



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**COMPARACIÓN DE LA CALIDAD DE SEMEN OVINO CON MUESTRAS
COLECTADAS MEDIANTE ELECTROEYACULACIÓN (EE) Y MASAJE
TRANSRECTAL GUIADO POR ULTRASONIDO DE LAS GLÁNDULAS SEXUALES
ACCESORIAS (TUMASG)**

Por:

María Florencia GARMENDIA VALDIVIA

María Valentina SARÁCHAGA CORBO

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

MODALIDAD: Ensayo experimental

MONTEVIDEO URUGUAY

2022

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Federico Cuadro

Segundo miembro (tutor):



Julia Giriboni

Tercer miembro:



Rafael Aragunde Vieytes

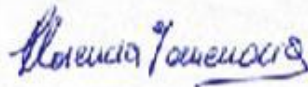
Cuarto miembro (co-tutor):



Rodolfo Ungerfeld

Fecha: 06 de Diciembre del 2022

Autores: Florencia Garmendia y Valentina Saráchaga



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos agradecer a nuestra tutora Julia Giriboni y cotutor Rodolfo Ungerfeld por dejarnos ser parte de este proyecto.

Al personal tanto de campo como de laboratorio de la Unidad de Fisiología, por su disposición a lo largo de todo el trabajo práctico de la tesis.

Al personal de biblioteca por facilitarnos el acceso al material para la bibliografía utilizada, que nos permitió el desarrollo del presente trabajo.

A nuestros amigos y familiares, que nos apoyaron desde el principio de este largo camino.

Por último, agradecer a nuestra Facultad de Veterinaria Udelar, por habernos formado académicamente, y permitirnos hacer la carrera que elegimos.

TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 Anatomía y fisiología del aparato reproductor masculino	9
2.1.1 Testículos	10
2.1.2 Epidídimo	10
2.1.3 Conducto deferente	11
2.1.4 Glándulas sexuales accesorias	11
2.1.5 Pene	12
2.1.6 Prepucio	13
2.2 Espermatogénesis	13
2.3 Semen	13
2.4 Técnicas de colección seminal	14
2.5 Evaluación seminal	17
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1 Localización del ensayo y manejo de los animales	23
5.2 Técnica de EE	23
5.3 Técnica de TUMASG	23
5.4 Evaluación seminal	24
5.5 Variables estudiadas	24
5.6 Análisis estadístico	25
6. RESULTADOS	25
7. DISCUSIÓN	29
8. CONCLUSIÓN	32
9. BIBLIOGRAFÍA	33

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Página

Figura 1: Imágenes de la ultrasonografía de las glándulas sexuales accesorias durante la técnica TUMASG	16
Tabla 1: Escala de motilidad espermática de masa	17
Tabla 2: Resultados de la respuesta a la EE y TUMASG	25
Tabla 3: Resultados del espermiograma	25
Tabla 4: Resultados del CASA	26
Tabla 5: Resultados de las anormalidades morfológicas	27

RESUMEN

Existen diferentes técnicas de colecta de semen, dentro de las cuales el uso de la vagina artificial (VA) y la electroeyaculación (EE) son las utilizadas más frecuentemente. Una de las alternativas a estas técnicas es el masaje transrectal guiado por ultrasonido de las glándulas sexuales accesorias (TUMASG). El objetivo de este trabajo fue comparar la respuesta a los procedimientos EE y TUMASG y la calidad del semen fresco colectado con ambas técnicas. Se utilizaron 12 carneros adultos a los cuales se les colectó semen mediante EE y TUMASG, obteniendo una muestra de cada animal con cada técnica. Durante la colecta se registraron las siguientes variables: tiempo total del procedimiento, cantidad de pulsos eléctricos administrados, voltaje de cada pulso, cantidad de vocalizaciones y se calculó la sumatoria de pulsos*voltaje. Además, se evaluó la calidad del semen fresco, mediante un espermiograma básico que incluyó el estudio de motilidad espermática de masa, porcentaje y totales de espermatozoides móviles y con motilidad progresiva, y los parámetros cinéticos como velocidad curvilínea (VCL), velocidad lineal (VSL), velocidad media de trayectoria (VAP), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), frecuencia de cruce de batidos (BCF), linealidad de progresión (LIN), tambaleo (WOB) y rectitud (STR), utilizando un sistema de análisis de semen computarizado Integrated Semen Analysis System (ISAS), concentración espermática, volumen del eyaculado, porcentaje y totales de espermatozoides con anomalías morfológicas y con membrana funcional. Se calcularon los totales de espermatozoides de cada variable evaluada en el eyaculado. Todos los datos fueron analizados estadísticamente con el programa SAS Institute y comparadas utilizando un procedimiento mixto. El TUMASG requirió más tiempo en lograr la eyaculación ($15,0 \pm 1,0$ min vs $5,4 \pm 1,0$ min, $P = < 0,0001$, TUMASG y EE, respectivamente), pero menos pulsos eléctricos ($5,0 \pm 2,0$ vs $32,6 \pm 2,0$, $P = < 0,0001$) y una menor sumatoria de pulsos*voltaje que la EE ($28,0 \pm 13,4$ vs $168,2 \pm 13,4$, $P = < 0,0001$, TUMASG y EE, respectivamente). El semen colectado con TUMASG tuvo menor número de espermatozoides con morfología anormal ($4706,5 \pm 1145,0$ vs $6249,0 \pm 1152,0$, $P = 0,04$, TUMASG y EE, respectivamente) y menor porcentaje de espermatozoides con morfología anormal ($20,4 \pm 5,0$ vs $25,0 \pm 5,0$, $P = 0,09$, TUMASG y EE, respectivamente) que el semen colectado con EE. Tendió a haber un mayor porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas de pieza media en el semen colectado con la EE ($0,8 \pm 0,5$ %) que con TUMASG ($0,02 \pm 0,5$ %, $P = 0,06$). Por otro lado, tanto la VSL como la VAP fueron mayores en las muestras colectadas mediante TUMASG que mediante la EE (VSL: $40,5 \pm 3,5$ $\mu\text{m/s}$ vs $29,1 \pm 3,4$ $\mu\text{m/s}$, $P = 0,03$; VAP: $44,8 \pm 4,0$ $\mu\text{m/s}$ vs $33,3 \pm 3,7$ $\mu\text{m/s}$, $P = 0,05$, TUMASG y EE, respectivamente). En conclusión, el TUMASG fue eficaz para la colecta de semen en carneros al inicio de la estación reproductiva, se obtuvo semen de buena calidad en comparación con el obtenido con la EE, con un menor impacto negativo sobre el bienestar animal que la EE, ya que se requirió menor cantidad de pulsos eléctricos y una menor sumatoria de pulsos*voltaje, por lo que puede considerarse como alternativa válida a la misma.

SUMMARY

There are different semen collection techniques, among which the use of the artificial vagina (VA) and electroejaculation (EE) are the most frequently used. One of the alternatives to these techniques is transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sexual glands (TUMASG). The objective of this work was to compare the response to the EE and TUMASG procedures and the quality of fresh semen collected with both techniques. 12 adult rams were used, from which semen was collected by EE and TUMASG, obtaining a sample from each animal with each technique. During the collection, the following variables were recorded: total time of the procedure, number of electrical pulses administered, voltage of each pulse, number of vocalizations, and the sum of pulses*voltage was calculated. In addition, the quality of the fresh semen was evaluated, through a basic spermogram that included the study of sperm motility of mass, percentage and total number of motile and progressively motility sperm, and kinetic parameters such as curvilinear velocity (VCL), linear velocity (VSL), mean trajectory velocity (VAP), lateral head shift amplitude (ALH), beat crossing frequency (BCF), linearity of progression (LIN), wobble (WOB), and straightness (STR), using a system semen analysis computerized Integrated Semen Analysis System (ISAS), sperm concentration, ejaculate volume, percentage and total sperm with morphological abnormalities and with functional membrane. Total spermatozoa of each variable evaluated in the ejaculate were calculated. All the data were statistically analyzed with the SAS Institute program and compared using a mixed procedure. The TUMASG required more time to achieve ejaculation (15.0 ± 1.0 min vs 5.4 ± 1.0 min, $P = < 0.0001$, TUMASG and EE, respectively), but fewer electrical pulses (5.0 ± 2.0 vs 32.6 ± 2.0 , $P = < 0.0001$) and a lower sum of pulses*voltage than EE (28.0 ± 13.4 vs 168.2 ± 13.4 , $P = < 0.0001$, TUMASG and EE, respectively). The semen collected with TUMASG had a lower number of spermatozoa with abnormal morphology (4706.5 ± 1145.0 vs 6249.0 ± 1152.0 , $P = 0.04$, TUMASG and EE, respectively) and a lower percentage of spermatozoa with abnormal morphology (20.4 ± 5.0 vs 25.0 ± 5.0 , $P = 0.09$, TUMASG and EE, respectively) than semen collected with EE. There tended to be a higher percentage of sperm with mid-piece morphological abnormalities in semen collected with EE ($0.8 \pm 0.5\%$) than with TUMASG ($0.02 \pm 0.5\%$, $P = 0.06$). On the other hand, both VSL and VAP were higher in the samples collected by TUMASG than by EE (VSL: 40.5 ± 3.5 $\mu\text{m/s}$ vs 29.1 ± 3.4 $\mu\text{m/s}$, $P = 0.03$, VAP: 44.8 ± 4.0 $\mu\text{m/s}$ vs 33.3 ± 3.7 $\mu\text{m/s}$, $P = 0.05$, TUMASG and EE, respectively). In conclusion, the TUMASG was effective for the collection of semen in rams at the beginning of the reproductive season, good quality semen was obtained compared to that obtained with EE, with a lower negative impact on animal welfare than EE, since that fewer electrical pulses and a lower sum of pulses*voltage were required, so it can be considered as a valid alternative to it.

