptors is greater during the breeding season than during the rest of the year in seasonal rodents [26]. Additionally, several regions of the male reproductive tract, including the epididymis, tunica albuginea, and seminal vesicle has oxytocin receptors [27]. Therefore, it is possible that TUMASG also triggered the release of oxytocin hormone that promotes ejaculation (see review: [3]), with possible greater effects during the breeding season. Overall, it may be inferred that a direct stimulus on the accessory sex glands has a greater positive impact on the composition of the ejaculate during the breeding season due to the differences in the activity of the accessory sex glands.

Hemodynamics studies of accessory sex glands of small ruminants are scarce [14]. Given this, the results of this study may contribute to the investigation of the physiology of the male reproductive organs, increasing the predictive value and sensitivity of ultrasound assessments to determine fertility [28] In this study, the VPS

and VDF of the branch of the ampullae to the vesicular gland tended to increase after ejaculation, both by collection by TUMASG and by electroejaculation, suggesting that the ejaculation process promoted an increase of blood perfusion of the vesicular gland. These findings are consistent with Alonge et al. [28] and Keener et al. [29] who observed increases in the vascular flow from the prostate after ejaculation in dogs and men, respectively. In addition, in the present study, the S/D ratio decreased after the seminal collection by EE, but not with TUMASG, revealing that there was a greater increase in vesicular gland blood flow when the semen was collected by EE, which might be a consequence of a greater flow promoted by regional muscular contractions. It should also be considered that the S/D ratio has a negative correlation with changes in heart rate, that is, changes in heart rate may alter the shape of the flow wave and cause significant changes in the values of vascular indexes [30]. In this sense, one of the more prominent responses to EE is the increase in heart rate due to stress and possibly pain (see review: [3]). Therefore, this result reinforces the concept that EE induces a greater response to stress and/or pain than TUMASG.

During the breeding season thawed semen collected with TUMASG had better quality than semen collected with EE, coinciding with similar results in bulls [7]. This may be explained by the initial better quality of fresh sperm, but also by the higher CR of those samples. As sperm was collected from the same animals with both methods, the main differences may be related to the ejaculation process, and probably, with differences in the composition of the seminal plasma induced by the differential stimulus received [7]. In effect, the composition of the seminal plasma is the main determinant of the effectiveness of cryopreservation, especially enhancing sperm cryoresistance [9]. The interaction of the seminal plasma with sperm induces metabolic changes, binding of seminal proteins to the sperm surface, and remodeling membrane

constituents. Although it cannot be demonstrated without analyzing the seminal plasma composition, the whole result indicates that it should differ according to the collection technique, probably due to differences in the intensity of the stimulation of the seminal vesicles, prostate, bulbourethral gland, and ampulla of ductus deferens, modifying the components of the seminal plasma, and thus, the sperm ability to survive to the freezing-thawing processes.

On the other hand, during the non-breeding season, there were fewer differences in both, the collection procedure and the sperm quality. For example, the time required for ejaculation was similar with both procedures, which may be explained by the longer time required by EE during the non-breeding season. Furthermore, in both seasons TUMASG implied the use of fewer electrical pulses, with lower voltage, inducing also fewer vocalizations in the breeding season. One possible explanation for the different results during the breeding and the non-breeding season is the easiness to stimulate the ejaculation, due to greater sensitivity during the firs. In effect, during the breeding season bucks have greater testosterone concentration [17], and thus, sensitivity to respond to stimulus that trigger ejaculation. However, while EE directly stimulates the nerves involved in the process, TUMASG requires a physiological response, thus, being limited by the spontaneous sensitivity. The lack of improving sperm cryoresistance might be related to the seasonal changes in the accessory gland activity [14], so seminal plasma composition is affected despite stimulating directly the glands. However, as TUMASG decreased the use of electrical pulses without affecting sperm quality, it appears a practical alternative technique for semen collection to collect semen also during the non-breeding season, either for using either fresh or to preserve it.

In conclusion, at least in the conditions of our study, TUMASG is suitable for collecting semen of good quality in bucks. Indeed, fresh semen collected with

TUMASG during the breeding season had a greater quality and resisted greater freezing-thawing processes than semen collected using EE, providing also better thawed semen.

