



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**IMPACTO EN LA FERTILIDAD OVINA OBTENIDA ANTE VARIACIONES EN
LOS PROTOCOLOS DE CONGELAMIENTO DEL SEMEN**

“por”

Rocío ARBIZA RIANI

Natasha KUCZURA MAZZEI

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

MODALIDAD: Ensayo Experimental

SALTO

URUGUAY

2022

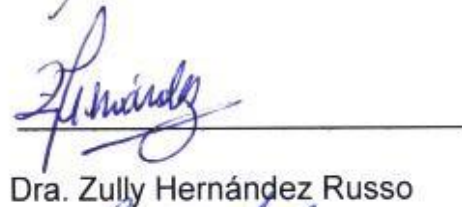
PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

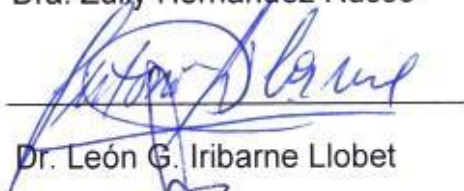
Presidente de mesa:


Dr. Daniel Fernández Abella

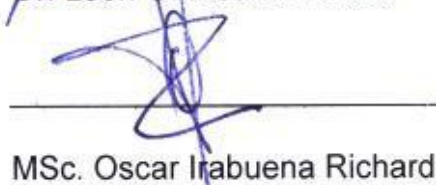
Segundo miembro (Tutor):


Dra. Zully Hernández Russo

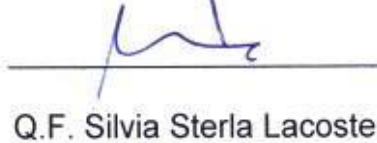
Tercer miembro:


Dr. León G. Iribarne Llobet

Cuarto miembro:


MSc. Oscar Irabuena Richard

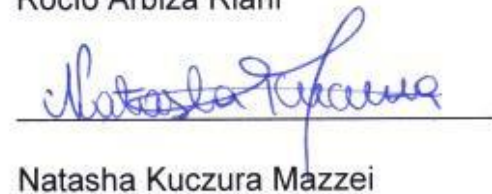
Quinto miembro


Q.F. Silvia Sterla Lacoste

Fecha

12, de agosto, de 2022

Autores:


Rocío Arbiza Riani
Natasha Kuczura Mazzei

AGRADECIMIENTOS

A nuestra tutora MSc. DMTV. Zully Hernández por su colaboración y tiempo dedicado en este trabajo.

A nuestros co- tutores QF-BC Silvia Sterla y MSc. Lic. Oscar Irabuena por el apoyo, dedicación y comprensión.

A Mario Álvarez del departamento de Matemática y Estadística del Litoral, CENUR, Litoral Norte, por su colaboración y compromiso.

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

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

Al propietario y personal del establecimiento por su contribución y amabilidad.

Al Dr. Médico Veterinario Eduardo Texeira por la realización de la técnica de Inseminación Artificial

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

<u>TABLA DE CONTENIDO</u>	<u>PÁGINAS</u>
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	6
1. RESUMEN.....	7
2. SUMMARY.....	8
3. INTRODUCCIÓN.....	9
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
4.1 Aparato reproductor del carnero.....	11
4.2 Aparato reproductor de la oveja.....	12
4.3 Fisiología reproductiva de la oveja.....	12
4.4 Fisiología reproductiva del carnero.....	13
4.5 Semen	14
4.6 Congelación y descongelación del semen.....	14
4.7 Consecuencia del proceso de congelación.....	15
4.8 Inseminación artificial.....	16
4.9 Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF).....	16
4.9.1 Preparación de la majada (sincronización de celo)	16
a. Protocolos en base a progestágenos y gonadotropinas (P4-eCG).....	16
b. Protocolos en base a prostaglandinas.....	17
4.9.2 Preparación de los retarjos.....	17
4.9.3 Tipos de inseminación.....	18
4.10 Diagnóstico de gestación.....	18
4.11 Factores que inciden en la reproducción.....	19
4.11.1 Edad reproductiva.....	19
4.11.2 Nutricionales.....	19
4.11.3 Sanidad.....	20
4.11.4 Estrés.....	20
4.11.5 Calidad seminal.....	21
4.11.6 Conservación del semen.....	21
5. HIPÓTESIS.....	22
6. OBJETIVOS.....	22
6.1 Objetivos General	

