

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**ADMINISTRACIÓN DE UNA OXCITOCINA DE LARGA ACCIÓN
ANTES DE LA ELECTROEYACULACIÓN EN CARNEROS: EFECTOS
SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN FRESCO**

Por

**Soi LAFOURCADE BARTH
María Manuela MOLINA TECHERA**

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para
obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias (Orientación
Producción Animal, Bloque Rumiantes)
MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2021**

PÁGINA DE APROBACIÓN

TESIS DE GRADO APROBADA POR:


..... D.F. Lo

PRESIDENTE DE MESA:


..... R. Ungerfeld

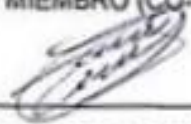
SEGUNDO MIEMBRO (TUTOR):

Rodolfo Ungerfeld

TERCER MIEMBRO:


Juan Manuel Durán

CUARTO MIEMBRO (CO-TUTOR):


Juan Carlos Orihuela

FECHA:

AUTORES:


Sofía Lafourcade

Manuela Molina

AGRADECIMIENTOS

Estas líneas son dedicadas a aquellas personas que colaboraron directa e indirectamente con nuestra carrera, este proyecto y esta etapa final.

A nuestro tutor Rodolfo Ungerfeld por estar siempre a disposición y ayudarnos a lo largo de este camino de investigación y aprendizaje.

A nuestro cotutor Juan Carlos Orihuela, por permitirnos formar parte de su proyecto de Doctorado.

A todos los compañeros de la Unidad de Fisiología, por colaborar con el proyecto, y hacer que el trabajo sea más ameno.

Un especial agradecimiento a nuestra familia y amigos, que nos apoyan desde un principio, sin ellos no podríamos haberlo logrado.

A los compañeros que transitaron por nuestra vida académica, las enseñanzas que nos deja formar parte de Facultad, no solo en el ámbito estudiantil, sino que también en lo personal.

Por último, a nuestra querida Facultad de Veterinaria UdelaR, que nos ha dado la oportunidad de hacer la carrera que amamos con el corazón, permitirnos formarnos como profesionales con las herramientas y conocimiento, tanto con valores y ética profesional.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACION	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
1. INTRODUCCION	8
2. REVISION BIBLOGRAFICA	9
2.1. Anatomía y fisiología del aparato reproductor del carnero	9
2.2. Composición y evaluación del semen	15
2.3. Técnicas de colección de semen	19
2.4. Fisiología de la eyaculación	20
2.5. Rol de la oxitocina en la eyaculación	22
2.6. Oxitocina y características del semen fresco	22
3. HIPOTESIS	27
4. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo general	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1. Animales y su manejo	28
5.2. Metodología de electroeyaculación	28
5.3. Evaluación del semen fresco	28
5.4. Análisis estadístico	29
6. RESULTADOS	30
7. DISCUSION	32
8. CONCLUSIONES	33
9. BIBLOGRAFIA	34

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Figura 1: Órganos genitales del carnero	9
Figura 2: Tránsito y cambios de los espermatozoides a lo largo del epidídimo	11
Figura 3: Glande en diferentes especies productivas	13
Figura 4: Vista lateral izquierda de la parte libre del pene del carnero	14
Figura 5: Dibujo de una sección transversal de un túbulo seminífero de mamífero	14
Figura 6: Formas de movilidad del esperma	17
Figura 7: Captura de HOST	19
Tabla 1: Determinación de la concentración espermática a través del color del eyaculado	16
Tabla 2: Escala de motilidad masal e individual	17
Tabla 3: Resumen comparando técnicas de colección de semen: Vagina artificial y electroeyaculación	20
Tabla 4: Resumen de la evidencia publicada sobre aplicación de oxitocina previo a la eyaculación en diferentes especies	23
Tabla 5: Resumen de la evidencia publicada sobre aplicación de oxitocina previo a la eyaculación en carneros	24
Tabla 6: Resultados del espermiograma básico	30
Tabla 7: Cantidades totales de espermatozoides en el eyaculado	30
Tabla 8: Resultados del CASA	31

LISTA DE ABREVIATURAS

EE	Electroeyaculación
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
SC	Subcutáneo
VA	Vagina artificial

RESUMEN

La vagina artificial es el método más utilizado para colectar semen en carneros, pero es imprescindible el entrenamiento del animal. Como alternativa para machos no entrenados se utiliza la electroeyaculación. El semen colectado con esta técnica tiene mayor volumen, con menor concentración de espermatozoides que el obtenido por vagina artificial. Por esto, el objetivo del presente trabajo fue determinar si la administración de un análogo de oxitocina de larga acción (carbetocina) previo a la electroeyaculación en carneros mejora la calidad del semen fresco, y si el resultado es mejor cuando la misma se administra 10 o 20 min antes de la colección. Se utilizaron 12 carneros Corriedale, adultos, con experiencia sexual y andrológicamente aptos. Se colectó semen de cada carnero con 3 tratamientos diferentes, en diferente orden: tratamiento G-20, en el que se administró carbetocina 20 min antes de la electroeyaculación; el tratamiento G-10 recibió la administración de carbetocina 10 min antes de la electroeyaculación, y el grupo control (GCon), no recibió tratamiento. El trabajo fue realizado en tres días, en los cuales cada cuatro días 4 carneros recibieron uno de los 3 tratamientos, recibiendo así todos los carneros todos los tratamientos. La carbetocina se administró en una única dosis de 0,2 mg/100 kg peso vivo por vía intravenosa en la vena yugular. Se colectó semen por electroeyaculación, y se midió su volumen, se determinó la concentración con un fotómetro y se evaluó la motilidad espermática de masa (escala 0 a 5). Se determinó el porcentaje de espermatozoides motiles y con motilidad progresiva, así como sus velocidades (curvilínea, rectilínea y promedio tanto de lentos, medios y rápidos y también los porcentajes de espermatozoides motiles y con motilidad progresiva, rápidos, medios y lentos, porcentaje de no progresivos y de inmóviles) en forma automatizada mediante el ISAS (Sistema Integrado de Análisis Espermático, Valencia, España). Se evaluó la integridad de la membrana utilizando el test de HOST, y se fijó una muestra para determinar el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales. A partir de estos datos se calculó la cantidad total de espermatozoides eyaculados, de espermatozoides motiles y con motilidad progresiva, con membrana íntegra, morfológicamente normales, y vivos en el eyaculado. Los animales tratados con carbetocina eyaculaban semen con mayor concentración espermática, y mayor cantidad de espermatozoides motiles, con motilidad progresiva, normales y con integridad de membrana, que los GCon, sin diferencia entre ellos. El volumen, porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y con membrana funcional tendieron a ser diferentes. En conclusión, la administración de carbetocina tanto 10 como 20 minutos previo a la electroeyaculación en carneros aumentó la cantidad de espermatozoides, y por tanto de dosis inseminantes colectadas, y tendió a mejorar la calidad seminal.

SUMMARY

The artificial vagina is the most used method to collect semen in rams, but training of the animal is essential. As an alternative for untrained males, electroejaculation is used. The semen collected with this technique has a greater volume, with a lower concentration of sperm than that obtained with artificial vagina. Therefore, the aim of the present work was to determine if the administration of a long-acting oxytocin analog (carbetocin) prior to electroejaculation in rams improves the quality of fresh semen, and if the result is better when it is administered 10 or 20 min before the collection. Twelve Corriedale rams, adults, sexually experienced and andrologically approved, were used. Semen was collected from each ram with three different treatments, in different order: G-20 treatment, in which carbetocin was administered 20 min before electroejaculation; the G-10 treatment received the administration of carbetocin 10 min before electroejaculation, and the control group (GCon) received no treatment. The work was carried out in three days, in which every four days 4 rams received one of the 3 treatments, thus receiving all the rams all the treatments. Carbetocin was administered in a single dose of 0.2 mg/100 kg of body weight intravenously into the jugular vein. Semen was collected by electroejaculation, and its volume was measured, the concentration was determined with a photometer, and sperm mass motility was evaluated (scale 0 to 5). The percentage of motile sperm and sperm with progressive motility was determined, as well as their velocities (curvilinear, rectilinear and average of slow, medium and fast, and also the percentages of motile sperm and with progressive motility, fast, medium and slow, percentage of no progressive and immobile sperm) with the aid of an automated system (ISAS; Integrated Sperm Analysis System, Valencia Spain). Membrane integrity was evaluated using the HOST test, and a sample was fixed to determine the percentage of morphologically normal sperm. From these data, the total number of ejaculated spermatozoa, motile spermatozoa, sperm with progressive motility, with intact membrane, morphologically normal, and alive in the ejaculate was calculated. The animals treated with carbetocin ejaculated semen with a greater sperm concentration, quantity of motile spermatozoa, sperm with progressive motility, normal and with functional membrane sperm, than the GCon, with no difference between them. The volume, percentage of morphologically normal and membrane-functional sperm tended to be different. In conclusion, the administration of carbetocin both, 10 and 20 minutes prior to electroejaculation, increased the amount of sperm - and therefore inseminating doses - collected in rams, and tended to improve semen quality.

1. INTRODUCCION

La inseminación artificial, al igual que las demás biotecnologías reproductivas, requiere de metodologías de colección de semen que sean sencillas y seguras de aplicar, que no afecten el bienestar de los animales, permitan coleccionar semen de buena calidad, y que resista a los procesos de criopreservación. Si bien el uso de vagina artificial (VA) es la técnica más utilizada para coleccionar semen, tiene el inconveniente de requerir del entrenamiento previo de los animales, y no siempre es posible utilizarla, por lo que su aplicación no siempre es práctica. En estos casos, el método alternativo más utilizado es la electroeyaculación (EE), ya que es una técnica práctica, rápida y sencilla de aplicar. A diferencia de la VA, la EE no requiere importante entrenamiento del personal ni de los animales, y el resultado es menos afectado por el estado fisiológico del animal. En este experimento se planteó administrar carbetocina, un análogo sintético de la oxitocina de larga acción antes del procedimiento. Dado que la oxitocina estimula la motilidad del músculo liso del aparato reproductivo de los machos, su aplicación previa a la EE podría mejorar la calidad seminal dado que estimularía el proceso de eyaculación. La administración de oxitocina generó resultados positivos antes de la colección de semen por masaje ecoguiado de las glándulas anexas en chivos (Ungerfeld et al., 2016), pero dado que la oxitocina se metaboliza muy rápidamente, su utilización puede estar limitada por los tiempos en su administración. Por eso, se planteó que la carbetocina podría simplificar este proceso permitiendo resultados al menos similares. Entonces, se propuso como objetivo evaluar si la administración de una oxitocina de larga acción (carbetocina) previo a la EE (10 o 20 min antes de la EE) mejora la calidad de semen fresco.