1. INTRODUCCIÓN

La aplicación de técnicas de reproducción asistida en pequeños rumiantes involucra varias metodologías. La colección de semen y una evaluación cuali- cuantitativa del material obtenido son un paso primordial previo a la inseminación artificial (Aisen y Venturino, 2004). La técnica de colección de semen más utilizada en ovinos es la vagina artificial (VA). Aunque el uso de la VA se considera la técnica de colecta seminal más similar al proceso fisiológico, requiere entrenamiento previo de los machos y del técnico para tener éxito (Pérez, Carillo, Vera, Drescher y Denjoy, 2018). Cuando el uso de la VA no es práctico, como en casos de animales no entrenados, con problemas locomotores, edad avanzada o con pérdida temporal de la libido (Ax et al., 2002) y fuera de la época reproductiva, se puede colectar semen mediante electroeyaculación (EE). Sin embargo, la EE produce estrés y dolor (Abril-Sánchez et al., 2017). Además, algunos carneros no responden a la EE o se obtiene semen de baja calidad (Bearden y Fuquay, 1982).

En este trabajo se planteó como técnica alternativa a la EE el uso del masaje transrectal guiado por ultrasonido de las glándulas sexuales accesorias (TUMASG) (Abril-Sánchez et al., 2017). El TUMASG se ha usado previamente con éxito en varias especies como arrués (Santiago-Moreno et al., 2013), muflones y machos cabríos (Ungerfeld et al., 2015). El TUMASG consiste en masajear la ampolla del conducto deferente con la sonda ultrasónica, alternando con masaje manual vigoroso de las glándulas bulbouretrales, presionando contra la sínfisis del pubis. Si el animal no eyacula con TUMASG, se le proporcionan pulsos eléctricos con el electroeyaculador. Las ampollas de los conductos deferentes se monitorean por ultrasonografía para evaluar cuándo está vacía, evitando así estímulos eléctricos innecesarios (Santiago-Moreno et al., 2013). Se ha reportado que el TUMASG produce un menor aumento de cortisol y de creatinquinasa que la EE en chivos (Ungerfeld et al., 2015; Abril-Sánchez et al., 2017). Por lo tanto, el TUMASG puede considerarse como una técnica de colecta de semen alternativa a la EE que produce una menor respuesta de estrés (Abril-Sánchez et al., 2017) y por lo tanto afecta menos el bienestar animal.

Por lo expuesto anteriormente, en este ensayo experimental se propuso desarrollar una alternativa a la EE para minimizar la respuesta del estrés en los animales, sin afectar la calidad del semen.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anatomía y fisiología del aparato reproductor del carnero

El aparato reproductor del macho está compuesto por órganos individuales que actúan de manera conjunta para producir semen y así depositar el mismo en el tracto genital femenino. Dicho proceso requiere del esfuerzo en conjunto tanto del sistema neuroendocrino (hipotálamo e hipófisis) como genital (Cunningham y Klein, 2009).

Los órganos genitales comprenden dos testículos, cada uno suspendido dentro del escroto por un cordón espermático y el músculo cremáster externo, dos epidídimos, dos conductos deferentes, glándulas sexuales accesorias, el pene y prepucio (Cunningham y Klein, 2009). Los testículos están bajo el control del hipotálamo y de la hipófisis, los que actúan en estrecha colaboración para regular la reproducción del macho, igual que la de la hembra (Von Engelhardt, 2005). Las glándulas accesorias en el carnero incluyen un par de ampollas de los conductos deferentes, dos vesículas seminales (también llamadas glándulas vesiculares), próstata y dos glándulas bulbouretrales (también llamadas glándulas de Cowper) (Cunningham y Klein, 2009).

El hipotálamo actúa como centro de integración nerviosa, transmitiendo señales endocrinas y secretando hormonas que ejercen acción estimulante o inhibitoria sobre la hipófisis. La hormona liberadora de gonadotrofina (GnRH) es sintetizada y secretada por el hipotálamo y estimula la síntesis y secreción de las gonadotrofinas hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH). Las gonadotrofinas regulan la función testicular: la LH estimula la síntesis y secreción de andrógenos a partir de las células de Leydig mientras que la FSH se une a las células de Sertoli siendo esencial para el inicio y mantenimiento de la espermatogénesis (Von Engelhardt, 2005).

Una de las características más destacadas de la reproducción del ovino es su estacionalidad reproductiva (Forcada Miranda, Abecia Martínez, Casao Gascón y Vázquez, 2009). Los cambios estacionales se regulan mediante oscilaciones en la síntesis y secreción de GnRH en el hipotálamo (Von Engelhardt, 2005) que son sincronizadas principalmente por el fotoperiodo (Delgadillo, 2020). La incidencia de la luz inhibe la secreción de melatonina mientras que la oscuridad la estimula, siguiendo un ritmo circadiano (Von Engelhardt, 2005). En ovinos y caprinos, la sensibilidad a la retroalimentación negativa al estradiol y la testosterona aumenta durante los días largos (con mayor cantidad de horas de oscuridad), disminuyendo la secreción de GnRH y LH e induce en el macho el reposo sexual. En cambio, durante los días cortos la secreción de GnRH y LH aumenta e induce los periodos de actividad sexual (Delgadillo, 2020). Las concentraciones plasmáticas de LH y testosterona, el despliegue del comportamiento sexual y la libido, la calidad espermática cuantitativa (número total de espermatozoides por eyaculado) y cualitativa (motilidad progresiva) son más elevados en la estación reproductiva que en el periodo de reposo (Delgadillo, 2020). Además, en carneros y chivos durante la estación reproductiva se incrementa el diámetro de los

túbulos seminíferos y del epidídimo, el número de espermatogonias en los túbulos seminíferos, y aumenta el peso, tamaño y actividad de las glándulas sexuales accesorias (Ungerfeld, 2015).

2.1.1 Testículos

En el carnero los testículos se ubican en la región inguinal, están unidos al cuerpo por el cordón espermático, que incluye vasos sanguíneos, nervios y conductos deferentes (Boukhliq, El Allali y Tibary, 2018). Los testículos de los rumiantes son elipsoides, alargados y grandes, y penden casi verticalmente dentro del escroto, donde se los puede palpar, siendo libremente móviles (Dyce, Sack, y Weinsing, 1991). El testículo es el órgano par central del aparato reproductor masculino, 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). Dentro de los testículos se encuentran los túbulos seminíferos, que es el lugar donde ocurre la espermatogénesis. Los túbulos seminíferos están compuestos por dos tipos de células, las células de Sertoli y las espermatogénicas (Boukhliq, El Allali y Tibary, 2018). Estos túbulos se unen en la rete testis y se conecta a los conductos eferentes que convergen en la cabeza del epidídimo (Boukhliq, El Allali y Tibary, 2018). Para que la espermatogénesis transcurra con normalidad es necesario que la temperatura testicular sea inferior a la corporal. La termorregulación testicular depende básicamente de dos mecanismos. Por un lado, el escroto cuenta con receptores térmicos y abundantes glándulas sudoríparas, el músculo cremáster y el dartos, siendo éstos capaces de acercar o alejar el testículo contra la pared abdominal (Fernández Abella, 1997), facilitando la pérdida de calor (Dyce, Sack y Wensing, 1991). El otro mecanismo está dado por arterias y venas testiculares que forman el plexo pampiniforme (Fernández Abella, 1993), que conforman un sistema de enfriamiento de flujo de sangre a contracorriente. De esta manera, la sangre arterial que entra al testículo se enfría por medio del contacto estrecho con la sangre venosa que abandona el mismo (Cavestany, 1995).

2.1.2 Epidídimo

El epidídimo es un órgano alargado y contorneado, adherido al borde posterior de cada testículo (Fernández Abella, 1993) y se divide macroscópicamente en tres segmentos: cabeza, cuerpo y cola (Mahmud et al., 2015). El epidídimo cumple varias funciones como son el transporte de los espermatozoides y su maduración, a la vez que constituye una reserva de espermatozoides (Fernández Abella, 1993). Los espermatozoides son inmaduros cuando salen de los testículos y deben pasar por un período de maduración (generalmente de 10 a 15 días) dentro del epidídimo antes de que sean capaces de fertilizar el óvulo (Frandsen, Lee Wilke y Dee Fails, 2003). El proceso de maduración espermática se realiza preferentemente en la cabeza o el

cuerpo del epidídimo (Von Engelhardt, 2005). Una vez madurados los espermatozoides, continúan hacia el conducto deferente y ampolla (Gil, 2020).

2.1.3 Conducto deferente

El conducto deferente es un tubo muscular que se extiende desde la cola del epidídimo hasta la parte pelviana de la uretra (Pérez, 2020), sufre contracciones peristálticas durante la eyaculación, impulsando a los espermatozoides desde el epidídimo a la uretra (Frandsen et al., 2003).

2.1.4 Glándulas sexuales accesorias

Las glándulas sexuales accesorias aportan la mayor parte del volumen del eyaculado (Frandsen et al., 2003), otorgan fluidez para el desplazamiento de los espermatozoides, así como elementos esenciales para su motilidad (Durán del Campo, 1994). En los carneros, las glándulas sexuales accesorias incluyen ampollas del conducto deferente, glándulas vesiculares, próstata y glándulas bulbouretrales (Frandsen et al., 2003).

❖ Ampollas de los conductos deferentes

Las ampollas son dilataciones de las partes terminales del conducto deferente y vierten su contenido en el mismo, aportando volumen al semen (Frandsen et al., 2003). Además, son órganos de reserva adicional de espermatozoides (Cunningham y Klein, 2009).