6.2 Objetivos Específicos

7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
7.1 Localización del área de estudio.....	23
7.2 Ensayo de campo.....	23
7.3 Análisis estadístico.....	26
8. RESULTADOS.....	27
9. DISCUSIÓN.....	31
10.CONCLUSIONES.....	34
11.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

PÁGINAS

Cuadros

Cuadro 1. p-valor de prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución para HPG entre tratamientos.....	27
Cuadro 2. p-valor de prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución para condición corporal entre tratamientos.....	28
Cuadro 3. p- valor de prueba Chi- Cuadrado para porcentajes de preñez entre tratamientos.....	29

Figuras

Figura 1. Ubicación Geográfica. Santa Margarita “El Pum”, Departamento de Salto.....	23
Figura 2. Técnica de Mc Master, Laboratorio de Parasitología, Facultad de Veterinaria, CENUR, Litoral Norte Salto.....	25
Figura 3. Técnica de inseminación artificial intrauterina por laparoscopia.....	25
Figura 4. Diagrama de cajas para HPG por lote de ovejas según tratamiento.....	27
Figura 5. Diagrama de cajas para condición corporal por lote de ovejas según tratamiento.....	28
Figura 6. Porcentaje de preñez en los distintos tratamientos al día 40 de gestación, según ecografía.....	29
Figura 7. Grupo homogéneo de majada Merino Australiano.....	30
Figura 8. Diagnóstico ecográfico. Embrión a los 40 días.....	30

1. RESUMEN

El proceso de congelamiento- descongelamiento del semen afecta su fertilidad. En este trabajo se evaluó el impacto de variaciones en los protocolos de congelamiento mediante el porcentaje de preñez, en ovejas Merino Australiano, en la región norte del Uruguay. Se utilizó semen de carneros Merino Australiano categoría dos dientes, congelado mediante tres protocolos y analizado “*in vitro*” en trabajo previo. En Tratamiento 1 (T1) y Tratamiento 2 (T2) el semen fue empaquetado y se dejó en reposo por 15 minutos a 20 y 4 °C respectivamente, se equilibró a 4 °C por 90 minutos y finalmente se congeló. En el Tratamiento 4 (T4), el semen fue equilibrado a 4 °C en tubo de vidrio, luego fue empaquetado a 7,8 °C, se dejó reposar 15 minutos y finalmente se congeló. Se formaron 3 grupos de ovejas, n=30, identificadas mediante caravanas, con características homogéneas en condición corporal (CC), edad y carga parasitaria (HPG). Se sincronizó el celo con esponjas vaginales impregnadas con acetato medroxiprogesterona durante 14 días, al retiro de éstas, se administró eCG intramuscular y a las 50 horas se realizó inseminación artificial intrauterina (IA) por laparoscopia. Cada grupo de ovejas fue inseminado con el semen procedente de uno de los tratamientos descriptos. A los 40 días de la inseminación, se realizó por ultrasonografía diagnóstico de gestación y los porcentajes de preñez obtenidos fueron 63,0, 60,0 y 47,0 % en T1, T2 y T4 respectivamente. Si bien las diferencias en los porcentajes de preñez obtenidos entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas ($p>0.05$) las mismas podrían impactar en la rentabilidad de la producción ovina. Asimismo, los resultados obtenidos sugieren la posibilidad de incorporar machos de alto valor genético, categoría dos dientes, en programas de IA.