2. REVISION BIBLOGRAFICA

2.1. Anatomía y fisiología del aparato reproductor del carnero

El aparato reproductor del macho está compuesto por órganos que actúan de manera conjunta para producir espermatozoides y depositarlos en el tracto genital femenino (Klein, 2014). El aparato genital comprende testículos, epidídimos, ductos excretores (deferentes), glándulas anexas, pene y uretra (Figura1).

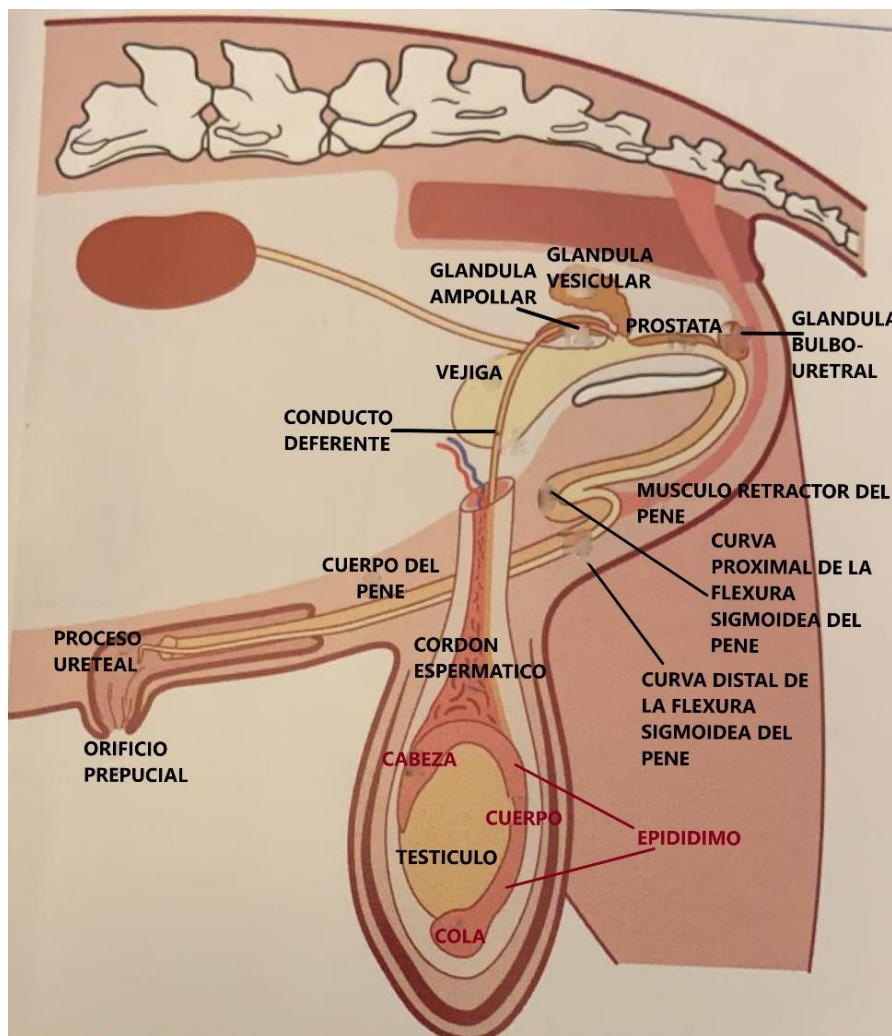


Figura 1- Órganos genitales del carnero (Adaptado de Pérez, 2020)

Testículo: Gónada masculina. Es un órgano par y globuloso, alojado con el epidídimo en el fondo de la cavidad vaginal dentro del escroto, con topografía variable según especies. El peso varía mucho según la edad, estado fisiológico y la especie. Los rumiantes presentan testículos alargados, con dos caras (lateral y medial), dos bordes (epididimario y libre), una extremidad capitata y una extremidad caudata que se une a la cola del epidídimo por el ligamento propio del testículo (Pérez, 2020). Las gónadas son las encargadas de la producción de

espermatozoides y la testosterona. Están suspendidos dentro del escroto, el cual es fundamental por proteger de agresiones externas y proporcionarles una temperatura ambiente 2-3°C menor que en el interior del abdomen, acordando una condición apropiada para una correcta espermatogénesis. También en la superficie escrotal se sitúan gran número de glándulas sudoríparas con activa participación en la diseminación del calor (Durán del Campo, 1994). El escroto ayuda a la termorregulación por medio de diversos mecanismos como la conducción, la convección y la evaporación. La arteria espermática también juega un rol central en el mantenimiento de la temperatura gracias a su gran enrollamiento y por formar parte del plexo pampiniforme, transfiriendo el calor procedente de las arterias testiculares (alta temperatura) hacia las venas (bajas temperaturas) por un sistema de intercambio de calor a contracorriente (Klein, 2014). El cordón espermático (*Funiculis spermaticus*) se extiende entre los testículos y el anillo vaginal. Está formado por dos partes, el conducto deferente y el cono vascular comprendido por las flexuosidades de la arteria testicular y el plexo pampiniforme. El cordón también incluye los vasos linfáticos y nervios del testículo y epidídimo (Pérez, 2020). Los testículos deben descender al escroto, lo que fisiológicamente ocurre en diferentes etapas según la especie, pudiendo ser prenatal o posnatal. En el caso de los ovinos, los testículos descienden antes de nacer, a mediados de la gestación, aproximadamente a los 80 días (Klein, 2014).

Epidídimo: órgano alargado arqueado en un lado del testículo a lo largo de su eje longitudinal, dividido macroscópicamente en una cabeza prominente situada cerca de la suspensión del testículo desde el cordón espermático, un cuerpo más pequeño situado medialmente y una cola distendida, que se continúa con los conductos deferentes (Arthur, 2001). En este órgano se da el tránsito de espermatozoides, el que ocurre a una tasa constante e independientemente del estímulo sexual en cabeza y cuerpo epididimario, a diferencia de la cola del epidídimo, donde el tiempo de permanencia de los espermatozoides disminuye con el estímulo sexual y la eyaculación frecuente. En carneros el tiempo de transporte es de 1 día en cabeza, 3 días en cuerpo y 8 a 15 días en cola. La cola epididimaria también permite el almacenamiento, modifica el entorno de los espermatozoides y aumenta su concentración mediante la absorción-secreción del epitelio (Gil, 2020). Por ello, macroscópicamente la cola se ve turgente con el semen almacenado en animales sexualmente activos (Arthur, 2001). Los espermatozoides defectuosos son eliminados mediante procesos de licuefacción y fagocitosis (Gil, 2020). Los espermatozoides cuando salen de los testículos son inmaduros e infértiles y deben pasar por un período de maduración (generalmente 10-15 días) dentro del epidídimo para ser capaces de fertilizar óvulos (Frandsen, Lee Wilke y Dee Fails, 1965). Una vez madurados en el epidídimo, los espermatozoides están listos para continuar su tránsito hacia el conducto deferente y la ampolla del deferente (Gil, 2020).

Entonces, el paso de los espermatozoides por el epidídimo consta de: un pasaje por la cabeza (Figura 2A) en donde se reabsorben y secretan fluidos, el espermatozoide tiene gota citoplasmática proximal y es infértil e inmóvil, continúa por el cuerpo lugar en el que se compacta el núcleo; la gota pasa a distal y aquí adquieren motilidad y capacidad de fertilizar (Figura 2B), por último llegan a la

cola que en su parte proximal terminan de madurar, y una vez en la parte distal pueden ser eyaculados y pueden tener motilidad y ser fértiles (Figura 2C) (Arthur, 2001; Gil, 2020). Aunque los espermatozoides alojados en la cola del epidídimo presentan capacidad de ser motiles, la motilidad en sí no se despliega hasta el momento de la eyaculación. Por lo tanto, los espermatozoides dentro del epidídimo exhiben poca motilidad, pero se activan rápidamente al mezclarse con plasma seminal durante la eyaculación (Arthur, 2001).

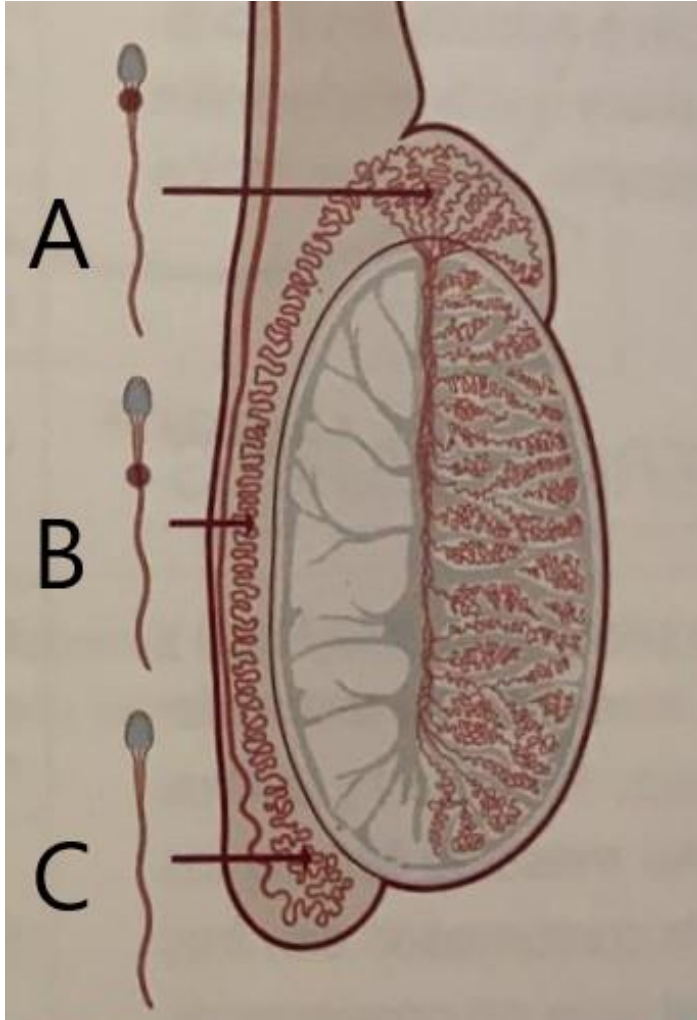


Figura 2- Tránsito y cambios de los espermatozoides a lo largo del epidídimo. Cabeza (A) cuerpo (B) y cola (C) (Adaptado de Gil, 2020).

Conducto deferente: (*vasa deferentia*): Ubicado desde la cola del epidídimo a la parte pelviana de la uretra. Luego de haber transitado en el cordón espermático, el conducto se dirige sobre el costado de la cavidad pelviana y luego en la cara dorsal de la vejiga (Pérez, 2020). Es un tubo muscular que sufre contracciones peristálticas durante la eyaculación, impulsando los espermatozoides desde el epidídimo hacia la uretra (Frandsen et al., 1965).