Author contributions

MG discussed the general study design, organized the experimental procedures, analyzed the semen samples, collected data, revised and worked on the preparation of the manuscript. RU proposed the initial hypothesis, organized the study and revised and worked on the preparation of the manuscript, and approved the final version. MGK performed and analyzed doppler ultrasonographic evaluation, revised and worked on the preparation of the manuscript, and approved the final version. JSM discussed the general design, collected data, revised and worked on the preparation of the manuscript, and approved the final version. JG proposed the initial hypothesis, organized the experimental procedures, analyzed the semen samples, revised and worked on the preparation of the manuscript, and approved the final version.

Competing Interests

None of the authors have any conflict of interest to declare.

Acknowledgements

Financial support was provided by the Universidad de la República, Uruguay. We acknowledge Milton Pintos for taking care of the animals, and for animal handling during the studies. The authors thank Livia Pinto-Santini, María Noel Viera, Florencia Beracochea, and María Jesús Frisch, who helped with the experimental work.

References

- [1] Jimenez-Rabadan P, Ramon M, Garcia-alvarez O, Maroto-Morales A, del Olmo E, Perez-Guzman MD et al. Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtiberica buck ejaculates. Anim Reprod Sci 2012; 132:88-95.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.04.005>.
- [2] Ungerfeld R, López-Sebastián A, Estes M, Pradiee J, Toledano-Díaz A, Castaño C, Santiago-Moreno J. Physiological responses and characteristics of sperm collected after electroejaculation or transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands in anesthetized mouflons (*Ovis musimon*) and Iberian ibexes (*Capra pyrenaica*). Theriogenology 2015; 84:1067-74.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.009>.
- [3] Abril-Sánchez S, Freitas-de-Melo, A, Giriboni J, Santiago-Moreno J, Ungerfeld, R. Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: a review on welfare problems and alternative techniques. Anim Reprod Sci 2019; 205:1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.03.023>
- [4] Abril-Sánchez S, Freitas-de-Melo A, Beracochea F, Damián J, Giriboni J, Santiago-Moreno J, Ungerfeld R. Sperm collection by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands is less stressful than electroejaculation without altering sperm characteristics in conscious goat bucks. Theriogenology 2017; 98:82-7.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.05.006>
- [5] Abril-Sánchez S, Crosignani, N, Terrazas A, Damián, JP, Beracochea F, Silveira P, Ungerfeld R. Sedation or anaesthesia decrease the stress response to electroejaculation and improve the quality of the collected semen in goat bucks. Animal 2018; 1-11.
<https://doi.org/10.1017/S1751731118000320>

- [6] Santiago-Moreno J, Castaño C, Toledano-Díaz A, Estes M, López-Sebastián A, Guerra R, Ruiz MJ, Mendoza N, Luna C, Cebrián-Pérez JA, Hildebrandt TB. Cryopreservation of aoudad (*Ammotragus lervia sahariensis*) sperm obtained by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands and electroejaculation. *Theriogenology* 2013; 79:383-91.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.10.011>
- [7] Sarsaifi K, Vejayan J, Haron AW, Yusoff R, Hani H, Rasoli M, Ariff Omar M, Mazni Othman A. Protein profile and functionality of spermatozoa from two semen collection methods in Bali bulls. *Livest Sci* 2015; 172:96-105.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.12.004>
- [8] Maxwell WMC, de Graaf SP, Ghaoui RE-H, Evans G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 64:13-38.
<https://doi.org/10.5661/rdr-vi-13>
- [9] Soleilhavoup C, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Kohnke PL, Dacheux JL, Guérin Y, Gatti JL, de Graaf SP, Druart X. Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. *Journal of proteomics* 2014; 109:245-60.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.007>
- [10] Bromfield JJ. A role for seminal plasma in modulating pregnancy outcomes in domestic species. *Reproduction* 2016; 152:223-32. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0313>
- [11] Druart X, Rickard JP, Tsikis G, de Graaf SP. Seminal plasma proteins as markers of sperm fertility. *Theriogenology* 2019; 137:30-5.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.034>
- [12] Coloma MA, Toledano-Díaz A, Castaño C, Velázquez R, Gómez-Brunet A, López-Sebastián A, Santiago-Moreno J. Seasonal variation in reproductive

physiological status in the Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) and its relationship with sperm freezability. *Theriogenology* 2011; 76:1695-1705.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.001>

[13] Gumbsch P, Holzmann A, Gabler C. Colour-coded duplex sonography of the testes of dogs. *Vet Rec* 2002; 151:140-144. <https://doi.org/10.1136/vr.151.5.140>

[14] Camela E, Nociti R, Santos V, Macente B, Maciel G, Feliciano M, Vicente W, Gill I, Bartlewski P, Olivera M. Ultrasonographic characteristics of accessory sex glands and spectral Doppler indices of the internal iliac arteries in peri- and post-pubertal Dorper rams raised in a subtropical climate. *Anim Reprod Sci* 2017; 184:29-35

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.06.010>

[15] Gonçalves P, Figueiredo J, Freitas, V. *Biotecnicas aplicadas a reproducao animal*, 2nd ed. Roca, Sao Paulo; 2014.