2. SUMMARY

The semen freezing- thawing process affects its fertility. The aim of this study performed in a commercial farm of the northern region of Uruguay, was to evaluate the impact of modifications in the freezing protocols on the pregnancy rate in Merino Australian ewes. A semen pool from 6 two teeth Merino Australian males was used in three aliquots, each one frozen in a different protocol. Treatment 1 (T1) and treatment 2 (T2) packed at 20.0 °C and 4.0 °C respectively, rested horizontally for 15 minutes, then cooled to 4.0 °C for 90 minutes, and finally frozen. Treatment 4 (T4) cooled to 4.0 °C, in a glass tube, for 90 minutes, packed at 7.8 °C, rested 15 minutes at 4.0 °C and finally frozen. The semen freezing and the "*in vitro*" analysis of each aliquot was performed in a previous assay. Three n=30 homogenous groups of ewes, in body condition (BC), age and parasite load (EPG), identified by caravans, were synchronized with medroxyprogesterone acetate vaginal sponges for 14 days. After their removal, intramuscular eCG was administered and 50 hours later the intrauterine artificial insemination (IA) was performed, each group with one treatment. The pregnancy diagnosis was performed 40 days later by ultrasonography and the pregnancy rates were 63.0, 60.0 and 47,0 % in T1, T2 and T4 respectively. Although the statistical treatment showed no significant differences ($p>0.05$), T1 and T2 could improve the profitability of the ovine production. The results suggest the possibility of high genetic value, two teeth males could be use in AI programs.

3. INTRODUCCIÓN

La producción ovina ha sido una de las grandes protagonistas en la historia del desarrollo económico y social del Uruguay. Durante mucho tiempo fue el principal rubro proveedor de divisas del país y jugó un papel fundamental en el aprovisionamiento de materia prima, base de la industria textil nacional y de las primordiales fuentes alimenticias del entorno rural hasta hoy. Un aspecto relevante del rubro ovino es que favorece la radicación de la población en el medio rural debido al sistema de manejo que requiere la especie animal. Este tipo de producción se ubica en diferentes puntos del territorio nacional generando mano de obra en el país (Secretariado Uruguayo de la Lana, 2020b).

En el año 1850 la explotación de la especie ovina sirvió como ahorro de los productores y para sustituir en parte la carne vacuna; luego la lana comenzó a ser un ingreso de interés, lo que justificó el incremento a casi 26 millones de lanares en el año 1991. Por motivos como la baja del precio de este producto en la década del 90 y los buenos precios de la carne ovina potencializados por la aparición del Cordero Pesado SUL en 1996, influyeron para que los sistemas ovinos se volvieran más carniceros. A pesar de esta atractiva opción carnicera, el stock disminuyó hasta llegar a los 10,6 millones en el 2003. Esta situación motivó a instituciones y técnicos a seguir generando y fundamentalmente validando conocimientos, para que los productores los adopten y poder incrementar el stock con mejor productividad de sus ovinos (Bonino, 2004).

Las existencias de ovinos, de acuerdo a la declaración jurada del 30 de junio de 2021 es de 6,2 millones, lo que muestra una caída en el stock del 1,3 % en el total respecto al año 2020, con un descenso más pronunciado en la cantidad de capones (-20,6 %) y un aumento del número de corderos totales (5,8 %) (Bervejillo y Bottaro, 2021).

Entre las herramientas a considerar para incrementar la población ovina se puede recurrir a la inseminación artificial (IA), y al seleccionar reproductores con desarrollo estructural normal y buena evaluación del semen se lograría, además, mejorar la calidad de la lana, de la carne y la genética animal. A su vez, la selección basada en machos es más efectiva y rápida que cuando se basa en hembras (Dagnew, Urge, Tadesse y Gizaw, 2017; Hopkins y Evans, 1991). Hasta el 50 % del aumento en la producción ganadera es atribuible al mejoramiento genético a través del uso de la IA, el resto es debido a factores ambientales como la salud, el sitio de pastoreo, la nutrición, entre otros. Esto muestra el potencial que tiene la IA para fomentar el desarrollo productivo de la ganadería (Hernández, Benítez, Gómez y Moreno, 2017).

Asimismo, la reproducción asistida mediante la IA posibilita el mantenimiento de la diversidad genética, reducción de reproductores y de los costos por traslado de animales en programas reproductivos, aumenta la eficiencia reproductiva, previene transmisión de enfermedades y evita la incompatibilidad hembra-macho en el momento de la cópula (Gaviria Scioville y Arias Bernal, 2005; Godoy y Meneses, 2010; Marrant y Dunn, 1960). Además, permite multiplicar las características deseables de reproductores que tengan alto valor genético y obtener gran cantidad de crías del mismo padre a través de un adecuado fraccionamiento del semen (Gibbons y Cueto, 1995).