Glándulas anexas: Aportan elementos químicos importantes para la funcionalidad del semen, otorgando fluidez y volumen suficiente para su desplazamiento, y elementos para permitir el despliegue de la motilidad de los

espermatozoides (Durán del Campo, 1994). Son glándulas pares a excepción de la próstata (Figura 1). Hay una variación considerable en presencia, forma y tamaño entre especies, pero la ubicación relativa es similar en todos los animales. El carnero presenta todas las glándulas accesorias (Arthur, 2001), las cuales son:

- *Glándula vesicular o vesículas seminales*: Anexa a la terminación del conducto deferente, situada entre vejiga y recto, cubriendo la cara dorsal de la vejiga. Su conducto se une al deferente para formar el conducto eyaculador, que atraviesa la próstata antes de abrirse en la uretra por el orificio eyaculador (Pérez, 2020). En el carnero, al igual que en el toro son glándulas lobuladas, de tamaño considerable (Frandsen et al., 1965). Su secreción generalmente es acuosa, y contribuye sustancialmente al volumen de semen. En todas las especies su secreción contiene grandes cantidades de citrato, y en los rumiantes también contiene fructosa (Arthur, 2001).
- *Próstata*: Es un complejo glandular compuesto por lóbulos diseminados sobre el trayecto de la uretra, conocido como parte diseminada de la próstata y el cuerpo de la próstata localizado sobre la superficie dorsal de la uretra en su unión con la vejiga, el que es inexistente en carneros (Pérez, 2020; Ortiz, 1999). Forma el volumen principal del eyaculado produciendo una secreción alcalino lechosa y espesa que le da al semen su olor característico (Frandsen et al., 1965). A su vez, este fluido contiene antiglutinina cefálica, proteína que previene la aglutinación de los espermatozoides y prostaglandinas que favorecen motilidad uterina (Ortiz, 1999).
- *Glándula bulbouretral*: también llamada “*Glándula de Cowper*” es bilateral, de forma piriforme localizada a cada lado del plano medio a la salida de la pelvis. Cada glándula tiene un conducto que desemboca en la uretra a nivel del arco isquiático (Ortiz, 1999). Es muy pequeña en rumiantes (Pérez, 2020). Su secreción acuosa se descarga antes del coito y se considera que limpia la uretra de desechos de orina, es una secreción preseminal, y proporcionan el componente gelatinoso del eyaculado que forma el gel del semen (Arthur, 2001; Ortiz, 1999).
- *Glándula ampollar*: En la mayoría de las especies, incluidos los ovinos, la última parte del conducto deferente justo antes de que ingresen a la uretra pélvica, está abultada y se transforma en una estructura glandular: la ampolla del conducto deferente (Arthur, 2001; Pérez, 2020). El contenido se vacía en el conducto deferente y aporta al volumen seminal (Frandsen et al., 1965).

Pene: órgano copulador del macho, de tipo fibroelástico y sigmoideo en el carnero (Klein, 2014). Tiene una raíz un cuerpo y un glande, y está constituido por los cuerpos cavernosos, el cuerpo esponjoso del glande y del pene, todas formaciones eréctiles anexas a la parte extrapelviana de la uretra. La mayor parte de la estructura interna del cuerpo del pene se compone de columnas de tejido eréctil, los cuerpos cavernosos, los cuales están repletos de vasos sanguíneos sinusoides divididos por láminas de tejido conectivo llamadas trabéculas. En

especies con pene fibroelástico (rumiantes y porcinos), las trabéculas forman la mayor parte del pene, y como consecuencia, en estos animales el pene es firme cuando no está erecto. En el surco ventral de la línea media entre los cuerpos cavernosa está la uretra y un cuerpo asociado de tejido eréctil, denominado el cuerpo esponjoso (Frandsen et al., 1965).

El glande del pene muestra variaciones considerables intraespecies (Figura 3). Los ovinos presentan una porción libre de la uretra, el proceso uretral, que se proyecta más allá del glande, abriéndose en la punta del orificio uretral externo. Este es largo, de aproximadamente 4 cm, y comúnmente se le llama “apéndice vermiforme” (Figura 4). En rumiantes el glande tiene forma de casco, es muy asimétrico y está incurvado en gancho hacia la izquierda (Frandsen et al., 1965; Pérez, 2020).

Durante la erección, el pene aumenta muy poco en longitud y diámetro. Se torna rígido, la flexura sigmoidea desaparece, y el órgano sobresale a través del orificio prepucial (Ortiz, 1999). Por el tipo de pene fibroelástico, en esta especie el efecto principal de la erección del pene consiste en alargarlo enderezando la línea sigmoidea (Frandsen et al., 1965).

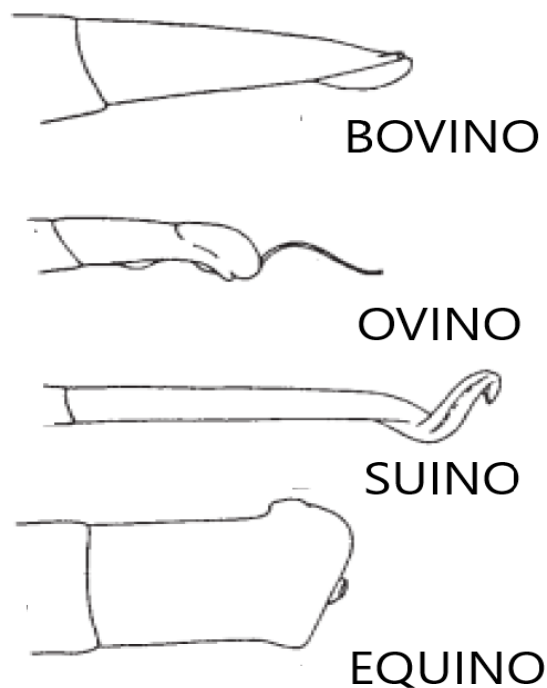


Figura 3- Glante en diferentes especies productivas (Adaptado de Frandsen, 1965).



Figura 4- Vista lateral izquierda de la parte libre del pene del carnero (Adaptado de Pérez, 2020).

MORFOFISIOLOGIA TESTICULAR: “El testículo es una glándula mixta, con secreción externa (fluido testicular, con los espermatozoides) e interna (hormonas testiculares). Su parénquima está organizado en túbulos seminíferos y espacio intersticial” (Bielli, 2020). En el grueso epitelio seminífero se encuentran las *células de Sertoli* (Figura 5), las que son grandes, diploides y ramificadas, con múltiples funciones como: coordinar la espermatogénesis y la liberación de espermatozoides a la luz del túbulo seminífero, mantener el componente principal de la barrera hematotesticular, delimitar el compartimiento basal del epitelio seminífero y lumen, fagocitar células germinales dañadas, secretar inhibina y en algunas especies secreta estrógenos. Las *células de la línea germinal* (Figura 5), mucho más pequeñas y abundantes incluyen las espermatogonias, espermatocitos I y II, espermátidas y espermatozoides. En el intersticio testicular hay un tejido conjuntivo laxo muy rico en capilares sanguíneos y linfáticos que contiene las *células de Leydig* las cuales secretan principalmente andrógenos que estimulan la espermatogénesis. También secretan estrógenos y oxitocina. A su vez, en el intersticio se encuentran los macrófagos testiculares para modular la secreción de andrógenos de estas células y colaboran en el mantenimiento de esa secreción en niveles normales (Bielli, 2020).

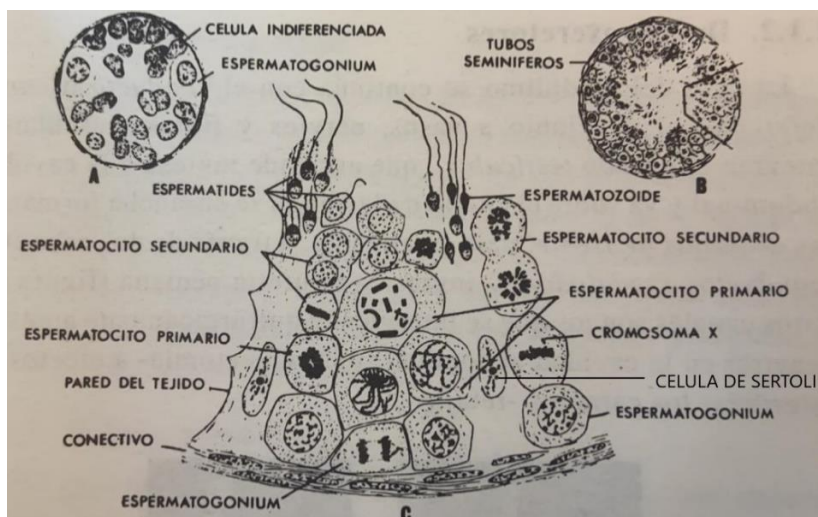


Figura 5- Dibujo de una sección transversal de un túbulo seminífero de mamífero (Adaptado de Durán del Campo, 1994).

2.2. Composición y evaluación del semen

El semen consiste en espermatozoides suspendidos en las secreciones líquidas de los órganos sexuales accesorios masculinos. La porción fluida del semen es el plasma seminal el cual funciona como medio de transporte para los espermatozoides, y contiene una variedad de sustancias que incluyen varios electrolitos, fructosa (aporta energía para los espermatozoides), ácido cítrico y sorbitol (Frandsen et al., 1965). En cuanto a composición química, está integrado por un 86% de agua y 14% de materia seca que incluye: minerales, aminoácidos, carbohidratos, polisacáridos, ácido láctico, ácido cítrico, proteínas, vitaminas y enzimas (Durán del Campo, 1994). El semen colectado se evalúa como parte de protocolos para evaluar la fertilidad potencial de los reproductores, pero ninguna característica seminal por sí sola predice completamente la fertilidad de una determinada muestra de semen. Algunas características del semen que son evaluadas y parecen tener alguna correlación con la fertilidad potencial cuando se consideran juntos son: concentración de espermatozoides, motilidad de los espermatozoides y forma de los espermatozoides (Frandsen et al., 1965).

El espermiograma básico incluye test macroscópicos y microscópicos. Los primeros, realizados inmediatamente de colectado el eyaculado, son los más viables de emplear por no necesitar materiales especiales para su realización (Fernández Abella, 2015). Estos incluyen:

Volumen: Evaluado en copa o tubo graduado, normalmente en carneros está entre 0,8 y 1,2 mL, variando según la excitación del carnero, edad, técnica de colecta, habilidad del operador, volumen testicular (Durán del Campo, 1994), época del año en que se realiza la colecta, estado nutricional y sanitario del animal y número de eyaculados por día (Fernández Abella, 2015).

Motilidad de masa: o *motilidad espermática masal* observada en el propio tubo de colecta o copa recolectora, bajo luz a simple vista o bajo lupa. Es un test práctico y útil, resultante de tres factores: concentración espermática, motilidad individual, y porcentaje de espermatozoides vivos. Las características de las ondas pueden indicar el tipo de semen: ondas espesas pero lentas, suponen un semen muy denso con muchos espermatozoides muertos arrastrados por los vivos. Ondas rápidas de menos espesor indican buena motilidad, pero baja concentración. Ausencia de motilidad de masa y opacidad pueden ser indicativos de azoospermia (Durán del Campo, 1994).