[16] Ungerfeld R, Abril-Sánchez S, Toledano-Díaz A, Beracochea F, Castaño C, Giriboni J, Santiago-Moreno J. Oxytocin administration before sperm collection by transrectal ultrasonic-guided massage of the accessory sex glands in mouflons and bucks. *Anim Reprod Sci* 2016; 173:13-17.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.08.002>

[17] Giriboni J, Lacuesta L, Ungerfeld R. Continuous contact with females in estrus throughout the year enhances testicular activity and improves seminal traits of male goats. *Theriogenology* 2017; 87:284-9.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.004>

[18] Schaffer N, Bryant W, Agnew D, Meehan T, Beehler, B. Ultrasonographic monitoring of artificially stimulated ejaculation in three rhinoceros species (*Ceratotherium simum*, *Diceros bicornis*, *Rhinoceros unicornus*). *J Zoo Wild Med* 1998; 29:386-93.

- [19] Elbaz HT, Elweza AE, Sharshar AM. Testicular color Doppler ultrasonography in barking rams. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences* 2019;61:39e45. <https://doi.org/10.5455/ajvs.34994>.
- [20] Pursel VG, Johnson LA. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology* 1974; 1:63-68. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(74\)90008-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(74)90008-9).
- [21] Jeyendran RS, Van- der-Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70:219-28. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>
- [22] Beracochea F, Viera MN, Acevedo L, Santiago-Moreno J, Ungerfeld R. Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) improves bucks' semen quality during the nonbreeding season. *Reprod Domest Anim* 2018; 53:1096-1102. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02004-y>
- [23] Stewart JL, Shipley CF, Ellerbrock RE, Schmidt L, Lima FS, Canisso IF. Physiological variations in reproductive and metabolic features of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) bucks throughout the rutting season. *Theriogenology* 2018; 114:308-16. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.015>
- [24] Peeters G, Legros JJ, Piron-Bossuyt C, Reynaert R, Driessche RV, Vannieuwenhuysse E. Release of neurophysin I and oxytocin by stimulation of the genital organs in bulls. *J Endocrinol* 1983; 99:161-171. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0990161>
- [25] Sharma OP, Hays R. Release of an oxytocic substance following genital stimulation in bulls. *J Reprod Fertil* 1973; 35:359-362. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0350359>
- [26] Liu Q, Xie W, Xiao Y, Gao F, Gao Q, Zhang H, Han Y, Yuan Z, Weng Q. Seasonal expressions of oxytocin and oxytocin receptor in epididymis of the male

muskrat (*Ondatra zibethicus*). Theriogenology 2019; 124:24-31.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.10.009>

[27] Filippi S, Vannelli G, Granchi S, Luconi M, Crescioli C, Mancina R, Natali A, Brocchi S, Vignozzi L, Bencini EB, Noci I, Ledda f, Forti G, Maggi M. Identification, localization and functional activity of oxytocin receptors in epididymis. Mol Cell Endocrinol 2002; 193:89-100. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00101-6](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00101-6)

[28] Alonge S, Melandri M, Fanciullo L, Lacalandra GM, Aiudi G. Prostate vascular flow: The effect of the ejaculation on the power doppler ultrasonographic examination. Reprod Domest Anim 2018; 53:110-115.

<https://doi.org/10.1111/rda.13078>

[29] Keener TS, Winter TC, Berger R, Krieger JN, Nodell C, Rothman I, Nghiem H. Prostate vascular flow: the effect of ejaculation as revealed on transrectal power doppler sonography. Am Roentgen Ray Soc 2000; 175:1169-72.