La IA se define como la transferencia de gametos del macho para llegar al oocito por medios distintos al apareamiento natural. Esto incluye la inseminación de la hembra con semen fresco, diluido o congelado (Hopkins y Evans, 1991).

El uso de semen congelado ovino produjo un gran impacto en el mejoramiento genético mundial, al acelerar el flujo de material genético superior hacia sectores poblacionales de inferiores características productivas y al facilitar el transporte de semen a nivel internacional. Su utilización permite asimismo la absorción genética de una raza local por una introducida, a través de cruzamientos absorbentes en varias generaciones. Se evita también el costoso traslado de los reproductores y se disminuye el riesgo sanitario. Por último, esta técnica posibilita preservar especies en riesgo de extinción, conservar la variabilidad genética y permitir el almacenamiento de semen fértil sin limitaciones de tiempo (Cueto, Gibbons, Bruno-Galarragam y Fernandez, 2016; Gibbons y Cueto, 1995)

Los resultados de un programa de IA pueden verse afectados por la forma de extracción del semen, la calidad seminal y el procedimiento de congelamiento y descongelamiento del mismo. Los factores que inciden específicamente en la calidad seminal son muy diversos, entre ellos el efecto de los agentes infecciosos, medio ambientales, nutricionales, raza, edad, estrés, sistema de colecta y criopreservación (Lozano, 2009).

En relación al efecto de la criopreservación sobre la calidad seminal se han comunicado trabajos donde se utilizan diferentes temperaturas y momentos de empaquetados. Maxwell y Watson (1996) reportaron mejores resultados cuando el semen ovino fue empaquetado a 4 °C y 6 °C. No obstante, Beriau, Calvo y Pérez (2016), utilizando un pool de semen de carneros empaquetado a 4 °C y 20 °C no encontraron diferencias significativas en los porcentajes de espermatozoides progresivos, rápidos y medios. Por su parte, Fernández Abella (2015a) recomienda realizar el llenado de las pajuelas a temperatura entre 20 y 25 °C, para luego ser equilibrado en nevera o refrigerador durante 2 o más horas a 4 °C.

Cayrus, Rodríguez y Machiavello (2019) evaluaron “*in vitro*” en sistema Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y progresivos rápidos, así como parámetros cinéticos, en un pool de semen ovino empaquetado a diferentes temperaturas (20 °C, 4 °C, y 7,8 °C) y momentos de empaquetados. El trabajo reporta que el empaquetado a 7,8 °C posterior al equilibramiento obtuvo los mejores resultados en la población de espermatozoides rápidos progresivos, así como en las velocidades alcanzadas por los mismos. Los ensayos “*in vitro*” deben ser complementados con evaluaciones “*in vivo*” ya que la capacidad fecundante del semen se puede alterar luego de los procesos de congelación y descongelación (Stornelli y De la Sota, 2006). Teniendo en cuenta lo anteriormente expresado, el presente trabajo evalúa “*in vivo*” tres de los cuatro diferentes tratamientos analizados “*in vitro*” por Cayrus et al., (2019).

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. Aparato reproductor del carnero

El aparato reproductor está constituido por los testículos, que tienen como misión principal la producción de espermatozoides (función exócrina) y la producción de hormonas esteroideas (función endócrina). Ambas actividades son reguladas por la interrelación entre hipotálamo, hipófisis y las gónadas.

También forman parte los órganos accesorios que ayudan a conducir las células sexuales masculinas desde los testículos hasta el aparato genital de la hembra. Estos comprenden, epidídimo, vasos deferentes, vesículas seminales, próstata, glándulas bulbo-uretrales y uretra (Arthur, 1991).

El parénquima testicular está constituido por numerosos túbulos seminíferos muy contorneados y por un tejido intersticial que secreta hormonas masculinas (Arthur, 1991; Fernández Abella, 1993). Por fuera, la túnica albugínea es una membrana fibrosa que envía proyecciones hacia el interior del testículo y sirve como sostén del parénquima (Saltiel y Bustamante, 1995). En la parte exterior, recubriendo al testículo se encuentra el escroto, que además de protegerlo, ayuda por medio de su túnica dartos, el musculo cremaster y la disposición anatómica de la vena espermática (plexo pampiniforme) a mantener una temperatura adecuada (termorregulación) para la espermatogénesis, que se desarrolla normalmente a una temperatura testicular de 4 a 5 °C inferior a la rectal (39 °C) (Fernández Abella, 1993; Saltiel y Bustamante, 1995).