Concentración: Las concentraciones de espermatozoides varían entre especies, y esto debe tenerse en cuenta al evaluar el semen (Frandsen et al., 1965). Macroscópicamente, la opacidad, intensidad de la onda móvil y la apariencia dan una aproximación a la concentración espermática, sin necesidad de instrumental (Tabla 1) (Durán del Campo, 1994).

Tabla 1- Determinación de la concentración espermática a través del color del eyaculado (Adaptado de Olivera, Gil, Fierro y Minteguiaga, 2019).

TONALIDAD	CONCENTRACION ESTIMADA (millones/mL)	ESCALA	USO
Cremoso espeso	4500-6000	5	Utilizable
Cremoso	3500-4500	4	Utilizable
Crema liviana	2500-3500	3	Utilizable
Lechoso	1000-2500	2	Descarte
Turbio	300-1000	1	Descarte
Acuoso	Insignificante	0	Descarte

Color: el semen debe ser blanco-cremoso y depende de la concentración de espermatozoides: la disminución de la concentración lo transforma en lechoso, y en la azoospermia es casi incoloro. Un color rojizo puede aparecer en caso de infecciones o lesiones intermas del pene o prepucio. Un color verdusco puede ser normal, siendo mas comun en bovinos (Durán del Campo, 1994; Fernández Abella, 2015). Semen con colores rojizos, grises o marrones deben ser desechados y proceder a la revisión del macho (Cueto, Gibbons, Bruno-Galarraga, Fernández, 2016).

Olor: El semen deberá ser inodoro salvo que exista un foco infeccioso (Durán del Campo, 1994).

pH: puede ser medido con papel indicador. Oscila entre 6,3-7,2. Debería ser evaluado mensualmente, descartando sémenes en rangos anormales (Fernández Abella, 2015).

En cuanto a los test microscópicos, se utiliza microscopio óptico, colocando el semen en una platina térmica o calentada a 35-37°C (Fernández Abella, 2015) evaluando:

Motilidad: se entiende por motilidad o movilidad al desplazamiento del espermatozoide que puede ser (Figura 6): progresivo o rectilíneo el espermatozoide (se proyecta hacia adelante), de retroceso y zigzagueante (el avance sigue un recorrido vacilante con frecuentes curvas, muchas veces se dirige hacia atrás por anomalías de cola), oscilatorio (el espermatozoide gira sin avanzar con movimientos reducidos hacia ambos lados. Este movimiento antecede a la inmovilización completa) o vibratorio (simples movimientos

vibratorios describiendo círculos). El movimiento progresivo es el que determina que el espermatozoide avance y pueda fecundar (Fernández Abella, 2015).

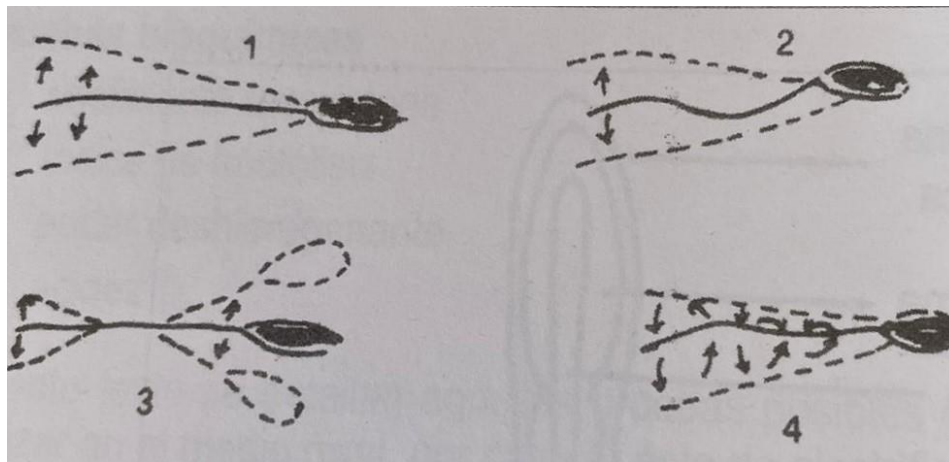


Figura 6- Formas de movilidad del espermia 1- progresivo, 2- zigzagante, 3-oscilatorio, 4- vibratorio (Fernández Abella, 2015).

La Tabla 2 muestra la alta relación entre motilidad masal e individual (Adpatado de Moule, 1961, citado por Durán del Campo, 1994).

Tabla 2 - Escala de motilidad masal e individual (Adpatado de Moule, 1961, citado por Durán del Campo, 1994).

ESCALA	MOTILIDAD MASAL (MACROSCÓPICA)	MOTILIDAD INDIVIDUAL (MICROSCÓPICA - 200X)	USO
0	Sin corrientes	Sin movimiento progresivo	Descarte
1	Pocas corrientes	20% de movimiento progresivo	Descarte
2	Muchas corrientes moderadas	40% de movimiento progresivo	Descarte
3	Muchas corrientes	60% de movimiento progresivo	Utilizable
4	Muchas corrientes rápidas	80% de movimiento progresivo	Utilizable
5	Numerosas ondas de tipo tumultuoso rápidas y vigorosas	Casi 100% de movimiento progresivo	Utilizable

Concentración: existen distintos métodos a la hora de determinar la concentración espermática, entre ellos: la cámara de Neubauer o con el uso de fotocolorímetros. Ambos métodos son precisos; si bien el fotocolorímetro permite

un recuento más rápido en comparación con la cámara de Neubauer, su costo es más elevado (Cueto et al, 2016):

- Cámara de Neubauer: se aspira en una pipeta una solución de semen (suero fisiológico, cloruro de sodio 10%, solución de Harem). Luego de limpiar el extremo de la pipeta con papel para no alterar los resultados, se procede a cargar la cámara colocando la pipeta en el borde del cubreobjetos, y se dejan caer las gotas del semen de forma que la cámara se cargue por capilaridad. Se espera unos minutos para que el semen sedimente y se observa. Generalmente, la cámara cuenta con dos retículos, con 5 cuadrados grandes de cada uno de estos, y cada cuadrado grande presenta 16 cuadrados pequeños divididos por líneas dobles o triples. Esto quiere decir que en total existen 160 cuadrados pequeños, representando una superficie de $10/25 \text{ mm}^2$. Se realiza el conteo moviendo el microscopio y se obtiene la concentración de espermatozoides al multiplicar el número de cuadrados grandes contados por 5.000 (por la superficie de la cámara ($1/2,5 \text{ mm}^2$), la altura de la cámara ($1/10 \text{ mm}$) y la dilución (1:200). El conteo es por cabezas de espermatozoides, pero cuando esta fuera del cuadrado pequeño, se contabiliza si toca la parte inferior o izquierda del cuadrado (Fernández Abella, 2015).
- Fotocolorímetro: este método se basa en exponer una muestra de semen a un haz de luz y registrar la cantidad de luz absorbida por la misma (absorbancia). La concentración será directamente proporcional a la absorbancia (Cueto et al, 2016). Debe ser calibrado por 15 o más hemocitométricos (Cámara de Neubauer) y se debe conocer la dilución con la que ha sido calibrado (Fernández Abella, 2015). La exactitud del colorímetro deberá ser chequeada periódicamente (Cueto et al, 2016).

Morfología: está relacionada con la fertilidad. Existe una correlación elevada entre porcentaje de formas anormales y el poder fecundante del semen. Un eyaculado con más de 20% de espermatozoides con anomalías debería ser eliminado, aunque depende del tipo de formas anormales que integran dicho porcentaje, ya que las anomalías del flagelo están menos relacionadas con la fertilidad del semen (Fernández Abella, 2015). Se evalúa mediante coloración supravital. Para ello se realiza un frotis con 0,1 g de eosina, 0,3 g de citrato de sodio dihidratado, 0,2 g de nigrosina y 10 mL de agua destilada (Fernández Abella, 2015). Si la coloración con eosina se hace sin nigrosina deberá emplearse un filtro azul o un microscopio con contraste de fase. Los espermatozoides muertos o en proceso de muerte, poseen sus membranas permeables a los colorantes. Luego de 1-2 min se observan espermatozoides rojos y no coloreados, sobre el fondo oscuro. La diferencia de coloración se debe a que los espermatozoides vivos al tener su membrana plasmática intacta, no se colorean (Palma, 2007).

Funcionalidad: para evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide se realiza la prueba hipoosmótica, HOST por su denominación en inglés hypo-osmotic swelling test, es una prueba simple y económica. Se fundamenta en que la suspensión de espermatozoides en un

medio hipoosmótico ocasiona un desequilibrio osmótico entre los medios intracelular y extracelular, por lo que se difunde agua al medio intracelular, generando un aumento del volumen del espermatozoide. Esto genera cambios morfológicos característicos, tales como dilatación y enrollamiento de la cola (Figura 7) (Jeyendran, Van der Ven, Perez-Pelaez, Crabo y Zaneveld, 1984).



Figura 7 - captura de HOST 1: espermatozoides normales; 2: espermatozoide biflagelado; 3: espermatozoide con gota citoplasmática distal; 4: espermatozoide enrollado "látigo".

Pureza: se refiere a impurezas como microorganismos, células epiteliales, polvo, que puedan encontrarse en el semen; un ambiente higiénico, instrumental limpio y carneros sanos serán razones suficientes para recoger semen en buen estado de pureza (Durán del Campo, 1994).

2.3. Técnicas de colección de semen

Previo a la colección de semen se recomienda considerar en forma importante la higiene del carnero y del lugar donde se realiza la colecta para evitar cualquier tipo de contaminación. Fernández Abella (2015) describió dos métodos de recolección de semen: la VA, y la EE. Por un lado, la VA es una técnica que tiende asemejarse a la vagina de las hembras por tener dimensiones, temperatura (45-50°C) y humedad semejantes. El macho eyacula previa desviación del pene para que penetre en la VA. Es aconsejable excitar previamente al carnero con ovejas en celo para obtener un buen volumen de eyaculado. En cuanto a la frecuencia de extracción, se pueden obtener tres eyaculados diarios, el tercero de ser necesario, con un intervalo de 15 a 20 min del anterior. Existen diferentes tipos y modelos, aunque genéricamente consta de un tubo rígido o semirrígido de 15-20 cm de largo y 6-8 cm de diámetro. Por dentro pasa otro tubo de goma o látex, menor en diámetro, pero mayor en longitud, cuyos extremos se aseguran con los extremos del tubo rígido. En el

tubo externo se hace un agujero y se coloca una válvula, en la cual se coloca agua. En uno de los extremos se coloca la copa colectora de semen y en el otro se puede colocar lubricante (glicerina, vaselina) (Durán del Campo, 1994).