❖ Glándulas Vesiculares

Las glándulas vesiculares se sitúan en posición lateral a la ampolla, en cercanía al cuello de la vejiga urinaria. Estas glándulas son firmes, lobuladas y con una luz estrecha (Gofur, 2015). Su conducto se une al conducto deferente y se forma el conducto eyaculador (Khalaf y Merhis, 2010). Las glándulas vesiculares secretan fluido compuesto por proteínas, sales de potasio, ácido cítrico y fructosa (Fernández Abella, 1993) y componentes como carbonato y fosfato que actúan evitando los cambios en el pH del semen, que perjudican a los espermatozoides (Bearden y Fuquay, 1982).

❖ Próstata

La próstata en el carnero es un órgano impar diseminado, íntimamente asociada a la uretra pélvica. Presenta dos conductos que se abren en dos filas paralelas, una a cada lado de la luz de la uretra pélvica. La próstata produce una sustancia alcalina que le da al semen su olor característico (Frandsen et al., 2003). Las secreciones de la próstata son ricas en iones inorgánicos, como sodio, cloro,

calcio y magnesio, siendo su contribución en el eyaculado muy pequeña (Bearden y Fuquay, 1982).

❖ **Glándulas Bulbouretrales**

Las glándulas bulbouretrales son un órgano par, pequeñas, redondeadas u ovoides (Cunningham y Klein, 2009), localizadas a ambos lados de la uretra pélvica, craneales al arco isquiático pero caudales a las otras glándulas accesorias (Khalaf y Merhis, 2010). Las glándulas bulbouretrales producen un líquido viscoso claro de pH alcalino que permite modificar la acidez de la uretra, haciéndolo favorable para la supervivencia de los espermatozoides (Chughtai et al., 2005).

2.1.5 Pene

El pene es el órgano copulador del macho. En ovinos el pene es de tipo fibroelástico, tiene su origen desde el arco isquiático y se extiende a través de la pared abdominal ventral hasta la zona próxima al ombligo y presenta la flexura sigmoidea (Cunningham y Klein, 2009). Se divide en tres áreas generales: glande, o extremidad libre; porción principal, o cuerpo; dos pilares, o raíz; que se unen al arco isquiático de la pelvis. La mayor parte de la estructura interna del cuerpo del pene se compone de columnas de tejido eréctil, llamados cuerpos cavernosos, los cuales están repletos de vasos sanguíneos sinusoides divididos por láminas de tejido conjuntivo llamadas trabéculas. En especies con pene fibroelástico (ruminantes y cerdos), las trabéculas forman la mayor parte del pene y como consecuencia el pene es firme aún cuando no está erecto. El surco de la línea media ventral entre los cuerpos cavernosos contiene la uretra peneana y un cuerpo asociado de tejido eréctil, cuerpo esponjoso. En el carnero el glande presenta forma de casco (Frandsen et al., 2003) y la uretra se continúa unos centímetros más allá del glande por el proceso uretral, comúnmente llamado “apéndice vermiforme” (Frandsen et al., 2003).

La erección es un fenómeno psicosomático que implica la acción simultánea de los sistemas vasculares, neurológicos y endocrinos. La contracción del músculo isquiocavernoso durante la misma produce la oclusión del retorno venoso, mientras que la relajación de los cuerpos cavernosos y esponjosos mediada por el sistema parasimpático provoca que los espacios cavernosos se llenen de sangre y el pene aumente su tamaño y turgencia (Cunningham y Klein, 2009). Por el tipo de pene fibroelástico, en esta especie el efecto principal de la erección del pene consiste en alargar el pene al enderezar la flexión sigmoidea (Frandsen et al., 2003)

La eyaculación es la expulsión energética del semen de la uretra producida por un reflejo parasimpático sacro que induce contracciones rítmicas de los músculos bulboesponjoso, isquiocavernoso y uretral (Cunningham y Klein, 2009). Luego de la

eyaculación, el aumento del tono del músculo liso de los cuerpos cavernosos mediados por un reflejo sacro simpático incrementa la salida de sangre, y la contracción del músculo retractor del pene retrae el pene hasta el prepucio (Cunningham y Klein, 2009).

2.1.6 Prepucio

El prepucio es un pliegue de piel invaginado que rodea la extremidad libre del pene. Contiene una membrana mucosa interna que recubre el prepucio y una capa peneana que cubre la extremidad libre de la superficie del pene (Frandsen et al., 2003).

2.2 Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso de formación de los espermatozoides, en el que las células madre diploides de la base de los túbulos seminíferos (espermatogonias) a través de sucesivas mitosis y un proceso de reducción cromosómica, la meiosis, da lugar a una célula haploide llamada espermátida (Cunningham y Klein, 2009). Las espermátidas se someten a una serie de cambios funcionales y estructurales para convertirse en espermatozoides, proceso que se denomina espermiogénesis.

Las espermátidas son células redondas e inmóviles, mientras que los espermatozoides formados son potencialmente móviles y poseen una cabeza y una cola. La cabeza del espermatozoide contiene el núcleo, principalmente el material genético condensado (ADN) y un acrosoma, un saco membranoso que se encuentra debajo de la membrana plasmática en el extremo de la cabeza y se extiende hacia abajo sobre el núcleo. La cola del espermatozoide tiene un núcleo central de microtúbulos y filamentos que proporcionan motilidad. La parte central de la cola del espermatozoide contiene mitocondrias que proporcionan energía para la motilidad de los espermatozoides (Frandsen et al., 2003).

El proceso de espermatogénesis dura 60 a 70 días en el carnero y el toro (Romano y Brinsko, 2020), lo que incluye aproximadamente 14 días para la maduración de los espermatozoides en el epidídimo (Lozada, 2016). En los carneros, la producción diaria de espermatozoides se ha estimado en $4,4 \times 10^9$. Además, existe una relación entre la producción diaria y el tamaño testicular para varias especies (Frandsen et al., 2003).

2.3 Semen

El semen es la suspensión celular líquida que contiene gametos masculinos (espermatozoides) y las secreciones de las glándulas sexuales accesorias del aparato reproductor masculino. La porción líquida del semen, que se forma durante la eyaculación, se conoce como plasma seminal (Garner y Hafez, 2002). En el semen del carnero la relación plasma seminal/espermatozoides es de 75/25 (Fernández Abella, 1987). El plasma seminal contiene una variedad de sustancias que incluyen fructosa

(sustrato energético), electrolitos, ácido cítrico, sorbitol (Frandsen et al., 2003), iones (sodio, potasio, calcio y magnesio), bicarbonato, ácido ascórbico, prostaglandinas, proteínas, péptidos y aminoácidos (Thomson y Marker, 2006). Estos componentes ayudan a amortiguar el medio en el que se encuentran los espermatozoides y contribuyen a mantener su metabolismo y la osmolaridad. Sin embargo, el principal componente del plasma seminal son las proteínas y son el componente que se considera el modulador dominante de la función espermática (Leahy de Graaf, 2012). Las proteínas se clasifican en tres familias: proteínas secretoras ricas en cisteína, las espermadhesinas y por último las proteínas que contienen fibronectina tipo 2 que se unen al espermatozoide durante el eyaculado, beneficiando su función y fomentando la posterior capacitación (Rodríguez-Martínez, Kvist, Ernerudh, Sanz y Calvete, 2011).

Algunas características del semen son consideradas para la evaluación de la calidad y parecen tener relación con la fertilidad, como la concentración de los espermatozoides, la motilidad y la morfología (Frandsen et al., 2003).

2.4 Técnicas de colección seminal

La calidad del semen que se utiliza en el momento de la inseminación artificial depende tanto de la técnica y época de colección como del estado general de los reproductores. La técnica recomendada para la colección de semen es la vagina artificial (VA), ya que es una técnica práctica que permite obtener eyaculados con alta motilidad y concentración espermática (Cueto, Gibbons, Bruno-Galarraga y Fernández, 2016).

La VA es una imitación de la vagina de la oveja que proporciona los estímulos térmicos (temperatura) y mecánicos (presión) adecuados para la erección del pene y la eyaculación. La VA consta, normalmente, de un cilindro rígido de 12 a 15 cm de largo y alrededor de 5 cm de diámetro con un orificio provisto de un tapón de rosca (Cueto et al., 2016). En uno de los extremos del tubo rígido se introduce la copa colectora de semen, la cual debe estar previamente atemperada para evitar el cambio brusco de temperatura (Durán del Campo, 1994). En el centro del dispositivo se introduce agua caliente a 45-50 °C y aire para simular las condiciones de temperatura y presión adecuadas. Entre el tubo de la vagina y el agua caliente, debe existir un tubo de látex que sirve como funda para la vagina. Para la colecta de semen mediante VA se utiliza una hembra (generalmente en celo) para estimular la libido y la monta por parte de los machos. El operador, situado al lado derecho de la hembra, coloca la vagina artificial en dicho flanco y la sujeta con la mano derecha, de tal forma que el extremo abierto quede dirigido hacia el macho. La válvula de la vagina debe dirigirse hacia abajo con una inclinación de aproximadamente 45°. En el momento del salto, se dirige con la mano izquierda el pene hacia el interior de la vagina artificial, procurando hacerlo siempre del prepucio para evitar la retracción del mismo. Cuando el pene entra en contacto con la

superficie caliente de la VA, el macho realiza el característico “golpe de riñón” y eyacula dentro del tubo colector (Cueto et al., 2016).