En el carnero los testículos completan el descenso al momento del nacimiento y en algunos casos estos pueden permanecer en cavidad abdominal o inguinal por algunas semanas. En situaciones en donde uno de los testículos (monorquidia) o ambos (criptorquidia) no descienden, conlleva a una escasa o nula fertilidad respectivamente, no alterándose su actividad endócrina y por ende su comportamiento sexual (Fernández Abella, 1993).

Los epidídimos son órganos alargados y contorneados adheridos al borde posterior de cada testículo, puede dividirse en tres partes: cabeza, cuerpo y cola. Entre las funciones que cumple está el transporte, maduración, sobrevivencia y almacenamiento espermático. A continuación, el canal deferente conduce el espermatozoide desde la cola del epidídimo hasta la uretra. Esta última presenta una prolongación rizada de 3 a 4 cm denominada proceso uretral o vermiforme que desemboca en la parte terminal del pene denominada glándula (Fernández Abella, 1993).

Entre las glándulas accesorias están presentes, las vesículas seminales, pares y lobuladas que secretan un líquido opaco viscoso amarillento, rico en proteínas, sales de potasio, ácido cítrico y fructuosa, que puede llegar a ser más del 50 % del eyaculado. También la próstata que posee una estructura tubular ramificada siendo su contribución en el eyaculado muy pequeña (sales y enzimas). Otras de las glándulas son las bulbo-uretrales que producen un líquido viscoso claro de Ph alcalino, cuya acción contribuye a la limpieza de la uretra (Fernández Abella, 1993).

4.2. Aparato reproductor de la oveja

Los órganos reproductores de las hembras constan de los ovarios y de las porciones en forma de tubo llamadas oviductos, útero, cuello uterino, vagina y de los genitales externos. Los órganos genitales internos están sostenidos por el ligamento ancho que consta del mesovario y mesosalpinx que proporcionan soporte al ovario y al útero respectivamente (Fundación Chile, 2008).

Los ovarios tienen forma redondeada u oval, de consistencia firme y suspendidos en la región sublumbar, caudal a los riñones (Saltiel y Bustamante, 1995). Están constituidos por la médula formada por tejido fibroelástico, nervios, ramificaciones de la arteria ovárica y por venas que entran y salen a nivel del hilio y la corteza que alberga los diferentes tipos de folículos y el cuerpo lúteo (CL), dándole una apariencia irregular. En esta zona se cumplen las principales funciones del ovario como la síntesis hormonal y formación de ovocitos fecundables (Fernández Abella, 1993).

Íntimamente relacionado con el ovario se encuentra el oviducto o trompas de Falopio que se caracteriza por ser un tubo contorneado de 15 a 20 cm de largo constituido por el infundíbulo o pabellón, la ampolla y el istmo que comunica con el útero. Este último consta de dos cuernos de 10 a 12 cm de longitud, el cuerpo pequeño y un cuello o cérvix de aproximadamente 4 cm de longitud. En la constitución del útero se detallan tres capas o túnicas, el perimetrio o túnica serosa, la muscular o endometrio y en la parte más interna la membrana mucosa cubierta de glándulas. Este órgano cumple las funciones de transporte espermático, implantación y preñez, parto y regulación funcional del cuerpo lúteo. Por su parte, el cuello uterino y cérvix producen el mucus cervical que permite distinguir en que momento del ciclo se encuentra la oveja. El aparato reproductor continúa con la vagina, órgano fibromuscular de pared gruesa que se extiende desde el cérvix hasta la vulva, donde se produce la cópula y eyaculación (Fernández Abella, 1993; Saltiel y Bustamante, 1995).

En la porción terminal del aparato genital femenino se encuentra la vulva, formada por los labios vulvares unidos en las comisuras dorsal y ventral. En la comisura ventral se encuentra el clítoris en una depresión llamada fosa del clítoris (Saltiel y Bustamante, 1995).