En algunas ocasiones, como ocurre con los machos no entrenados (Fernández Abella, 2015; Wulster-Radcliffe, Williams, Stellflug y Lewis, 2001), prepuberes (Lacuesta, Orihuela y Ungerfeld, 2015), salvajes (Santiago-Moreno et al., 2010), con impotencia coeundi (Fernández Abella, 2015), fuera de estación reproductiva (Lincoln y Davidson, 1977; Chemineau et al., 2008), machos aislados de hembras (Giriboni, Lacuesta, Ungerfeld, 2017), o en establecimientos con muchos animales, no es viable o es poco práctico aplicar esta técnica (Abril-Sánchez, Freitas-de-Melo, Giriboni, Santiago-Moreno y Ungerfeld, 2019). Una opción alternativa a la VA es la aplicación de EE, la cual es una técnica fácil y efectiva, pero dolorosa y estresante (Abril-Sánchez et al., 2019). Como ventaja, esta técnica puede ser aplicada en las situaciones previamente mencionadas que limitan la VA. Este método, en carneros, consiste en la introducción en el recto de una sonda con electrodos unos 15-20 cm, haciendo pasar una corriente de 6-7 V y un número elevado de amperes (Fernández Abella, 2015).

En general, el semen colectado con EE contiene una mayor cantidad de plasma seminal y por tanto mayor volumen que el semen colectado con VA (Austin, Leidy, Krise y Hupp, 1968; Giuliano, Director, Gambarotta, Trasorras y Miragaya, 2008; Mattner y Voglmayr, 1962; Memon, Bretzlaff y Ott, 1986). No ocurre lo mismo con la concentración espermática, ya que la misma es menor cuando se utiliza EE (Mattner y Voglmayr, 1962; Memon et al., 1986). Mattner y Voglmayr (1962) compararon ambas técnicas sin que modificaran la proporción de espermatozoides vivos, morfológicamente normales ni la motilidad de masa. La Tabla 3 resume las diferencias entre las técnicas nombradas

Tabla 3- Resumen comparando técnicas de colección de semen: vagina artificial y electroeyacuación.

VAGINA ARTIFICIAL	ELECTROEYACULACION
Más fisiológica. Simula vagina de la oveja	Estresante y dolorosa
Necesita entrenamiento, machos púberes, excitación, capacidad de monta, estación reproductiva	Poco limitada. Cualquier época, no necesita entrenamiento. Algunos machos no responden
Semen: mayor concentración	Semen: mayor volumen

2.4. Fisiología de la eyacuación

Cópula: El órgano copulador del macho es el pene. El momento de la cópula se inicia cuando el carnero se dirige hacia una hembra y culmina con la eyacuación (Odagiri, Matsuzawa y Yoshikawa, 1995). Este comportamiento está controlado por el sistema nervioso autónomo, los nervios somáticos y por el sistema endocrino (Arai, 2002; Fraser, 1992; Kihara, 2002). Las neuronas motoras que inervan los órganos pélvicos implicados en la cópula y en los episodios de erección y eyacuación están controlados por circuitos de neuronas que se

localizan en los núcleos dorsomedial y dorsolateral de las regiones lumbar y sacra de la médula espinal (Cottrell, Iggo y Kitchell, 1978; Kirk, Kitchell y Carr, 1987). Durante la cópula se produce un incremento en la hormona oxitocina (Sharma, Fitzpatrick y Ward, 1972). En el estudio realizado por Whittington, Assinder, Parkinson, Lapwood y Nicholson (2001) se demuestra la presencia de receptores de la misma en el testículo, el epidídimo y el conducto deferente de los carneros, planteándose que esta hormona desempeña un papel importante en el transporte de los espermatozoides dentro del testículo del carnero. La oxitocina está involucrada en la modulación de la esteroidogénesis y en la contractilidad del tracto reproductivo del macho (Whittington et al., 2001).

Erección: Es una manifestación que implica la acción simultánea de los sistemas vascular, neurológico y endocrino (Klein, 2014). La erección peneana es la respuesta frente a un estímulo neural iniciado por la estimulación táctil apropiada del pene, por estímulos visuales o ambientales. La erección del pene requiere vasodilatación dentro del mismo, lo que resulta en un incremento del flujo sanguíneo hacia el pene. Esta vasodilatación es producida por la liberación de acetilcolina por el sistema nervioso parasimpático, la que actúa sobre las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos secretando así óxido nítrico, que es el responsable de actuar sobre el músculo liso vascular y así producir la vasodilatación (Frandsen et al., 1965).

Eyaculación: La eyaculación consiste en la salida del semen por el orificio uretral debido a las contracciones de la musculatura pélvica y el peristaltismo uretral. Es un reflejo complejo que consta de dos fases distintas: emisión y expulsión o salida del semen (Hellstrom, 2006). La fase de la emisión resulta de la liberación de espermatozoides y líquidos de las glándulas accesorias hacia la uretra como resultado de un reflejo toracolumbar mediado por el sistema simpático que lleva a la contracción del músculo liso del conducto deferente y de las glándulas accesorias (Klein, 2014). La fase de expulsión es la salida del semen desde la uretra, generada por un reflejo parasimpático que produce contracciones en los músculos bulboesponjoso, isquiocavernoso y uretral (Klein, 2014). También se asocia con las contracciones del epidídimo y del conducto deferente (Frandsen et al., 1965). La emisión y expulsión del semen son reflejos autónomos que involucran tanto a la división simpática como a la parasimpática (Frandsen et al., 1965). En el apareamiento, hay un aumento en la frecuencia cardíaca del macho a causa del incremento de la actividad física, así como del estímulo sexual, esto también resulta en un aumento de las concentraciones plasmáticas de cortisol (Gonzalez, Orgeur y Signoret, 1988). La eyaculación en sí está asociada con niveles más altos de cortisol (Gonzalez et al., 1988).

Efecto de la electroeyaculación: La EE produce cambios a nivel fisiológico, neuroendocrino y de comportamiento, indicadores de una respuesta al estrés, asociada con el dolor, por lo que en algunos países se prohibió su uso (Palmer, 2005). Esta técnica estimula en forma rítmica la ampolla del conducto deferente y el plexo sacro nervioso, provocando la erección y la eyaculación (Arthur, 2001). Se ha demostrado que durante la colección de semen con electroeyaculador las descargas causadas por el mismo inducen aumentos en la frecuencia cardíaca (Orihuela, Aguirre, Hernández, Flores-Pérez y Vázquez, 2009), en las concentraciones plasmáticas de cortisol en carneros (Stafford et al., 1996) y en

la frecuencia respiratoria (Damián y Ungerfeld, 2011). Orihuela et al (2009) observaron que la frecuencia cardíaca aumenta durante la eyaculación mediante electroeyaculador, demostrando que fue tanto en carneros anestesiados como en no anestesiados. De todas formas, el aumento de la frecuencia cardíaca puede estar asociado al momento de la eyaculación en sí, y no a la técnica empleada (Sjaastad, Hove y Sand, 2010). Comparando la VA, con la EE, según Martin, Lapwood y Edgar (1984) ambas técnicas aumentan las concentraciones plasmáticas de cortisol luego de la eyaculación en carneros.

2.5. Rol de la oxitocina en la eyaculación

La oxitocina es una hormona neuro-hipofisaria secretada por las neuronas magnocelulares hipotalámicas y almacenada en la hipófisis posterior hasta su liberación a la circulación sanguínea (Thackare, Nicholson y Whittington, 2006). Varios autores señalan que esta hormona actúa sobre el epidídimo (Filippi et al., 2005; Mewe, Wulfsen, Middendorff y Bauer, 2007), estimulando las contracciones de este órgano (Hib, 1974; Nicholson, Parkinson, Lapwood, 1999; Thackare et al., 2006). Por tanto, la oxitocina estimula el transporte de espermatozoides desde la cola del epidídimo hacia el conducto deferente (DaSilva e Souza, Gimeno y Gimeno, 1975; Nicholson et al., 1999; Perumal, 2015; Thackare et al., 2006). De acuerdo a Gimpl y Fahrenholz (2001), Hargrove, MacIndoe y Ellis (1977) y Thackare et al (2006) la oxitocina actúa sobre los túbulos seminíferos. Aunque Whittington et al (2001) no encontró receptores para esta hormona en las células mioideas, es posible que la oxitocina provoque contracciones de los túbulos seminíferos indirectamente, mediante la estimulación de la liberación de factores que posteriormente provocan la contracción de las células mioideas. En todos los casos, para que la oxitocina pueda actuar, deben estar presentes sus receptores (Ellis, Ghosbeckc, Farr y Tesi, 1981; Thackare et al., 2006). En los carneros, Whittington et al (2001) indican la presencia de receptores de oxitocina en los testículos, epidídimos y conductos deferentes, reafirmando el estudio de Maggi, Malozowski, Kassis, Guardabasso y Rodbard (1987), donde previamente se constató la presencia de receptores para esta hormona en los epidídimos (Maggi et al., 1987).

Por otro lado, también están involucradas las glándulas anexas, principalmente la próstata y la expulsión resultante de secreción prostática en el eyaculado (DaSilva e Souza et al., 1975; Gimpl y Fahrenholz, 2001; Thackare et al., 2006). Aunque no ha sido posible encontrar estudios en ovinos, en otras especies ya se ha demostrado la presencia de receptores en próstata (humanos: Frayne y Nicholson, 1998; Whittington, Assinder, Gould y Nicholson, 2004; monos: Einspanier e Ivell, 1997; Frayne y Nicholson, 1998; Assinder, Johnson, King y Nicholson, 2004; y jabalí: Parry y Bathgate, 1998).

2.6. Oxitocina y características del semen fresco

Hay diversos estudios que investigaron si la aplicación de algunas hormonas previo a la colección de semen mejora los resultados de la misma. Dados los efectos descritos de la oxitocina, esta hormona es una de las que se ha evaluado.

En la Tabla 4 se resumen los estudios en varias especies, y en la Tabla 5 específicamente los realizados en carneros.

Tabla 4- Resumen de la evidencia publicada sobre aplicación de oxitocina previo a la eyaculación en diferentes especies.

Autor y año	Especie	Dosis (U.I.)	Vía adm.	Momento aplicado (previo a extracción)	Efectos positivos en variables seminales
Fjellstrom, Kihlstrom y Melin, 1968	Conejo	0,30/kg	iv	Antes (*)	volumen y total de espermatozoides eyaculados
Hess, 2002	Perro	2,5	sc	10 min	volumen
Perumal, 2015	Toro	20	im	10 min	concentración, volumen, motilidad espermática masal, total de espermatozoides eyaculados, espermatozoides con motilidad progresiva (%) y con membrana funcional.
Berndtson e Igboeli, 1988	Toro	50	iv	10 min	SI: total de espermatozoides eyaculados, espermatozoides eyaculados (%).
Palmer, Amundson, Brito, Waldner y Barth, 2004	Toro	100	im	10 min	No
Ungerfeld et al., 2016	Chivo	5	iv	30 s antes	No
Ungerfeld et al., 2018	Chivo	10	im	30 s antes	No
Walch, Eder, Schindler y Feichtinger, 2001	Humano	16	Intra-nasal	5 min	No
Byrne, Rolf, Depenbusch, Cooper y Nieschlag, 2003	Humano	0,75	iv	5 minutos	No

(*): No se detalla el tiempo

adm: administración; U.I: unidades internacionales; iv: intravenoso; sc: subcutáneo; im: intramuscular.