Otra de las técnicas utilizadas para la colecta de semen es la EE. El equipo utilizado consta de un electrodo y una fuente variable de corriente alterna. El electrodo se introduce en el recto, por encima de las glándulas sexuales accesorias (Bearden y Fuquay, 1982). Durante la EE los pulsos eléctricos estimulan las ramas del plexo hipogástrico, que rodean la vesícula seminal, la próstata y el conducto deferente e inducen la emisión de semen desde la cola del epidídimo hacia la uretra prostática. La EE también da como resultado la estimulación del nervio pudendo, el cual inerva la región proximal de la uretra, induciendo contracciones de los músculos uretrales y posterior eyaculación. El uso de la EE es un método práctico, efectivo y fácil, ya que no se necesita el entrenamiento de los animales y puede usarse todo el año (Abril-Sánchez, Freitas-de-Melo, Giriboni, Santiago-Moreno y Ungerfeld, 2019). En cuanto a la calidad del semen obtenido, en carneros se encontró mayor cantidad de espermatozoides con la membrana plasmática intacta y mitocondrias funcionales, mayor proporción de plasma seminal, que aquellos espermatozoides eyaculados obtenidos con VA (Ledesma, Manes, Cesari, Alberio y Hozbor, 2014). Sin embargo, la EE tiene efectos negativos sobre el bienestar animal; induce aumentos en la concentración de cortisol sérico, temperatura rectal, pulso arterial, frecuencia respiratoria y cardíaca, así como modificaciones en variables hematológicas y bioquímicas indicativas de la respuesta al estrés (Damian y Ungerfeld, 2011). Por lo tanto, es necesario buscar alternativas que minimicen los efectos negativos de la EE. El uso de fármacos anestésicos y sedantes logra disminuir el estrés y dolor ocasionado por la técnica. Sin embargo, el uso de anestesia general en rumiantes puede ocasionar timpanismo y regurgitación e incluso puede provocar la muerte en el animal (Carroll y Hartsfield, 1996).

Como una técnica alternativa a la EE, se utiliza TUMASG. El mismo afecta en menor medida al bienestar animal que la EE y fue adecuado para colectar semen de buena calidad con buena crio-resistencia, en época reproductiva en machos cabríos (Guerrero-Gutierrez et al., 2021).

El TUMASG consiste en masajear la ampolla del conducto deferente con la sonda ultrasónica, alternando con pulsos eléctricos de bajo voltaje (Abril-Sánchez et al., 2019), al igual que el masaje con sonda de la glándula bulbouretral, presionando contra la sínfisis del pubis. Simultáneamente, se puede masajear la parte peneana, perineal y pélvica para facilitar el transporte del semen. (Santiago Moreno et al., 2013). La colocación de la sonda en la zona de las glándulas accesorias también puede estimular los nervios adrenérgicos, produciendo una eyaculación similar a la que ocurre con el uso de la EE, pero con estímulos más moderados (Abril-Sánchez et al., 2019). La ampolla del conducto deferente se observa por ultrasonografía para indicar cuando está vacía, así se evitan los estímulos eléctricos innecesarios. El contenido de la ampolla del

conducto deferente se observa anecoico y de un aspecto tubular antes de la TUMASG, pero después de la eyaculación se vuelve más ecogénico, de menor tamaño y con forma de serpentina (Santiago-Moreno et al., 2013) (Figura 1).

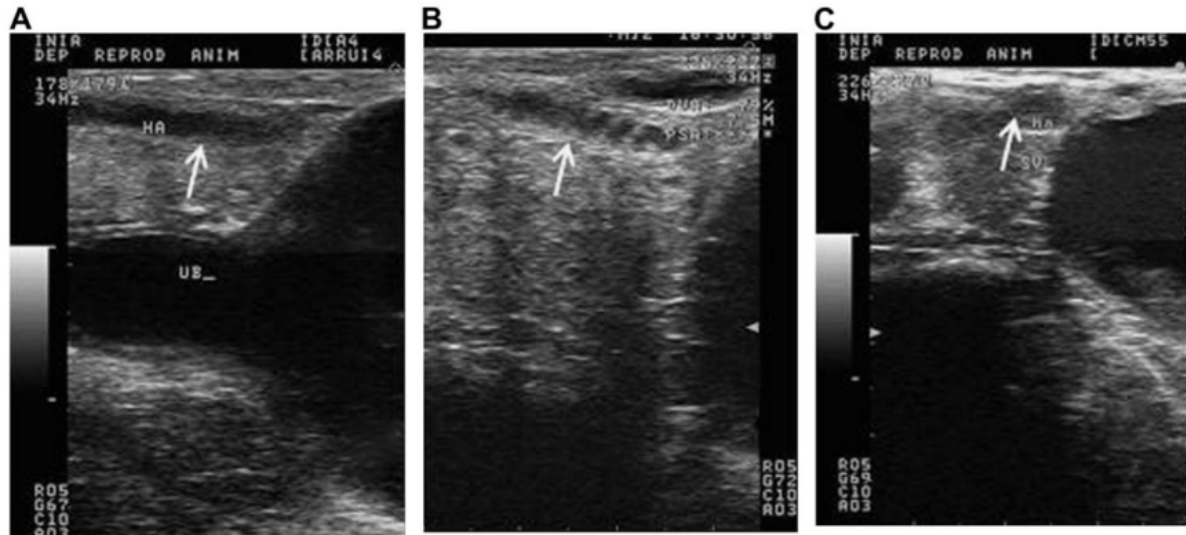


Figura 1. Imágenes de la ultrasonografía de las glándulas sexuales accesorias durante la técnica TUMASG. Se observa una sección longitudinal de la ampolla del conducto deferente (flecha blanca), que se encuentra dorsalmente al cuello de la vejiga (UB) y la uretra pélvica; (A) antes de la eyaculación, (B) durante el masaje transrectal guiado por ultrasonido de las glándulas sexuales accesorias y la estimulación eléctrica, y (C) después de la eyaculación. Imágenes captadas por Santiago-Moreno et al. (2013).

La intensidad con la que los diferentes procedimientos de colección de semen estimulan la perfusión sanguínea de las glándulas sexuales accesorias podría influir en la calidad del semen, pudiendo verse modificado tanto en cantidad, composición y calidad del mismo, ya que la composición del plasma seminal tiene un papel trascendente en muchas funciones espermáticas (Guerrero-Gutiérrez et al., 2021). En lo que refiere a calidad del semen colectado mediante TUMASG, en diferentes especies, los espermatozoides difieren de los aquellos colectados con la EE. Por ejemplo, con la EE en muflones (*Ovis musimon*) y en íbices (*Capra pyrenaica*) anestesiados se obtuvo semen con mayor porcentaje de espermatozoides motiles que cuando se colectó con TUMASG (Ungerfeld et al., 2015). Esto probablemente se debe a que con la EE hay mayor estimulación sobre las glándulas sexuales accesorias para la colecta de semen (Ungerfeld et al., 2015). Sin embargo, en machos cabríos no anestesiados, los resultados de calidad del semen son similares con ambas técnicas (Abril-Sánchez et al., 2017). Por otra parte, el semen colectado en toros no anestesiados con masaje transrectal de la región ampular tiene menor número de espermatozoides motiles que el colectado con la EE (Palmer, Brito, Arteaga, Soderquist, Persson y Barth, 2005). Estas diferencias pueden estar explicadas por la

sensibilidad inter-especie a la estimulación mecánica, pero también por los diferentes efectos de la anestesia entre especies (Abril-Sánchez et al., 2019).

Por último, para lograr la eyaculación con TUMASG en muflones e íbices, generalmente se requieren pocos pulsos eléctricos, o incluso ninguno, siendo esperable una respuesta de estrés menor y probablemente menos dolorosa que la respuesta a la EE (Ungerfeld et al., 2015). Por lo tanto, el TUMASG surge como un método de colecta de semen alternativo a la EE, que puede ser útil para reducir los efectos negativos de esta práctica sobre el bienestar animal y que a la vez permite colectar semen de buena calidad.

2.5 Evaluación seminal

Para determinar la calidad del semen es necesario realizar una valoración seminal (Fernández Abella, 1987). Ninguna prueba por sí sola puede predecir con exactitud la fertilidad de una muestra de espermatozoides (Ax et al., 2002). La evaluación de la calidad de una muestra de semen se realiza a través de un espermiograma, que incluye valoraciones macroscópicas y microscópicas.

Macroscópicas:

- ❖ Volumen: puede ser evaluado en la copa de colección, tubo graduado o usando micropipetas automáticas. Se espera como resultado normal entre 0,8 a 1,2 mL (Durán del Campo, 1994). La edad y estado del carnero, la estación, la habilidad del operador y la frecuencia de obtención de las muestras influyen en el volumen del eyaculado (Ax et al., 2002).
- ❖ Color: el semen del carnero y del chivo es normalmente blanco-cremoso dependiendo de la concentración de espermatozoides. Si el color del semen es muy claro, translúcido, se debe a que hay una alta proporción de plasma seminal (Fernández Abella, 1987). En caso de infecciones o lesiones internas del pene o prepucio puede aparecer un color rojizo (Durán del Campo, 1994), debiendo descartar éste eyaculado (Aisen y Venturino, 2004).
- ❖ Olor: el semen debe ser inodoro excepto cuando hay algún foco infeccioso (Durán del Campo, 1994). La presencia de orina es frecuente cuando se obtiene semen por EE y le confiere un olor característico. (Aisen y Venturino, 2004).
- ❖ Pureza: se refiere a la ausencia de impurezas (microorganismos, células epiteliales, polvo) que pueden encontrarse en el semen; tanto un ambiente higiénico, instrumental limpio y carneros sanos se puede lograr la obtención de semen en buen estado de pureza (Durán del campo, 1994).

Microscópicas:

- ❖ **Motilidad espermática de masa:** los espermatozoides en movimiento vigoroso se desplazan creando ondas que pueden ser visibles a corta distancia, en forma rápida. En el examen microscópico, la motilidad espermática de masa se visualiza en un microscopio con una gota de la muestra en un portaobjeto, con platina a 35 a 37 °C, donde se puede observar el vigor de las ondas y se le adjudica un valor en una escala de 0-5 (Fernández Abella, 1987). Sobre todo en carneros, la motilidad espermática de masa se puede observar el tubo colector con el eyaculado, tratando de determinar en forma subjetiva el movimiento de las ondas (Aisen y Venturino, 2004).