<https://doi.org/10.2214/ajr.175.4.1751169>

[30] Maulik D. Spectral doppler sonography: waveforms analysis and hemodynamic interpretation. In: Maulik D, Zalud I, editors. Doppler ultrasound in obstetrics and gynecology, Berlin Heidelberg: Springer-

Table 1. Time required for ejaculation, number of electrical pulses and the sum of pulses*voltage during semen collection with electroejaculation (EE) or transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands (TUMASG) during the breeding season (Study 1) and late non-breeding season (Study 2) in bucks. Study 1 also includes the number of vocalizations.

	Raw data		Transformation	Transformed data		
	EE	TUMASG		EE	TUMASG	P
Experiment 1						
Time (min)	5.0 ± 0.9	10.5 ± 0.9	$\sqrt{x}$	2.24 ± 0.14	3.21 ± 0.15	<0.0001
Pulses	54.1 ± 2.9	3.8 ± 3.0		-	-	<0.0001
Sum of pulses*voltage	238.7 ± 20.4	18.3 ± 21.5	$\sqrt{x}$	15.3 ± 0.88	3.4 ± 0.93	<0.0001
Vocalizations	36.3 ± 4.8	4.8 ± 5.0	$\sqrt{x}$	5.69 ± 0.55	1.83 ± 0.58	0.0002
Experiment 2						
Time (min)	6.7 ± 1.2	8.6 ± 1.2	Log (x)	0.77 ± 0.09	0.87 ± 0.09	ns
Pulses	53.7 ± 3.1	2.2 ± 3.1		-	-	<0001
Sum of pulses*voltage	212.7 ± 30.4	11.8 ± 30.4	Log (x)	2.21 ± 0.11	1.00 ± 0.11	0.0002

Raw data are presented as mean ± SEM, and transformed data are presented as LSmean ± SEM ns: not significant.

Table 2. Characteristics of fresh semen in samples collected with electroejaculation (EE) or transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands (TUMASG) during the breeding season (Study 1) in bucks.

	Raw data		Transformation	Transformed data		P
	EE	TUMASG		EE	TUMASG	
Volume (μL)	1355.6 ± 469.1	1986.0 ± 501.4	Log (x)	3.11 ± 0.10	3.18 ± 0.11	ns
Sperm concentration $\times 10^6/\text{mL}$	592.9 ± 232.5	1699.1 ± 258.7	$1/x$	0.002 ± 0.0002	0.0008 ± 0.0002	0.001
Total number of sperm ($\times 10^6$)	776.4 ± 1427.1	4425.7 ± 1591.9	$1/x$	0.0015 ± 0.0002	0.0008 ± 0.0002	0.04
Quality of motility (0-5)	3.1 ± 0.5	3.2 ± 1.1	-	-	-	ns
Sperm mass motility (0-5)	1.4 ± 0.7	2.9 ± 0.7	-	-	-	0.003
Motile Sperm						
Percentage (%)	88.9 ± 5.4	75.0 ± 6.5	-	-	-	ns
Total ($\times 10^6$)	681.1 ± 505.8	2796.8 ± 565.5	Log (x)	2.80 ± 0.14	3.22 ± 0.15	0.04
Sperm with progressive motility						

Percentage (%)	64.0 ± 5.5	48.6 ± 6.1	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	497.0 ± 320.7	1667.8 ± 358.5	Log (x)	2.65 ± 0.15	3.00 ± 0.17	ns
Sperm with functional membrane						
Percentage (%)	67.5 ± 6.0	65.7 ± 6.3	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	516.6 ± 582.4	2547.8 ± 650.2	Log (x)	2.70 ± 0.13	3.17 ± 0.15	0.02
Sperm with normal morphology						
Percentage (%)	62.3 ± 2.9	65.9 ± 3.0	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	473.0 ± 690.6	2547.7 ± 771.9	1/ <i>x</i>	0.002 ± 0.0004	0.001 ± 0.0004	0.02
VCL (µm/s)	119.5 ± 5.4	104.9 ± 6.0	-	-	-	ns
VSL (µm/s)	77.5 ± 5.3	66.0 ± 6.0	-	-	-	ns
VAP (µm/s)	90.6 ± 6.4	78.1 ± 7.2	-	-	-	ns
AHL (µm)	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.2	-	-	-	ns

VCL: curvilinear velocity; VSL: linear velocity; VAP: average path velocity and ALH: amplitude of lateral head displacement

Raw data are presented as mean ± SEM, and transformed data are presented as LSmean ± SEM

ns: not significant.

Table 3. Characteristics of thawed semen samples collected with electroejaculation (EE) or transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands (TUMASG) during the breeding season (Study 1) in bucks.