Hess (2002) planteó que probablemente la concentración no se vio afectada por haber sido administrada en forma subcutánea, o porque la dosis administrada fuera insuficiente. Esto podría ser extrapolable a los demás experimentos en que no hubo cambios en el semen obtenido, debiendo conocerse la relación entre dosis, vía de administración y momento para cada especie.

Tabla 5- Resumen de la evidencia publicada sobre aplicación de oxitocina previo a la eyaculación en carneros.

Autor y año	Dosis (U.I.)	Vía adm.	Momento aplicado (previo a extracción)	Técnica	Efectos positivos en variables seminales
Knight y Lindsay, 1970	5, 10 y 20	iv	Antes (*)	EE	volumen
Knight, 1974 (Exp. 1)	10	iv	5, 10 y 20 min	VA	volumen, total espermatozoides eyaculados
Knight, 1974 (Exp. 2)	5, 10, 15	iv	1,5 min	VA	concentración, total espermatozoides eyaculados
Nicholson et al., 1999	5 (10 μ) y 50 (100 μ g)	iv	10 min	IN VIVO	volumen, total espermatozoides eyaculados
Whittington et al., 2001	10 (20 μ g)	Intraarterial (arteria testicular)	Antes (*)	IN VIVO	Concentración (no se estudiaron otras)
Bozkurt, Turk y Gur, 2007	5	iv	10 min	EE	concentración, volumen, motilidad espermática masal, total espermatozoides eyaculados, total espermatozoides motiles eyaculados
El-Badry, Faten y Mona, 2013	10 U.I	iv	10 min	VA	volumen, total espermatozoides eyaculados, total espermatozoides motiles eyaculados

(*): No se detalla el tiempo

adm: administración; U.I: unidades internacionales; iv: intravenoso.

Knight (1974) logró aumentar la concentración cuando aplicó oxitocina 1,5 min antes de la colección, pero solo el volumen cuando la aplicó 5, 10 o 20 min antes. Esto explica que los efectos en cada órgano serán diferentes según en qué momento fue aplicada la oxitocina. Es decir, al aplicarla 1,5 min antes se estimularía el epidídimo y el consecuente aumento de transporte de espermatozoides de cola a conducto deferente para ser eyaculados, obteniendo un aumento en la concentración, mientras que, al administrar la hormona con un

mayor tiempo (5, 10 o 20 min) antes de la eyaculación, estimularía las glándulas anexas, implicadas principalmente en el aporte del plasma seminal contribuyendo así al volumen.

Ungerfeld et al (2018) planteó que podría ser interesante estudiar el uso de presentaciones de la hormona de acción prolongada o su inyección repetida, dada la corta vida media de la oxitocina. En este sentido, Knight (1974) obtuvo aumento en la concentración únicamente cuando la hormona fue administrada 1,5 min antes de la eyaculación, lo que también se asocia a la vida media corta de esta hormona de 2-3 minutos (Ministerio de Sanidad Política Social e Igualdad, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2006). El-Badry et al (2013) demostró que la inyección repetida de oxitocina antes de la extracción de semen aumenta el volumen y el número total de espermatozoides por eyaculado sin alterar la calidad de semen fresco ni efectos nocivos sobre las actividades antioxidantes del plasma seminal en carneros. Hasta ahora no se han estudiado las posibles ventajas de la inyección de presentaciones de larga acción. Por ello, en este trabajo se plantea el uso de la carbetocina, sustancia sintética de características análogas a la oxitocina que por su estructura química presenta una vida media superior a la de la oxitocina (6 – 7 horas) (Ministerio de Sanidad Política Social e Igualdad, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, Departamento de Productos Veterinarios, 2016). Si bien su uso comercial está dirigido a hembras (agalaxia, mastitis, regulador del parto), no se conoce el resultado de su aplicación en machos.

El uso de hormonas de acción prolongada implica considerar el tiempo previo de administración. Una aplicación con demasiada anterioridad a la eyaculación podría tener efectos negativos en el semen por un estímulo prolongado en los órganos reproductores y sin efectuarse la eyaculación, los espermatozoides se mantendrían en el entorno que está siendo afectado, y luego probablemente los mismos espermatozoides se afecten.

3. HIPOTESIS

La administración de carbetocina previo a la EE aumenta la colección y mejora la calidad del semen fresco obtenido en carneros.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General:

Determinar si la administración de un análogo de la oxitocina de larga acción (carbetocina) previo a la EE (10 o 20 min antes de la EE) mejora los resultados del semen colectado.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Animales y su manejo

El trabajo con los animales se realizó la primer semana de diciembre del año 2020, en las instalaciones de Fisiología de la Facultad de Veterinaria (Montevideo, Uruguay). Se utilizaron 12 carneros Corriedale, adultos, experientes, andrológicamente aprobados. Un mes previo a las colectas de semen del experimento, con intervalos de 3 días se realizaron 3 colectas con el fin de renovar las reservas espermáticas y que los animales lleguen en las mismas condiciones al experimento. Se realizaron tres colectas de semen, en las cuales se incluyeron los tres tratamientos: G-20 el tratamiento en el cual se le administró carbetocina 20 min previo a la EE; el tratamiento G-10 que recibió la administración de carbetocina 10 min previo a la EE, y tratamiento o grupo control (GCon), el cual no recibió tratamiento. Las colectas se realizaron una vez por día en cada animal, recibiendo 4 carneros el mismo tratamiento en forma intercalada. Se volvió a colectar semen cada 3 días, rotando los animales entre tratamientos, de forma de colectar semen de todos los carneros con todos los tratamientos. La dosis de carbetocina aplicada fue 0,2 mg/100 kg peso vivo administrada por vía intravenosa (Ministerio de Sanidad Política Social e Igualdad, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, Departamento de Productos Veterinarios, 2016). Este experimento fue aprobado por CEUA, número del protocolo: 901; número de expediente: 111900-000617-19.

5.2. Metodología de electroeyaculación

Se utilizó un electroeyaculador de ePorvac modelo e325 (Saladillo, Buenos Aires), con una sonda con 2 electrodos longitudinales, aplicando series de 10 pulsos eléctricos de 4 s, alternados con descansos de 2 s. La primera serie comenzó con 2 V, aumentando 1 V cada 10 pulsos hasta lograr la eyaculación. Los animales se colocaron en decúbito lateral derecho, en un cepo especialmente para voltear pequeños rumiantes. Previo a la inserción de la sonda en el recto, se revistió con gel de carboximetilcelulosa para mejorar la conductividad eléctrica.

5.3. Evaluación del semen fresco

El espermigrama básico es un estudio del semen, en el que las variables incluidas en el mismo pueden variar. Generalmente incluyen: volumen, concentración, motilidad espermática masal, porcentaje de espermatozoides motiles, porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y porcentaje de espermatozoides normales.

Una vez colectado el semen se midió su volumen y se procedió inmediatamente a su evaluación. En primer lugar, se determinó la concentración con un fotómetro ya calibrado (SDM1, Minitube, Francia) y la motilidad espermática de masa la cuál, se evaluó en el microscopio óptico con un aumento de 4x, relacionando las corrientes de onda con la escala (0-5) para esta variable (Nikon, modelo Eclipse E200, Shanghai, China). Se determinó el porcentaje de espermatozoides motiles y con motilidad progresiva, así como sus velocidades: curvilínea, rectilínea y promedio tanto de lentos, medios y rápidos y también los porcentajes de

espermatozoides motiles rápidos, medios y lentos, porcentaje de motiles progresivos rápidos medios y lentos, porcentaje de no progresivos y porcentaje de inmóviles utilizando el sistema ISAS (Sistema Integrado de Análisis Espermático, ISAS V1, PROISER, Valencia, España). Se evaluó la integridad de la membrana utilizando el test de HOST (Jeyendran et al., 1984), y se fijó una muestra en formol-citrato y se observaron los campos mínimos para llegar a 100 espermatozoides para determinar el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales. A partir de estos datos también se calculó la cantidad total de espermatozoides eyaculados (volumen x concentración), la cantidad total de espermatozoides motiles y con motilidad progresiva, con membrana íntegra, morfológicamente normales y vivos en el eyaculado (porcentaje de cada categoría X total de espermatozoides en el eyaculado).

5.4. Análisis estadístico

Se utilizó un procedimiento mixto (mixed proc, SAS University Edition), incluyendo como efectos fijos los tratamientos y como efecto aleatorio, el período (es decir, el día de trabajo). Se consideraron como diferencias significativas aquellas con $P \leq 0,05$, y como tendencias cuando $0,05 < P < 0,1$.

RESULTADOS

La concentración fue mayor en G-20 y G-10 que en GCon, sin diferencias entre estos (Tabla 6). El volumen, motilidad espermática de masa, porcentaje de espermatozoides normales y porcentaje íntegros de membrana tendieron a ser diferentes (Tabla 6).

Tabla 6- Resultados del espermiograma básico en carneros con administración de carbetocina 20 minutos antes de la electroeyaculación (G-20) y 10 minutos antes (G-10) y sin administración de carbetocina, grupo control (GCon).

Variable	G -20	G -10	GCon	EE pooleado	P
Volumen(mL)	4,8	5,6	3,4	0,9	0,08
Concentración (millones/mL)	4412 ^a	4210 ^a	2461 ^b	548,7	0,03
Motilidad espermática masal	3,2	3,7	2,5	0,4	0,07
Espermatozoides motiles(%)	80,3	69,1	81,2	4,9	ns
Espermatozoides con motilidad progresiva (%)	56,3	52,8	59,1	4,3	ns
Espermatozoides normales(%)	55,6	49,5	43,6	4,6	0,059
Integridad de membrana(%)	71,1	61,2	54,3	4,7	0,053

Literales diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas

a vs b $p < 0,05$

ns: no significativo

EE pooleado: error estadístico pooleado

La Tabla 7 presenta los resultados de los totales de espermatozoides eyaculados. Como se desprende de la misma, en todas estas variables el resultado fue mayor en los grupos tratados con carbetocina que en el control.

Tabla 7- Cantidades totales de espermatozoides en el eyaculado (millones) de carneros con administración de carbetocina 20 minutos antes de la electroeyaculación (G-20) y 10 minutos antes (G-10) y sin administración de carbetocina, grupo control (GCon).