La Tabla 1 muestra la escala de valoración de la motilidad espermática de masa (Aisen y Venturino, 2004).

Tabla 1. Escala de motilidad espermática de masa según Aisen y Venturino (2004).

VALORES	CLASE	DESCRIPCIÓN
5	Muy buena	Ondas densas de movimientos muy rápidas
4	Buena	Ondas y remolinos vigorosos pero no tan rápidas
3	Regular	Ondas de movimiento lento
2	Pobre	No aparecen ondas pero se ven movimientos espermáticos
1	Muy pobre	Muy pocos movimientos
0	Muertos	Sin movimientos

- ❖ **Motilidad individual:** o movilidad al desplazamiento del espermatozoide que puede ser: 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. El movimiento progresivo es el que determina que el espermatozoide avance y pueda fecundar, (Fernández Abella, 1987). La motilidad individual puede ser evaluada adecuadamente en un microscopio a X400 aumentos, es recomendable utilizar una platina térmica. Se utiliza una gota de semen diluido (5 µL) bajo cubreobjeto, (Gil, 2006). Actualmente existen equipos que permiten evaluar automatizadamente la motilidad espermática, analizando imágenes tomadas con una cámara sobre el microscopio con un software adecuado (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA), (Tsakmakidis, 2010).

- ❖ **Concentración espermática:** es la cantidad de espermatozoides por unidad de volumen, generalmente espermatozoides/mL. En carneros y chivos los valores oscilan entre 3000-7000 millones por mL. La concentración se puede determinar de forma subjetiva (a través de la apariencia y color del eyaculado) o en forma objetiva, por medio de cámaras de recuento (Cámara de Neubauer) o fotocolorímetros (Aisen y Venturino, 2004). La cámara de Neubauer o Thoma nos permite cuantificar los espermatozoides dentro de una cámara. Para ello, el semen se debe diluir previamente para facilitar el conteo (1:100 o 1:200). Se cuentan entre 20 a 100 cuadrados y luego se realiza un promedio (Fernández Abella, 2015). El fotocolorímetro se basa en que el pasaje de la luz a través de una muestra de semen es inversamente proporcional a su concentración (Fernández Abella, 2015).
- ❖ **pH:** puede ser medido usando como reactivo papeles especiales que cambian de color según la acidez del medio, siendo muy sencillo y practicable en el medio rural. El pH normal en el carnero es 6.8, aunque puede disminuir en caso de gran concentración, o virar hacia la alcalinidad en muestras poco concentradas (Durán del Campo, 1994).
- ❖ **Morfología:** el examen morfológico es una prueba de control de calidad. Cada eyaculado presenta un porcentaje de espermatozoides anormales, que depende de su proporción, si es muy alta el semen presenta baja fertilidad (Aisen y Venturino, 2004). El semen que contiene más del 15 % de espermatozoides anormales no debe utilizarse para inseminación artificial (Ax et al., 2002). El estudio morfológico se puede realizar con una gota de semen fijado (por ejemplo, en formol) sobre un portaobjeto o en un frotis de semen (Fernández Abella, 1987). La cantidad de técnicas y colorantes descritas es variada (Durán del Campo, 1994). Para observar la morfología, se puede utilizar la microscopía de contraste de fase en muestras fijadas (dos gotas de fijador más una gota de semen diluido) o la microscopía de campo claro en muestras teñidas (Aisen y Venturino, 2004).

Existen varios sistemas de clasificación para las anormalidades. Las anormalidades espermáticas pueden ser primarias (se originan durante la espermatogénesis), secundarias (durante el paso por el epidídimo) o terciarias (luego de la eyaculación o manejo) (Aisen y Venturino, 2004). Otro de los sistemas de clasificación son los defectos espermáticos mayores (asociadas con la infertilidad) y menores (considerados de menor importancia para la fertilidad) (Chenoweth, 2005). También se pueden clasificar en defectos compensables y no compensables. Los compensables son aquellos donde los espermatozoides tienen la incapacidad para alcanzar el sitio de fertilización, lo que se resolvería con un aumento teórico en el número de espermatozoides funcionalmente competentes. Los defectos no compensables son aquellos que conducen a una

fertilización fallida, por lo que un aumento en el número de espermatozoides por sí solo no mejorará la fertilidad (Chenoweth, 2005). Por último, las anomalías morfológicas se pueden clasificar según su ubicación, en anomalías de cabeza, pieza media o cola.

- ❖ Funcionalidad de la membrana plasmática: se evalúa a través de la prueba HOS (o test HOS, HOST). Su génesis se basa en observar las alteraciones morfológicas de los espermatozoides expuestos a condiciones hipoosmóticas. Durante la prueba los espermatozoides bioquímicamente activos, cuando se exponen a estrés hipoosmótico debido a la entrada de agua, se hinchan y posteriormente aumentan su volumen para establecer un equilibrio entre el compartimiento de líquido dentro del espermatozoide y el ambiente extracelular. El aumento de volumen de los espermatozoides se asoció con la expansión esférica de la membrana celular que cubre la cola, lo que obliga al flagelo a enrollarse dentro de la membrana. Este efecto se puede observar en microscopio de contraste de fase (Correa y Zavos 1994).
- ❖ Evaluaciones bioquímicas: son métodos complementarios a las observaciones microscópicas. En general son test de laboratorio. Entre las más utilizadas se encuentran el coeficiente respiratorio (es la capacidad respiratoria/consumo de oxígeno que determina el metabolismo espermático), el índice de fructolisis (refiere a la velocidad y el modo de degradación de la fructosa por el metabolismo espermático y representa un buen índice de vitalidad) (Aisen y Venturino, 2004), el test de deshidrogenación o del azul de metileno (que se basa en la actividad catalizadora de ciertas deshidrogenasas que provocan liberación de hidrógeno) (Durán del Campo, 1994).

Teniendo en cuenta la información existente hasta el momento sobre las técnicas de colecta de semen, es de interés la investigación de técnicas que minimicen los efectos negativos sobre el bienestar animal, sin afectar la calidad del semen. La facilidad de responder a la técnica TUMASG, así como la calidad del semen colectado es específica de cada especie. En esta Tesis se aborda el estudio del TUMASG como técnica fiable para colectar semen, que afecte menos el bienestar animal y que permita la obtención de muestras de semen de buena calidad en ovinos.

3. HIPÓTESIS

La calidad del semen colectado con TUMASG es similar al colectado con la EE. Además, requiere menos estímulos eléctricos, por lo que mejora el bienestar animal durante la colecta de semen.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar la respuesta a los procedimientos electroeyaculación y masaje transrectal guiado por ultrasonido de las glándulas sexuales accesorias y calidad del semen fresco colectado mediante ambas técnicas en ovinos.

Objetivos específicos

- Comparar la cantidad de pulsos eléctricos, voltajes empleados, la sumatoria de pulsos*voltaje, la cantidad de vocalizaciones emitidas y el tiempo total de los procedimientos durante la colecta de semen mediante electroeyaculación y masaje transrectal guiado por ultrasonido de las glándulas sexuales accesorias.
- Comparar la motilidad espermática de masa, el porcentaje de espermatozoides motiles, con motilidad progresiva y estáticos, los parámetros cinéticos, la concentración espermática, el porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas e integridad funcional de la membrana plasmática, así como los totales de cada categoría en muestras de semen colectadas mediante electroeyaculación y masaje transrectal guiado por ultrasonido de las glándulas sexuales accesorias en ovinos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización del ensayo y manejo de los animales

El experimento se realizó en la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, a mediados de diciembre (inicio de la estación reproductiva) utilizando un diseño overcross. Se colectó semen de 12 carneros adultos Corriedale mediante EE y TUMASG en dos momentos separados, a lo largo de tres días. A cada carnero se le colectó semen con una de las dos técnicas, y dos o tres días después se colectó semen con la otra técnica. Por lo tanto, se colectó semen de todos los carneros con ambos métodos y cada animal fue su propio control. Durante la colecta de semen se registraron las siguientes variables: tiempo total del procedimiento, cantidad de pulsos eléctricos administrados, voltaje de cada pulso y cantidad de vocalizaciones emitidas. El experimento fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Veterinaria, número de protocolo: 35, número de expediente: 111900-000409-20.

5.2 Técnica de EE

Se utilizó un electroeyaculador en forma manual equipado con una sonda, con dos electrodos longitudinales (ePORVAC, modelo e325, Argentina). Se retiró la materia fecal del recto de cada animal y se lavó el prepucio con solución fisiológica para evitar que se contaminara la muestra de semen. Se utilizó carboximetilcelulosa en la sonda del electro, para mejorar la conductividad eléctrica y como lubricante. Los animales se posicionaron en decúbito lateral en un cepo para pequeños rumiantes. Se aplicó voltaje creciente para comenzar con una serie de 5 pulsos eléctricos de 3 V, aumentando 1 V en cada serie de 5 pulsos. El máximo de pulsos aplicados en un solo animal fueron de 30 pulsos eléctricos de 7 V, se consideró por finalizado el proceso cuando los animales lograron la eyaculación.