	Raw data		Transformation	Transformed data		P
	EE	TUMASG		EE	TUMASG	
Quality of motility (0-5)	0.8 ± 0.5	1.2 ± 1.1	-	-	-	<0.05
Motile sperm						
Percentage (%)	20.1 ± 6.4	45.8 ± 7.1	-	-	-	0.02
Total (x10 ⁶)	131.4 ± 399.6	1757.6 ± 446.7	Log (x)	2.02 ± 0.18	2.90 ± 0.20	0.01
Sperm with progressive motility						
Percentage (%)	7.8 ± 5.5	15.5 ± 6.1	Arcsine $\sqrt{(x/100)}$	0.24 ± 3.00	5.46 ± 3.36	ns
Total (x10 ⁶)	47.8 ± 103.7	513.3 ± 116.0	Log (x)	1.37 ± 0.23	2.34 ± 0.26	0.01
Sperm with functional membrane						
Percentage (%)	19.7 ± 3.0	28.8 ± 3.2	-	-	-	0.01
Total (x10 ⁶)	153.2 ± 460.4	1310.8 ± 511.5	Log (x)	2.12 ± 0.16	2.80 ± 0.17	0.002

Sperm with normal morphology

Percentage (%)	68.2 ± 3.4	66.4 ± 3.8	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	455.3 ± 672.1	2523.8 ± 750.8	1/ <i>x</i>	0.002 ± 0.0004	0.001 ± 0.001	0.03
VCL (µm/s)	48.6 ± 7.0	56.3 ± 7.7	-	-	-	ns
VSL (µm/s)	26.7 ± 4.3	26.9 ± 4.8	-	-	-	ns
VAP (µm/s)	30.6 ± 5.1	34.0 ± 5.7	-	-	-	ns
AHL (µm)	1.9 ± 0.2	2.3 ± 0.2	-	-	-	ns

VCL: curvilinear velocity; VSL: linear velocity; VAP: average path velocity and ALH: amplitude of lateral head displacement

Raw data are presented as mean ± SEM, and transformed data are presented as LSmean ± SEM

ns: not significant.

Table 4. Characteristics of fresh semen samples collected with electroejaculation (EE) or transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands (TUMASG) during late non-breeding season (Study 2) in bucks.

	Raw data		Transformation	Transformed data		P
	EE	TUMASG		EE	TUMASG	
Volume (μL)	2199.8 $\pm$ 301.2	1836.8 $\pm$ 368.6	-	-	-	ns
Sperm concentration ($\times 10^6/\text{mL}$)	2031.1 $\pm$ 1188.4	2464.0 $\pm$ 2910.9	$\sqrt{x}$	37.35 $\pm$ 7.07	33.71 $\pm$ 7.45	ns
Total number of sperm ($\times 10^6$)	5000.4 $\pm$ 1847.8	3429.7 $\pm$ 1947.8	$\sqrt{x}$	57.11 $\pm$ 12.87	47.27 $\pm$ 13.56	ns
Quality of motility (0-5)	3.7 $\pm$ 0.5	3.7 $\pm$ 1.3	-	-	-	ns
Sperm mass motility (0-5)	2.8 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 1.3	-	-	-	ns
Motile Sperm						
Percentage (%)	71.2 $\pm$ 5.4	69.6 $\pm$ 5.6	-	-	-	ns
Total ($\times 10^6$)	2813.1 $\pm$ 937.5	1973.7 $\pm$ 988.3	Log (x)	2.97 $\pm$ 0.33	2.86 $\pm$ 0.33	ns
Sperm with progressive motility						
Percentage (%)	47.9 $\pm$ 6.6	45.3 $\pm$ 6.6	-	-	-	ns

Total (x10 ⁶)	1874.2 ± 758.8	1339.7 ± 783.3	Log (x)	2.72 ± 0.37	2.71 ± 0.37	ns
Sperm with functional membrane						
Percentage (%)	66.4 ± 6.0	76.4 ± 6.2	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	3309.1 ± 1351.7	3010.0 ± 1424.8	Log (x)	2.92 ± 0.34	2.90 ± 0.35	ns
Sperm with normal morphology						
Percentage (%)	69.1 ± 6.5	68.1 ± 6.5	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	3693.8 ± 1485.2	2049.7 ± 1554.1	Log (x)	2.94 ± 0.36	2.84 ± 0.36	ns
VCL (µm/s)	95.6 ± 7.5	98.0 ± 6.4	-	-	-	ns
VSL (µm/s)	60.8 ± 8.2	68.1 ± 7.1	$\sqrt{x}$	8.10 ± 0.56	7.65 ± 0.65	ns
VAP (µm/s)	65.9 ± 8.4	75.2 ± 7.3	-	-	-	ns
AHL (µm)	2.8 ± 0.2	2.7 ± 0.2	-	-	-	ns

VCL: curvilinear velocity; VSL: linear velocity; VAP: average path velocity and ALH: amplitude of lateral head displacement

Raw data are presented as mean ± SEM, and transformed data are presented as LSmean ± SEM

ns: not significant.