Espermatozoides eyaculados (millones)	G -20	G -10	GCon	EE pooleado	P
Total	20176 ^a	21324 ^a	10113 ^b	4313	0,02
Motiles	15603 ^{ac}	15141 ^a	7293,9 ^{bd}	2966	0,01
Con motilidad progresiva	10884 ^a	10964 ^a	5130,6 ^b	1975	0,01
Normales	11879 ^c	10853 ^c	4168 ^d	2766	0,003
Con integridad de membrana	14975 ^{ac}	12810 ^a	5958 ^{bd}	2832	0,02

Literales diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas

a vs b $p < 0,05$

c vs d $p < 0,01$

EE pooleado: error estadístico pooleado

En la Tabla 8 se presentan variables registradas y/o calculadas en el ISAS en las que no hubo diferencias.

Tabla 8 - Resultados del CASA en eyaculados de carneros con administración de carbetocina 20 minutos antes de la electroeyaculación (G-20) y 10 minutos antes (G-10) y sin administración de carbetocina, grupo control (GCon).

Variable	G -20	G -10	control	EE pooleado	P
Espermatozoides eyaculados (%)	30,4	35	39,4	5,6	ns
Espermatozoides motiles no progresivos (%)	24,9	21,8	24,6	6,2	ns
Espermatozoides motiles progresivos (%)	44,8	43,2	36,1	6,2	ns
Espermatozoides rápido (%)	61,3	59,5	52,4	6,6	ns
Espermatozoides medios (%)	24,6	24,3	22,7	2,6	ns
Espermatozoides lentos (%)	55,6	51,6	58,3	3,9	ns
Espermatozoides estáticos (%)	30,4	35	39,4	5,6	ns
Espermatozoides progresivos rápidos (%)	61,2	59,5	52,3	6,6	ns
Espermatozoides progresivos lentos (%)	0,03	0,1	0,2	0,1	ns
Espermatozoides no progresivos (%)	8,4	5,3	8,2	2,2	ns
Espermatozoides inmóviles (%)	30,4	35	39,4	7,5	ns
Velocidad curvilínea lentos ($\mu\text{m/s}$)	20,3	24	19,1	3	ns
Velocidad curvilínea medios ($\mu\text{m/s}$)	52,5	50,5	51,3	4,6	ns
Velocidad curvilínea rápidos ($\mu\text{m/s}$)	124,4	129,8	124,4	3,7	ns
Velocidad rectilínea lentos ($\mu\text{m/s}$)	11	12	11,4	1,6	ns
Velocidad rectilínea medios ($\mu\text{m/s}$)	31,8	29,9	32,3	3,4	ns
Velocidad rectilínea rápidos ($\mu\text{m/s}$)	87,3	92	89,1	3,9	ns
Velocidad promedio lentos ($\mu\text{m/s}$)	12,8	14,3	12,5	1,8	ns
Velocidad promedio medios ($\mu\text{m/s}$)	36,7	34	36,3	3,4	ns
Velocidad promedio rápidos ($\mu\text{m/s}$)	98,5	102,5	97,8	4,3	ns

ns: no significativo.

DISCUSION

La administración de carbetocina previo a la electroeyaculación en carneros resultó en un claro incremento en la concentración de espermatozoides. Esto probablemente se explica por la acción contráctil de la hormona en el epidídimo (Hib, 1974; Nicholson et al., 1999; Thackare et al., 2006) y conductos deferentes de carneros (Maggi et al., 1987; Whittington et al., 2001). Por su vida media larga, la carbetocina mantendría en forma continua los estímulos en los órganos reproductores del macho por un período de tiempo más prolongado que la oxitocina, desde su administración hasta la colecta de semen por lo cual se obtiene mayor cantidad de espermatozoides eyaculados. Este aumento en la concentración repercutió en el incremento en la cantidad total de espermatozoides en el eyaculado, espermatozoides motiles, con motilidad progresiva, con integridad de membrana y morfológicamente normales. Todo esto implica que el aumento en la concentración no tuvo consecuencias negativas en los porcentajes de espermatozoides normales, vivos y motiles, siendo estos aptos para utilizarlos en planes de inseminación, ya que la concentración espermática, la motilidad y la forma de los espermatozoides considerados en conjunto, se correlacionan con la fertilidad potencial (Frandsen et al., 1965). En la práctica, esto permitiría obtener una mayor cantidad de dosis inseminantes de semen fresco, o de dosis congelables. Por otra parte, resulta interesante testar esta técnica en animales salvajes, los que deben ser capturados y anestesiados para extraerle semen mediante EE ya que no es posible coleccionar con VA en animales no domesticados.

El volumen seminal tendió a ser diferente. Por ello, con este diseño no se descarta que la administración de carbetocina antes de la EE pueda aumentar también el volumen, considerando que la tendencia se dirige en la misma dirección que la concentración. Además, esto sería consistente con el posible efecto de la carbetocina en las glándulas accesorias del macho ya que dichas glándulas son las principales en aportar al volumen seminal mediante el plasma seminal (Arthur, 2001; Frandsen et al., 1965; Ortiz, 1999), y, tal como se mencionó, la oxitocina estimula su actividad en las glándulas anexas, principalmente la próstata (DaSilva e Souza et al., 1975; Gimpl y Fahrenholz, 2001; Thackare et al., 2006). Por otro lado, otras variables seminales resultaron en fuertes tendencias a favor del tratamiento de carbetocina, como el porcentaje de espermatozoides con integridad de membrana y el porcentaje de espermatozoides normales y Se puede asociar al estímulo de la hormona en el epidídimo (Filippi et al., 2005; Hib, 1974; Mewe et al., 2007; Nicholson et al., 1999; Thackare et al., 2006) y túbulos seminíferos (Gimpl y Fahrenholz, 2001; Hargrove et al., 1977; Thackare et al., 2006): dado que los espermatozoides eyaculados fueron normales y motiles, se asume que provienen de cola del epidídimo, donde previamente adquirieron motilidad y capacidad de fecundar (Arthur, 2001; Gil, 2020). A pesar de adquirir la motilidad en dicho órgano, los espermatozoides no despliegan la motilidad en si hasta el momento de la eyaculación donde se activan al mezclarse con el plasma seminal (Arthur, 2001), el que también puede tener una composición diferente por el estímulo sobre las glándulas anexas. Esto también refuerza el concepto de que los espermatozoides no fueron dañados en el pasaje desde cola del epidídimo hasta

el conducto deferente ni en el proceso de eyaculación, lo que es central al aumentar la cantidad. Finalmente, todo esto demuestra que el tratamiento con carbetocina tiende a mejorar la calidad seminal

No hubo diferencias relevantes en administrar la carbetocina 10 o 20 min antes de la EE. A la hora de utilizarlo en la práctica diaria, permitiría tener cierta flexibilidad en cuanto a los tiempos previos de administración de la carbetocina. Probablemente, una aplicación más temprana a las estudiadas podría afectar negativamente la calidad seminal, ya que, resultaría en un estímulo prolongado de la hormona en el aparato reproductor masculino alterando el entorno de los espermatozoides y su consecuente afección. A partir de esto sería interesante evaluar tiempos mayores, lo que flexibilizaría aún más el manejo en caso de no tener efectos nocivos en la calidad seminal, es decir, encontrar el punto de corte del tiempo previo de la administración de carbetocina en el cual el ambiente comienza a ser nocivo para los espermatozoides, por un estímulo prolongado de la hormona en el aparato reproductor del macho.

CONCLUSIONES

El uso de un análogo de oxitocina (carbetocina) 10 o 20 min previo a la electroeyaculación en carneros permitió aumentar la concentración de espermatozoides en el eyaculado junto a un aumento en la cantidad total de espermatozoides motiles, con motilidad progresiva, con membrana funcional y morfológicamente normales. No se empobreció la calidad e incluso hubo parámetros que tendieron a favorecer la misma (volumen, porcentajes con integridad de membrana y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales). Todo esto permite obtener un mayor número de dosis inseminantes con espermatozoides vivos y motiles por colecta, permitiendo aprovechar al máximo al carnero.

BIBLIOGRAFÍA

- 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. *Animal Reproduction Science*, 205, 1–9.
- Arai, Y. (2002). Central nervous control of male reproduction. *Nippon Rinsho*, 60, 7–15.
- Assinder, S.J., Johnson, C., King, K., y Nicholson, H.D. (2004). Regulation of 5 α -reductase isoforms by oxytocin in the rat ventral prostate. *Endocrinology*, 145, 5767–5773.
- Arthur, G.H. (2001). *Veterinary Reproduction and Obstetrics* (8^a ed.). Londres: Saunders.
- .
- Austin, J.W., Leidy, R.B., Krise, G.M., y Hupp, E.W. (1968). Normal values for semen collected from Spanish goats by two methods. *Journal of Applied Physiology*, 24, 369-372.
- .
- Berndtson, W., y Igboeli, G. (1988). Spermatogenesis, sperm output and seminal quality of Holstein bulls electro ejaculated after administration of oxytocin. *Journal of Reproduction and Fertility*, 82, 467–475.
- Bielli, A. (2020). Control hormonal de la actividad testicular. En Ungerfeld, R (Ed.), *Reproducción de los animales domésticos* (54-58). España: Edra - Grupo Asís.
- Bozkurt, T., Türk, G., y Gür, S. (2007). Effects of exogenous oxytocin on serologic and seminal steroids and semen Characteristics in rams. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences*, 31, 303-309.
- Byrne, M.M., Rolf, C., Depenbusch, M., Cooper, T.G., y Nieschlag, E. (2003). Lack of effect of a single i.v. dose of oxytocin on sperm output in severely oligozoospermic men. *Human Reproduction*, 18, 2098-2102.

- Chemineau, P., Guillaume, D., Migaud, M., Thiéry, J.C., Pellicer-Rubio, M.T., y Malpoux, B. (2008). Seasonality of reproduction in mammals: Cottrell, D.F., Iggo, A., Kitchell, R.L. (1978) Electrophysiology of the afferent innervation of the penis of the domestic ram. *The Journal of Physiology*, 283, 347-367.
- Cottrell, D.F., Iggo, A., y Kitchell, R.L. (1978). Electrophysiology of the afferent innervation of the penis of the domestic ram. *The Journal of Physiology*, 283, 347-367.
- Cueto, M., Gibbons, A., Bruno-Galarraga, M.M., Fernández, J. (2016). *Manual de obtención, Procesamiento y conservación del semen ovino*. (2ª ed.). Argentina: INTA.
- Damián, J.P., y Ungerfeld, R. (2011). The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural parameters. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 646–50.
- DaSilva e Souza, M., Gimeno, M., y Gimeno, A. (1975). Physiologic and pharmacologic studies on the motility of isolated guinea pig cauda epididymis. *Fertility and Sterility*, 26, 1250–1256.
- Duran del Campo, A. (1994). *Manual práctico de inseminación artificial en ovinos*. Montevideo : Hemisferio sur.
- Einspanier, A., y Ivell, R. (1997). Oxytocin and oxytocin receptor expression in reproductive tissues of the male marmoset monkey. *Biology of Reproduction*, 56, 416–422
- El-Badry, D.A., Gabar, F.I., y Shaker, M.H. (2013). The effect of Oxytocin, Prostaglandin f2 α or GnRh injection on fresh and frozen-thawed semen characteristics of rams. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 59, 214-229.