5.3 Técnica de TUMASG

Para realizar el TUMASG los animales se posicionaron en decúbito lateral en un cepo para pequeños rumiantes. Luego de limpiar el área alrededor del pene, se procedió a la exteriorización del mismo, se sujetó con una gasa caudal al glande. Previamente a la introducción del vástago se retiró la materia fecal, se utilizó una sonda lineal asociada al vástago. Se monitorean las glándulas bulbouretrales, las vesículas seminales y las ampollas del conducto deferente. Antes de iniciar la técnica el contenido apareció anecoico y de forma tubular y posterior a la eyaculación se volvió ecogénico, más pequeño en tamaño y de forma de serpentina. Con la sonda ecográfica se masajeó vigorosamente la ampolla del conducto deferente, con un movimiento hacia adelante y hacia atrás para estimular la expulsión de los espermatozoides. Este masaje se realizó

durante algunos minutos, dependiendo de la monitorización ecográfica de las glándulas y alterando con pulsos eléctricos si era necesario, se aplicaban de 3 a 7 voltios de 5 pulsos cada uno, seguido con el masaje con la sonda ecográfica nuevamente hasta la eyaculación. Para la realización de la técnica se estipuló un máximo de 15 minutos, todos los animales lograron eyacular.

5.4 Evaluación seminal

Con ambas técnicas (EE y TUMASG), las muestras se colectaron en copas de vidrio previamente atemperadas a 37 °C. Inmediatamente con la muestra en el laboratorio se evaluó la motilidad espermática de masa en microscopio con contraste de fases, a 10X, utilizando una escala de 0-5 (Aisen y Venturino, 2004). A continuación se diluyó 10 µL de semen en 1 mL de un diluyente comercial para evaluar la motilidad espermática, utilizando un software Integrated Semen Analysis System (ISAS) y se determinó el porcentaje y se calcularon las cantidades totales de espermatozoides motiles, con motilidad progresiva y estáticos, la velocidad curvilínea (VCL), velocidad lineal (VSL), velocidad media de trayectoria (VAP), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), frecuencia de cruce de batidos (BCF), índice de linealidad de progresión (LIN), índice de tambaleo (WOB) e índice de rectitud (STR).

Luego, se determinó la concentración espermática mediante un espectrofotómetro y el volumen del eyaculado mediante pipetas, se retiró el volumen total de la copa con la pipeta y se colocó el semen en un falcon limpio. Se fijó una alícuota de 10 µL de semen diluido en formol citrato en tubo falcon para determinar posteriormente el porcentaje y totales de espermatozoides con anomalías morfológicas. Las anomalías morfológicas se determinaron mediante evaluación subjetiva y se clasificaron en anomalías de la cabeza, pieza media o cola. Por otro lado, se incubó una alícuota de 10 µL de semen en un medio hipoosmótico (HOST) durante 15 minutos y luego se fijó una alícuota de 10 µL de esta solución en formol citrato para la determinación posterior del porcentaje y totales de espermatozoides con integridad funcional de la membrana plasmática. Esto genera cambios morfológicos característicos, como dilatación y enrollamiento de la cola, en aquellos espermatozoides con la membrana plasmática viable.

5.5 Variables estudiadas

Se evaluaron las siguientes variables: tiempo total del procedimiento (min), cantidad de pulsos eléctricos administrados, voltaje de cada pulso (voltios), cantidad de vocalizaciones y se calculó la sumatoria de pulsos*voltaje (se multiplicó cada voltaje por la cantidad de pulsos administrados en cada voltaje y los valores se sumaron).

5.6 Análisis estadístico

Todos los datos se compararon mediante un procedimiento mixto (mixed proc, SAS University Edition). Se consideró como efecto fijo la técnica de colecta y como efecto aleatorio el animal y el día de colecta. Se consideraron como diferencias significativas aquellas con $P \leq 0,05$ y como tendencias cuando $0,05 < P \leq 0,1$. Los datos se presentan como media de mínimos cuadrados $\pm$ error estándar.

6. RESULTADOS

Los resultados sobre la respuesta a los procedimientos se presentan en la Tabla 2. Se observa que mientras que el TUMASG requirió más tiempo que con la EE, la cantidad de pulsos eléctricos y sumatoria de pulsos*voltaje fue significativamente menor (Tabla 2).

Tabla 2. Respuesta a la EE o TUMASG en ovinos (n= 12) durante el inicio de la estación reproductiva.

Variable	EE	TUMASG	P
Tiempo requerido para la eyaculación (min)	5,4 $\pm$ 1,0	15,0 $\pm$ 1,0	< 0,0001
Cantidad de pulsos	32,6 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 2,0	< 0,0001
Sumatoria pulsos*voltaje	168,2 $\pm$ 13,4	28,0 $\pm$ 13,4	< 0,0001
Cantidad de vocalizaciones	1,2 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,4	ns

ns: no significativo; EE: electroeyaculación; TUMASG: masaje transrectal guiado por ultrasonido de las glándulas sexuales accesorias.

Los resultados de las características seminales de las muestras colectadas mediante EE o TUMASG se presentan en la Tabla 3. Se observa que con TUMASG, el total de espermatozoides con morfología anormal, fue significativamente menor que con la EE,

mientras que el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal tendieron a ser menor con la técnica TUMASG.

Tabla 3. Resultados del espermiograma en ovinos (n= 12) de muestras colectadas mediante EE o TUMASG, durante el inicio de la estación reproductiva.

Variable espermática	EE	TUMASG	P
Concentración espermática (espermatozoides/mL)	4018,0 ± 1003,0	3738,0 ± 1003,0	ns
Volumen (mL)	0,8 ± 0,6	0,7 ± 0,6	ns
Motilidad espermática de masa (0-5)	2,7 ± 0,7	2,3 ± 0,7	ns
Espermatozoides motiles (%)	62,0 ± 7,2	74,0 ± 7,2	ns
Total de espermatozoides motiles (x10 ⁶)	3781,4 ± 835,0	3232,1 ± 835,0	ns
Espermatozoides con motilidad progresiva (%)	46,2 ± 6,0	56,1 ± 6,0	ns
Total de espermatozoides mótils progresivos (x10 ⁶)	2756,0 ± 652,0	2574,0 ± 652,0	ns
Espermatozoides estáticos (%)	37,2 ± 7,3	26,0 ± 7,3	ns
Total de espermatozoides estáticos (x10 ⁶)	1555,0 ± 440,0	937,1 ± 440,0	ns
Espermatozoides con membrana funcional (%)	78,3 ± 7,0	87,4 ± 6,1	ns
Total de espermatozoides con membrana funcional (x10 ⁶)	5409,0 ± 1177,0	4263,3 ± 1114,0	ns
Espermatozoides con morfología anormal (%)	25,0 ± 5,0	20,4 ± 5,0	0,09
Total de espermatozoides con morfología anormal (x10 ⁶)	6249,0 ± 1152,0	4706,5 ± 1145,0	0,04

ns: no significativo; EE: electroeyaculación; TUMASG: masaje transrectal guiado por ultrasonido de las glándulas sexuales accesorias.

Los resultados de las variables cinéticas de los espermatozoides registradas en el ISAS se presentan en la tabla 4. La velocidad lineal y velocidad media de trayectoria de los espermatozoides, fueron significativamente mayor en las muestras colectadas con TUMASG que con la EE.

Tabla 4. Resultados del CASA en eyaculados colectados con EE o TUMASG en ovinos (n=12), durante el índice de la estación reproductiva.

Variable cinética	EE	TUMASG	P
VCL ($\mu\text{m/s}$)	50,5 $\pm$ 5,7	61,1 $\pm$ 6,0	ns
VSL ($\mu\text{m/s}$)	29,1 $\pm$ 3,4	40,5 $\pm$ 3,5	0,03
VAP ($\mu\text{m/s}$)	33,3 $\pm$ 3,7	44,8 $\pm$ 4,0	0,05
ALH (μm)	2,0 $\pm$ 0,23	2,3 $\pm$ 0,24	ns
BCF (Hz)	50,5 $\pm$ 5,7	61,1 $\pm$ 6,0	ns
LIN (%)	50,5 $\pm$ 5,7	61,1 $\pm$ 6,0	ns
WOB (%)	50,5 $\pm$ 5,7	61,1 $\pm$ 6,0	ns
STR (%)	71,6 $\pm$ 8,1	86,2 $\pm$ 8,5	ns

VCL: velocidad curvilínea; VAP: velocidad media de trayectoria; VSL: Velocidad lineal; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: frecuencia de cruce de batidos; LIN: linealidad de progresión; WOB: tambaleo; STR: rectitud; ns: no significativo; EE: electroeyaculación; TUMASG: masaje transrectal guiado por ultrasonido de las glándulas sexuales accesorias.

Los resultados de las anomalías espermáticas evaluadas se presentan en la Tabla 5. Se observa que en las anomalías de pieza media hay una tendencia a ser diferente a favor del TUMASG.

Tabla 5. Resultados de las anomalías morfológicas de muestras de semen de ovinos (n= 12) colectadas mediante EE o TUMASG, durante el inicio de la estación reproductiva.

Anormalidades espermáticas	EE	TUMASG	P
Anormalidades colas dobladas simples (%)	8,0 ± 2,0	7,0 ± 2,0	ns
Anormalidades cabezas piriformes (%)	0,0 ± 0,1	0,1 ± 0,1	ns
Anormalidades gotas proximales (%)	4,0 ± 2,5	4,4 ± 2,5	ns
Anormalidades gotas distales (%)	6,0 ± 1,6	3,1 ± 1,5	ns
Anormalidades pieza media (%)	0,8 ± 0,5	0,02 ± 0,5	0,06
Anormalidades colas fuertemente dobladas (%)	6,1 ± 3,0	4,6 ± 3,0	ns

ns: no significativo; EE: electroeyaculación; TUMASG: masaje transrectal guiado por ultrasonido de las glándulas sexuales accesorias.

7. DISCUSIÓN

Esta Tesis mostró que con la técnica de TUMASG se pudo colectar semen de carneros. De hecho, todos los animales respondieron a la técnica TUMASG. Además, el semen colectado durante el inicio de la estación reproductiva mediante TUMASG presentó buena calidad, al menos similar a la obtenida en el semen colectado mediante la EE.