Table 5. Characteristics of thawed semen samples collected with electroejaculation (EE) or transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands (TUMASG) during late non-breeding season (Study 2) in bucks.

	Raw data		Transformation	Transformed data		P
	EE	TUMASG		EE	TUMASG	
Quality of motility (0-5)	0.9 ± 0.5	1.94 ± 1.3	-	-	-	ns
Motile Sperm						
Percentage (%)	20.2 ± 6.2	16.2 ± 6.5	Arcosine $\sqrt{x}/100$	0.42 ± 0.09	0.39 ± 0.09	ns
Total (x10 ⁶)	956.3 ± 473.0	761.0 ± 490.0	Log (x)	2.02 ± 0.50	2.02 ± 0.49	ns
Sperm with progressive motility						
Percentage (%)	47.9 ± 6.6	45.3 ± 6.6	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	215.0 ± 222.7	239.7 ± 218.4	-	-	-	ns
Sperm with functional membrane						
Percentage (%)	48.0 ± 6.5	54.7 ± 6.4	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	2086.8 ± 945.8	2231.8 ± 996.9	Log (x)	2.83 ± 0.31	2.76 ± 0.32	ns

Sperm with normal morphology

Percentage (%)	71.8 ± 3.2	66.8 ± 3.2	-	-	-	ns
Total (x10 ⁶)	3740.7 ± 1498.9	2300 ± 1580.0	Log (x)	2.94 ± 0.36	2.87 ± 0.36	ns
VCL (µm/s)	41.3 ± 6.4	38.2 ± 7.5	-	-	-	ns
VSL (µm/s)	20.5 ± 7.1	16.9 ± 8.2	-	-	-	ns
VAP (µm/s)	26.0 ± 7.3	21.4 ± 8.4	$\sqrt{x}$	5.02 ± 0.30	4.63 ± 0.36	ns
AHL (µm)	1.8 ± 0.2	2.0 ± 02	-	-	-	ns

VCL: curvilinear velocity; VSL: linear velocity; VAP: average path velocity and ALH: amplitude of lateral head displacement

Raw data are presented as mean ± SEM, and transformed data are presented as LSmean ± SEM

ns: not significant.

Table 6. Cryoresistance of semen samples collected with electroejaculation (EE) or transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands (TUMASG) during the breeding season (Study 1) and during the non-breeding season (Study 2) in bucks.

Variable	Cryoresistance (breeding season)			Cryoresistance (non-breeding season)		
	EE	TUMASG	P	EE	TUMASG	P
Quality of motility (%)	35.0 ± 6.8	61.3 ± 7.5	0.03	43.1 ± 11.5	49.0 ± 13.9	ns
Motile sperm (%)	21.8 ± 6.0	51.2 ± 7.2	-	34.0 ± 9.8	24.6 ± 12.3	ns
Arcsine $\sqrt{(x/100)}$	0.47 ± 0.07	0.79 ± 0.08	0.009	0.59 ± 0.10	0.44 ± 0.11	ns
Sperm with progressive motility (%)	13.5 ± 4.7	28.3 ± 4.7	-	10.1 ± 5.2	12.0 ± 6.9	ns
Arcsen $\sqrt{(x/100)}$	0.30 ± 0.08	0.55 ± 0.09	0.05	0.13 ± 0.11	0.38 ± 0.11	ns
Sperm with functional membrane integrity (%)	27.9 ± 7.1	44.4 ± 7.6	0.04	74.4 ± 23.3	79.5 ± 23.4	ns
Sperm with normal morphology (%)	89.5 ± 2.4	92.3 ± 2.7	ns	83.2	86.0 ± 14.0	ns

Raw data are presented as mean ± SEM, and transformed data are presented as LSmean ± SEM

ns: not significant.