- Ellis, L.C., Ghoesbeck, M.D., Farr, H., y Tesi, R.J. (1981). Contractility of seminiferous tubules as related to sperm transport in the male. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 6, 283-294.
- Fernández Abella., D.H. (2015). *Tecnologías reproductivas bovinas y ovinas*. Montevideo: Hemisferio sur.
- Filippi, S., Morelli, A., Vignozzi, L., Vannelli, G.B., Marini, M., Ferruzzi, P., Maggi, M. (2005). Oxytocin mediates the estrogen-dependent contractile activity of endothelin-1 in human and rabbit epididymis. *Endocrinology*, 146, 3506–3517.
- Fjellström, D., Kihlström, J., y Melin, P. (1968) The effect of synthetic oxytocin upon seminal characteristics and sexual behaviour in male rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility*, 17, 207-209.
- Frandsen, R.D., Lee Wilke, W., y Dee Fails, A. (1965). *Anatomy and physiology of farm animals* (7^a ed.). Nueva Jersey: Wiley Blackwell.
- Fraser, A.F. (1992). *The behaviour of the Horse*. Wallingford: CAB International.
- Frayne, J., y Nicholson, H.D. (1998). Localization of oxytocin receptors in the human and macaque monkey male reproductive tracts: evidence for a physiological role of oxytocin in the male. *Molecular Human Reproduction*, 4, 527–532.
- Gil-Laureiro, J. (2020). El Espermatozoide, desde la espermiación a la fecundación. En Ungerfeld, R (Ed.), *Reproducción de los animales domésticos* (59-62). España: Edra - Grupo Asís.
- Gimpl, G., y Fahrenholz, F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiological Reviews*, 81(2), 629-683.
- Giriboni, J., Lacuesta, L., y 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., y Miragaya, M. (2008). Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*lama glama*). *Animal Reproduction Science* 104, 359–369.
- Gonzalez, R., Orgeur, P., y Signoret, J.P. (1988). Luteinizing hormone, testosterone and cortisol responses in rams upon presentation of estrous females in the nonbreedings season. *Theriogenology*, 30(6), 1075-1086.
- Hargrove, J.L., MacIndoe, J.H., y Ellis, L.C. (1977). Testicular contractile cells and sperm transport. *Fertility and Sterility*, 28, 1146-1157.
- Hellstrom, W. (2006). Current and future pharmacotherapies of premature ejaculation. *The Journal of Sexual Medicine*, 3, 332-41.
- Hess, M. (2002). *The effects of prostaglandin f2 α , oxytocin and gonadotropin releasing hormone on ejaculate characteristics in the dog*. (Tesis de Maestria). Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia.
- Hib, J. (1974). The in vitro effects of oxytocin and vasopressin on spontaneous contractility of the mouse cauda epididymidis. *Biology of Reproduction*, 11, 436–439.
- Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., y Zaneveld, L.J.D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70, 219-228.
- Kihara, K. (2002). Mechanism of ejaculation. *Nippon Rinsho*, 60, 83–7.
- Kirk, E.J., Kitchell, R.L., y Carr, D.H. (1987). Neurophysiologic maps of cutaneous innervation of the external genitalia of the ram. *American Journal of Veterinary Research*, 48, 1162-1166.

Klein, G.B. (2014). *Cunningham fisiología veterinaria* (5ª ed.). Barcelona: Elsevier.

Knight, T.W (1974). The effect of oxytocin and adrenaline on the semen output of rams. *Journal of Reproduction and Fertility*, 39, 329-336.

Knight, T. W., y Lindsay, D. R. (1970) Short- and long-term effects of oxytocin on quality and quantity of semen from rams. *Journal of Reproduction and Fertility*, 21, 523-529.

Lacuesta, L., Orihuela, A., y 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.

Lincoln, G.A., y 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.

Maggi, M., Malozowski, S., Kassis, S., Guardabasso, V., y Rodbard, D.(1987). Identification and characterization of two classes of receptors for oxytocin and vasopressin in porcine tunica albuginea, epididymis, and vas deferens. *Endocrinology*, 120, 986–994.

Martin, I.C.A., Lapwood, K.R., y Edgar, H.J. (1984). Changes in plasma concentrations of cortisol and prolactin in rams associated with ejaculation of semen. *Reproduction in sheep : Australian Wool Corporation technical publication*, 86-88.

Mattner, P.E., y Voglmayr, J.K. (1962). A comparison of ram semen collected by the artificial vagina and by electro-ejaculation. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 2, 78-81

Memon, M.A., Bretzlaff, J.K.N., y Ott, R.S. (1986). Comparison of semen collection techniques in goats. *Theriogenology*, 26(6), 823-827.

Mewe, M., Wulfsen, I., Middendorff, R., y Bauer, C.K. (2007). Differential modulation of bovine epididymal activity by oxytocin and noradrenaline. *Reproduction*, 134, 493–501.

Ministerio de Sanidad Política Social e Igualdad, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, Departamento de Productos Veterinarios. (2016). *Resumen de las características del producto*. Recuperado de <https://dhhb3yazwboecu.cloudfront.net/1032/fichas/1520/decomoton.pdf>. Fecha de ingreso: 14 de enero de 2021.

Ministerio de Sanidad Política Social e Igualdad, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. (2006). *Resumen de las características del producto*. Recuperado de <https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/2017/6/23/116502.pdf>. Fecha de ingreso: 14 de enero de 2021.

Nicholson, H., Parkinson, T., y Lapwood, K. (1999). Effects of oxytocin and vasopressin on sperm transport from the cauda epididymis in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117, 299–305.

Odagiri, K., Matsuzawa, Y., y Yoshikawa, Y. (1995). Analysis of sexual behavior in rams (*Ovis aries*). *Japanese Association for Laboratory*, 44, 187-192.

Olivera Muzante, J., Gil Laureiro, J., Fierro Fernández, S., y Minteguiaga, M. (2019). *Manual Básico para la inseminación artificial en ovinos*. Paysandú, Uruguay.

Orihuela, A., Aguirre, V., Hernández, C., Flores-Pérez, I., y Vázquez, R. (2009). Effect of anesthesia on welfare aspects of hair sheep (*Ovis aries*) during electro-ejaculation. *Journal Animal Veterinary*, 8, 305–308.

Ortiz, J.A. (1999). *Anatomía comparada con aspectos Fisiopatológicos: Caballo, Bovino, Cerdo, Perro, Ave*. Bogotá: Colombia: Universidad Nacional de Colombia, facultad de veterinaria y zootecnia.

- Palma, G.A. (2007). Determinación de la vitalidad espermática. Recuperado de http://www.reprobiotec.com/congel_vivos.html. Fecha de ingreso: 5 de Abril de 2021.
- Palmer, C.W. (2005). Welfare aspects of theriogenology: investigating alternatives to electroejaculation of bulls. *Theriogenology*, 64, 469–79.
- Palmer, C.W., Amundson, S.D., Brito, L.F.C., Waldner, C.L., y Barth A.D. (2004). Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. *Animal Reproduction Science*, 80, 213-223.
- Parry, L.J., y Bathgate, R.A.D. (1998). Mesotocin receptor gene and protein expression in the prostate gland, but not testis, of the tammar wallaby, *macropus eugenii*. *Biology of Reproduction*, 59, 1101–1107.
- Pérez, William. (2020). Anatomía de los Órganos genitales masculinos. En Ungerfeld, R (Ed.), *Reproducción de los animales domésticos* (47-53). España: Edra - Grupo Asís.
- Perumal, P. (2015). Effect of hormones on semen collection and its quality in mithun (*Bos frontalis*). *Indian Journal of Applied Research*, 5(3), 548-549.
- Santiago-Moreno, J., López-Sebastián, A., Coloma, M.A., Toledano-Díaz, A., Gómez-Guillamón, F., Salas-Vega, R., ... Valenciano-Paris, J. (2010). *Técnicas de captura y manejo. Ungulados silvestres de España: biología y tecnologías reproductivas para su conservación y aprovechamiento cinegético* (pp. 17–40). Madrid: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria.
- Sharma, S.C., Fitzpatrick, R.J., y Ward, W.R. (1972). Coital-induced release of oxytocin in the ram. *Journal of Reproduction and Fertility*, 31, 488-489.

- Sjaastad, O. V., Hove, K., y Sand, O. (2010). Reproduction. *Physiology of domestic animals* (2ªed. pp.717–718). Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Stafford, K.J., Spoorenberg, J., West, D.M., Vermunt, J.J., Petrie, N., y Lawoko, C.R.O. (1996). The effect of electro-ejaculation on aversive behaviour and plasma cortisol concentration in rams. *New Zealand Veterinary Journal*, 44, 95– 8.
- Thackare, H., Nicholson, H.D., y Whittington, K. (2006). Oxytocin-its role in male reproduction and new potential therapeutic uses. *Human Reproduction Update*, 12, 437–448.
- Ungerfeld, R., Casuriaga, D., Giriboni, J., Freitas-de-Melo, A., Silveira, P., y Zandonadi Brandao, F. (2018). Administration of cloprostenol and oxytocin before electroejaculation in goat bucks reduces the needed amount of electrical stimulation without affecting seminal quality. *Theriogenology*, 107, 1-5.4
- Ungerfeld, R., Abril-Sánchez, S., Toledano-Díaz, A., Beracochea, F., Castano, C., Giriboni, J., y Santiago-Moreno, J. (2016). Oxytocin administration before sperm collection by transrectal ultrasonic-guided massage of the accessory sex glands in mouflons and bucks. *Animal Reproduction Science*, 173, 13-7.
- Walch, K., Eder, R., Schindler, A., y Feichtinger, W. (2001). The effect of single-dose oxytocin application on time to ejaculation and seminal parameters in men. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18(12), 655-659.
- Whittington, K., Assinder, S., Gould, M., y Nicholson, H. (2004). Oxytocin, oxytocin-associated neurophysin and the oxytocin receptor in the human prostate. *Cell and Tissue*, 318, 375–382.
- Whittington, K., Assinder, S.J., Parkinson, T., Lapwood, K.R., y Nicholson, H.D. (2001). Function and localization of oxytocin receptors in the reproductive tissue of rams. *Reproduction* 122, 317–325.

Wulster-Radcliffe, M.C., Williams, M.A., Stellflug, J.N., y Lewis, G.S. (2001). Artificial vagina vs a vaginal collection vial for collecting semen from rams. *Journal Animal Science*, 79, 2964–2967.