Para lograr la colecta de semen en nuestro trabajo, el TUMASG requirió menor cantidad de pulsos eléctricos y una menor sumatoria de pulsos*voltaje que la EE. Estos resultados coinciden con lo expuesto por Ungerfeld et al. (2015), quienes observaron que el TUMASG requirió menor número de pulsos eléctricos. Sin embargo, se debe de tener en cuenta que este trabajo se realizó en muflones (*Ovis orientalis*) e íbices (*Capra pyrenaica*) anestesiados. Según Damian y Ungerfeld (2011) la aplicación de pulsos eléctricos a carneros produce un aumento en las concentraciones séricas de cortisol, temperatura rectal, frecuencia respiratoria y cardíaca, así como modificaciones en variables hematológicas y bioquímicas indicadoras de la respuesta de estrés. Por ello, se puede suponer que TUMASG afecta en menor medida el bienestar animal que la EE, reduciendo e incluso obviando la necesidad de aplicar pulsos eléctricos. Sin embargo, el tiempo empleado para la eyaculación fue mayor en TUMASG que en la EE, a diferencia de lo expuesto por Ungerfeld et al. (2015), donde los resultados en estudios realizados en muflones e íbices (*Capra pyrenaica*) demostraron que TUMASG requirió menos tiempo que la EE (Muflones: EE 21.7 ± 1.4 min TUMASG: 12.4 ± 1.2 min e Íbices: EE: 21.6 ± 4.7 min TUMASG: 15.9 ± 2.6 min). Estas diferencias podrían explicarse por diversos motivos, tales como la sensibilidad de las diferentes especies para responder a la estimulación mecánica de las glándulas sexuales accesorias con la eyaculación y que TUMASG requiere de un operador con alto grado de entrenamiento para obtener una colecta de semen eficiente sin afectar el bienestar animal (Abril-Sánchez et al., 2019).

Por otra parte, los resultados sobre la calidad de semen son comparables a los obtenidos por Abril-Sánchez et al. (2017) en chivos, quienes observaron que las características espermáticas fueron similares en las muestras colectadas con ambas técnicas (EE y TUMASG). Sin embargo, según el trabajo de Ungerfeld et al. (2015) realizado en muflones (*Ovis orientalis*) e íbices (*Capra pyrenaica*) anestesiados, las muestras de espermatozoides obtenidas fueron de mayor calidad en la EE que las obtenidas con TUMASG. Ungerfeld et al. (2015) llevaron a cabo su trabajo en animales silvestres y anestesiados, lo que lo diferencia de nuestro trabajo. Las diferencias en los resultados entre ambos trabajos pueden ser atribuidas al uso de anestésicos. La administración de agonistas alfa-2-adrenérgico induce contracciones de las glándulas sexuales accesorias, epidídimo y vías deferente durante la eyaculación, lo cual favorece la emisión de semen en carneros (Knight, 1974). A su vez, la EE ejerce un estímulo eléctrico directo sobre las glándulas sexuales accesorias, a diferencia de la estimulación mecánica ejercida durante el TUMASG (Ungerfeld et., al 2015). El efecto

de la estimulación eléctrica sobre las glándulas sexuales accesorias, aumenta la secreción de las mismas y de esta forma aumenta la proporción del plasma seminal. (Austin, Hupp y Murphree, 1961).

Guerrero-Gutiérrez (2021) observó en chivos que el semen fresco colectado con TUMASG tuvo mayor concentración espermática, motilidad espermática de masa, cantidad total de espermatozoides eyaculados, espermatozoides con motilidad, con membrana funcional y con morfología normal que el semen colectado con la EE. Las diferencias entre los resultados de Guerrero-Gutiérrez y los obtenidos en este trabajo pueden estar explicadas por el momento de colecta en la estación reproductiva, en nuestro trabajo las muestras colectadas fueron a principio de la estación reproductiva de los carneros (diciembre) y Guerrero-Gutiérrez realizó la colecta de semen durante la estación reproductiva (marzo, otoño en el hemisferio sur). Otro punto a destacar es la sensibilidad dependiente de cada especie y cómo responden éstas a TUMASG.

Por otro lado, en este trabajo los valores de VSL y VAP fueron mayores en las muestras colectadas mediante TUMASG que en las obtenidas con la EE. El análisis del semen utilizando el sistema CASA proporciona una evaluación objetiva de los parámetros cinéticos del semen (Jung, Rüdiger y Schulze, 2015). Según Broekhuijse, Sostaric, Feitsma y Gadella (2011), la VAP es un parámetro cinético que muestra una relación positiva con la fertilidad del verraco y la VSL se relaciona con una mejor fertilización del ovocito por el espermatozoide. Estos hallazgos son consistentes con los de Al-Qarawi, Abdel-Rahman, El-Mougy y El-Belely (2002), quienes observaron que las concentraciones de espermatozoides y las variables cinemáticas, principalmente los porcentajes de motilidad progresiva, ALH, LIN, VSL y VCL se correlacionan fuertemente con las tasas de fertilidad de los toros. Por su parte, Parada (2019) colectó semen con VA y encontró que espermatozoides con mayor velocidad y mayor vigor tendrían mayor éxito en atravesar el moco cervical en una posible inseminación, llegar al óvulo y atravesar la zona pelúcida para realizar la fecundación, mejorando la fertilidad. Además, también según Parada (2019), el semen de ovinos al que se le adicionó plasma seminal, tuvo una correlación positiva entre los parámetros cinéticos y la viabilidad espermática, y ésta a su vez con la posibilidad que tienen los espermatozoides de llegar al óvulo y fecundarlo. Las proteínas del plasma seminal están asociadas a eventos relacionados con la fertilización, implicadas en la interacción espermatozoide-ovocito (Topfer-Petersen et al., 1998). Se sabe que la composición del plasma seminal difiere según el método de colecta empleado, probablemente debido a diferencias en la intensidad de la estimulación de las glándulas sexuales accesorias, modificando los componentes del mismo (Guerrero-Gutiérrez, 2021). Por otra parte, es frecuente que durante la colecta de semen con la EE, éste se contamine con orina debido a la proximidad de las vías neurales que controlan la función vesical de las que inducen la eyaculación (Fumagalli, 2012). La contaminación de una muestra de semen con orina, provoca alteraciones en el pH y la osmolaridad, la presencia de restos celulares y otras células muertas; por lo que se afecta la actividad cinética (VCL, VAP y VSL) de los espermatozoides (Ellerbrock et al., 2018). Se ha demostrado que el pH alcalino y el

aumento de la concentración de la osmolaridad, reducen la motilidad de los espermatozoides. Está descrito en humanos que las condiciones hipoosmolares o alcalinas son perjudiciales sobre la motilidad de los espermatozoides, siendo irreversibles, mientras que las condiciones ácidas se pueden corregir y restaurar la motilidad de los espermatozoides (Griggers, Paccamonti, Thompson y Eilts, 2001). Estos conceptos podrían explicar las diferencias encontradas entre las variables cinéticas de las muestras de semen colectadas con EE y TUMASG. Por lo tanto, se puede suponer que los resultados obtenidos pueden haber sido modificados por los estímulos eléctricos que alteran la secreción de las glándulas sexuales accesorias, modificando la cantidad y composición del plasma seminal, afectando la motilidad de los espermatozoides.

Por otra parte, en nuestro trabajo se encontró mayor cantidad de espermatozoides con morfología anormal, específicamente de pieza media en las muestras colectadas con la EE. No se encontró en la bibliografía a que se puede atribuir ésta diferencia entre las técnicas de colecta.

Finalmente, TUMASG podría ser la técnica de elección alternativa a la EE de referencia ya que permite obtener suficiente cantidad de semen de buena calidad con menos efectos negativos sobre el bienestar animal. La respuesta a la técnica TUMASG es dependiente de cada especie y los antecedentes de TUMASG se han realizado en varias especies, pero no así en ovinos. Sin embargo, nuestros resultados fueron satisfactorios, lo que abre la posibilidad de seguir avanzando en el uso de esta técnica para la colecta efectiva de semen, así como la evaluación del semen colectado mediante TUMASG y sus ventajas.

8. CONCLUSIONES

- ❖ El TUMASG puede resultar una técnica aplicable alternativa a la EE, dado que se encontraron diferencias a favor de TUMASG en morfología espermática y en algunas variables cinéticas.
- ❖ El uso de TUMASG evitó o disminuyó el uso de pulsos eléctricos para lograr la eyaculación, por lo que permite proponer el uso del TUMASG como técnica alternativa a la EE que ofrece ventajas desde el punto de vista del bienestar animal.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abril-Sánchez, S., Freitas-de-Melo, A., Beracochea, F., Damian, J.P., Giriboni, J., Santiago-Moreno, J., y 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., y Ungerfeld, R. (2019). Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: A review on welfare problems and alternative techniques. *Animal Reproduction Science*, 205, 1-9.

Aisen, EG. (2004). *Reproducción ovina y caprina*. Buenos Aires: Editorial Inter-médica.

Al-Qarawi, A.A., Abdel-Rahman, H.A., El-Mougy, S.A., y El-Belely, M.S. (2002). Use of a new computerized system for evaluation of spermatozoal motility and velocity characteristics in relation to fertility levels in dromedary bulls. *Animal Reproduction Science*, 74, 1–9.

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

Ax, R.L., Dally, M., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D., ... Bellin, M.E. (2002). Evaluación del semen. En B. Hafez (ed.), *Reproducción e inseminación artificial en animales* (pp. 375-386). México: Mc Graw-Hill Interamericana.

Bearden, H.J., y Fuquay, J. (1982). *Reproducción animal aplicada*. México: Manual Moderno.

Boukhliq, R., El Allali, K., y Tibary, A. (2018). Gross anatomy and ultrasonographic examination of the reproductive organs in rams and bucks. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 6 (2), 226-240. Recuperado de https://www.researchgate.net/?enrichId=rgreq-25cef54f0cdd636430297c7015b1d49d-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzM0MDExNzY2MjtBUzo4NzI1NzI4NzkxMTAxNDZAMTU4NTA0ODk5NDExMA%3D%3D&el=1_x_1&_esc=publicationCoverPdf.

- Broekhuijse, M.L.W.J., Sostaric, E., Feitsma, H., y Gadella, B.M. (2012). Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *Journal of Animal Science*, 90, 779-789.
- Carroll, G. L., y Hartsfield, S. M. (1996). General anesthetic techniques in ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 12(3), 627-661.
- Cavestany, D. (1995). Brucelosis ovina jornada. Tacuarembó: INIA
- Chenoweth, P.J. (2005). Genetic sperm defects. *Theriogenology*, 64, 457–468.
- Chughtai, B., Sawas, A., O'malley, R. L., Naik, R. R., Ali Khan, S., y Pentyala, S. (2005). A neglected gland: a review of Cowper's gland. *International journal of andrology*, 28(2), 74-77.
- Correa, J.R., y Zavos, P.M. (1994). The hypoosmotic swelling test: it's employment as an assay to evaluate the funcional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, 42(2), 351-360.
- Cueto, M., Gibbons, A., Bruno-Galarraga, M.M., y Fernández, J. (2016). *Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino* (2ª ed.). Buenos Aires: INTA.
- Cunningham, J., y Klein, B. (2009). *Fisiología Veterinaria* (4ª ed.). Barcelona: Elsevier.
- Damian, J.P., y Ungerfeld, R. (2011). The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural parameters, *Reproduction Domestic Animal*, 46, 646–650.
- Delgadillo, J.A. (2020). Anatomía de los órganos genitales masculinos. En R. Ungerfeld, *Reproducción de los animales domésticos* (pp.77-78). Zaragoza: Edra.
- Durán del Campo, A. (1994). *Manual práctico de inseminación artificial en Ovinos*. Montevideo: Editorial: Hemisferio sur.

- Dyce, K.M, Sack, W.O., y Wensing, C.J.G. (1991). *Anatomía veterinaria*. Buenos Aires: Panamericana.
- Ellerbrock, R.E., Honorato, J., Curcio, B.R., Stewart, J.L., Souza, J.A.T., Love, C.C.... Canisso, I.F. (2018). Effect of urine contamination on stallion semen freezing ability. *Theriogenology*, 117, 1-6.
- Engelhardt, W.V., y Breves, G. (2005). *Fisiología veterinaria*. Zaragoza: Acribia.
- Fernández Abella, D.H. (1987). *Temas de reproducción ovina*. Montevideo: Universidad de la República.
- Fernández Abella, D.H. (1993). *Principios de fisiología reproductiva ovina*. Montevideo: Hemisferio Sur.
- Fernández Abella, D.H. (2015). *Tecnologías reproductivas bovinas y ovinas*. Montevideo: Hemisferio Sur.
- Forcada Miranda, F., Abecia Martinez, A., Casao Gascón, A., y Vázquez, I. (2009). Interacciones ambientales sobre la reproducción en ovino. En *Congreso internacional en Ciencias Veterinarias y Zootecnia* (Vol. 2, pp. 261-273). Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Jose-Alfonso-Abecia/publication/327764986_INTERACCIONES_AMBIENTALES SOBRE LA REPRODUCCION EN OVINO/links/5ba3494f45851574f7d813bf/INTERACCIONES-AMBIENTALES-SOBRE-LA-REPRODUCCION-EN-OVINO.pdf
- Frandsen, R.D., Lee Wilke, W., y Dee Fails, A. (2003). *Anatomy and physiology of farm animals* (7ª ed.). Nueva Jersey: Wiley Blackwell.
- Fumagalli, F. (2012). Parámetros fisiológicos y bioquímicos durante la electroeyaculación bajo anestesia general en el venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*). Efectos de la Edad y de la Repetición del Tratamiento (Tesis de maestría en Reproducción animal). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Gil, J. (2006). Inseminación artificial en ovinos. En R. Ungerfeld, *Reproducción en los animales domésticos, Tomo 2* (pp. 319-338). Montevideo: Melibea.

- Gil-Laureriro, J. (2020). El espermatozoide, desde la espermiación a la fecundación. En R. Ungerfeld, *Reproducción de los animales domésticos* (pp. 59- 62). Zaragoza: Edra.
- Gofur, M. R. (2015). Anatomy and histomorphometry of accessory reproductive glands of the Black Bengal buck. *European Journal of Anatomy*, 19(2), 171-178.
- Griggers, S., Paccamonti, D.L., Thompson, R.A., y Eilts, B.E. (2001). He effects of pH, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. *Theriogenology*, 56, 613-622.
- Guerrero-Gutierrez, M. (2021). *Técnica de colección y crio-resistencia seminal en chivos: masaje transrectal sexuales accesorias guiado por ultrasonido (TUMASG) vs electroeyaculación* (Tesis de Maestría). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Guerrero-Gutierrez, M., Ungerfeld, R., Garcia, M., Santiago Moreno, J., y Giriboni, J. (2021). 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. *Theriogenology*, 172, 142-149.
- Hafez, B., y Hafez, E.S.E. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. México: Mc Graw-Hill Interamericana.
- Jung, M., Rüdiger, K. y Schulze, M. (2015). In Vitro Measures for Assessing Boar Semen Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 20–24.
- Khalaf, A. S., y Merhish, S. M. (2010). Anatomical study of the accessory genital glands in males sheep (*Ovis aris*) and goats (*Caprus hircus*). *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*, 34(2), 1-8.
- Knight, T. W. (1974). A qualitative study of factors affecting the contractions of the epididymis and ductus deferens of the ram. *Journal of Reproduction and Fertility* 40, 19–29.
- Leahy, T., y de Graaf, S.P. (2012). Seminal Plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (4), 207-213.

- Ledesma, A., Manes, J., Cesari, A., Alberio, R., y Hozbor, F. (2014). Electroejaculation increases low molecular weight proteins in seminal plasma modifying sperm quality in Corriedale rams. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 324-332.
- Lozada, S.A. (2016). *Evaluación del uso de megadosis de vitamina C en ovinos machos reproductores a través del espermatograma* (Tesis de grado). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador, Quito.
- Mahmud, M. A., Onu, J., Shehu, S. A., Umaru, A., Danmaigoro, A., y Atabo, M. S. (2015). Morphological studies on epididymis and vas deferens of one-humped camel bull (*Camelus dromedarius*), Uda ram and Red Sokoto buck. *American Journal of Bioscience and Bioengineering*, 3(5), 65-71.
- Palmer, C.W. (2005). Welfare aspects of theriogenology: Investigating alternatives to electroejaculation of bulls. *Theriogenology*, 64, 469-479.
- Palmer, C.W., Brito, L.F.C., Arteaga, A.A., Soderquist, L., Persson, Y., y Barth, A.D. (2005). Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. *Animal Reproduction Science*, 87, 25–31.
- Parada, R. (2019). Tratamiento post descongelado del semen de carnero. Efecto de diferentes fracciones del plasma seminal sobre la cinética espermática (Tesis de Grado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Pérez, N., Carrilo, M., Vera, O., Drescher, K., y Denjoy, D. (2018). Respuesta de carneros West African sexualmente maduros a la extracción de semen mediante electroeyaculación. En *Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal Simposio Internacional de Producción Animal Guayaquil* (Vol. XXVI y V, pp. 162). Guayaquil: Centro de Convenciones Simón Bolívar.
- Pérez, W. (2020). Anatomía de los órganos genitales masculinos. En R. Ungerfeld, *Reproducción de los animales domésticos* (pp.47-53). Zaragoza: Edra.
- Rodríguez-Martínez, H., Kvist, U., Ernerudh, J., Sanz, L., y Calvete, J. J. (2011). Seminal plasma proteins: what role do they play?. *American Journal of Reproductive Immunology*, 66, 11-22.

- Romano, J.E., y Brinsko, S.P. (2020). Fisiología reproductiva del macho. En B.G. Klein, *Cunningham Fisiologia Veterinaria* (6ª ed., pp. 471-479). Barcelona: Elsevier.
- Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Estes, M.C., López-Sebastián, A., Guerra, R., ... Hildebrandt, T.B. (2013). Cryopreservation of aoudad (*Ammotragus lervia sahariensis*) sperm obtained by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands and electroejaculation, *Theriogenology*, 79, 383-391.
- Santiago-Moreno, J., Gomez-Brunet, A., Gonzalez-Bulnes, A., Toledano-Díaz, A., Malpoux, B., y Lopez-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, *Domestic Animal Endocrinology* 28, 416–429.
- Thackare, H., Nicholson, H.D., y Whittington, K. (2006). Oxytocin—its role in male reproduction and new potential therapeutic uses. *Human Reproduction Update*, 12(4), 437–448.
- Thomson, A. A., y Marker, P. C. (2006). Branching morphogenesis in the prostate gland and seminal vesicles. *Differentiation*, 74(7), 382-392.
- Topfer-Petersen, Romero, E.A., Varela, P.F., Ekhlasi-Hundrieser, M., Dostalova, Z., Sanz, L., y Calvete, J.J. (1998). Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypotheses and perspectives, *Andrology*, 30, 217-224.
- Tsakmakidis, I. (2010). Ram semen evaluation; development and efficiency of modern techniques. *Small Ruminant Research*. 92, 126–130
- Ungerfeld, R. (2015). Manejo de la estacionalidad reproductiva en pequeños rumiantes. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 24(2), 111-116.
- Ungerfeld, R., López-Sebastián, A., Estes, M., Pradise, J., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., ... 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, 1067–1074.