4.3. Fisiología reproductiva de la oveja

La especie ovina es poliéstrica estacional caracterizada por una época del año en que la gran mayoría de las hembras presentan cíclicamente estros o celos y otra época del año en que un porcentaje variable de las mismas, según la raza, se encuentran en anestro. La mayor actividad reproductiva se presenta en el periodo otoño-invierno, estimulada por el acortamiento del periodo diario de luz solar (Gibbons y Cueto, 1995). Los mecanismos fisiológicos llevan a una mayor fecundidad durante el otoño, donde la tasa ovulatoria es superior tanto a nivel individual como poblacional (Fernández Abella, 1993).

El ciclo estral, periodo transcurrido entre dos estros, se puede dividir en 4 etapas; el proestro (desde el comienzo de la luteólisis hasta el inicio del estro), estro propiamente dicho, metaestro (desde el final del estro hasta la formación del CL) y diestro (presencia de un CL activo). Otra forma de describir el ciclo estral acorde a las estructuras presentes en el ovario; considera la fase folicular (desarrollo final de los folículos, ovulación y comienzo de la formación del CL, con predominio de estradiol (E2) y la fase luteal (presencia del CL funcional por 14 a 15 días, con la producción de progesterona hasta la lisis del mismo) (Hafez y Hafez; 2002; Ungerfeld, 2002).

La duración del celo es de 24 a 36 horas, dependiendo de la raza, edad, estación del año y presencia del macho. En el caso de la raza Merino puede llegar a durar 48 horas. La ovulación es espontánea y tiene lugar hacia el final del celo y la duración media del ciclo estral es de 17 días (Arthur, 1991; Fernández Abella, 1987; Hafez y Hafez, 2002).

La sincronización del estro ha sido ejercida en la oveja para realizar el servicio, mediante los procedimientos de introducción del macho en el grupo de hembras, aplicación de progesterona o de progestágenos, prostaglandinas y gonadotropinas. (Valencia y Bustamante, 1995). El tratamiento con progestágenos (descarga de la hormona luteinizante (LH), tiene como principio bloquear el ciclo para que todas las ovejas lleguen al término de su fase luteal. Luego de retirar el bloqueo se produce el estro y la ovulación simultáneamente. Los progestágenos sintéticos, sustancias de igual acción fisiológica que la progesterona, pero con mayor actividad biológica que se aplican en pesarios o esponjas vaginales de poliuretano favoreciendo su expansión. La ventaja del uso de esponjas o implantes es que se puede realizar la IA sin detección de celo, a un tiempo pre fijado (Fernández Abella, 2015b).

La gonadotropina coriónica equina (eCG o PMSG) mejora la sincronización del celo y la ovulación, lo cual repercute en la fertilidad obtenida más aun cuando se insemina con semen congelado. La respuesta a la acción de la eCG en las dosis utilizadas para inducir y sincronizar la ovulación, provoca una pequeña superovulación, lo cual mejora la prolificidad y la fertilidad (Fernández Abella, 2015b).

La administración de prostaglandina (Pg F2 α) y análogos provoca la regresión del cuerpo lúteo y la sincronización del estro y ovulación. La duración del celo y la tasa ovulatoria son similares a los observados en las ovejas que no reciben este tratamiento (Fernández Abella, 2015b).

4.4. Fisiología reproductiva del carnero

El funcionamiento del testículo está sometido a cambios neuro-hormonales, donde las hormonas hipofisarias juegan un papel preponderante y el hipotálamo al integrar el eje regulador coordina las relaciones entre la glándula pituitaria y los testículos. Las principales hormonas hipofisarias que controlan la espermatogénesis son la LH y la hormona foliculoestimulante (FSH). La primera, estimula las funciones testiculares tanto esteroidogénicas como gametogénicas de forma indirecta al actuar sobre las células de Leyding quienes secretan la

testosterona. Mientras, la FSH actúa sobre los tubos seminíferos e interviene en la espermatogénesis y la espermiación por su actividad en las células de Sertoli (Fernández Abella, 1993; Pineda, 1991). La espermatogénesis en el carnero demanda unos 63 días, resultante de sumar 49 días para formar espermatozoides y 14 días para la maduración espermática en epidídimo (Simonetti, Lynch y McCormick, 2014).

4.5. Semen

Es el líquido descargado por el macho durante el coito, formado por una suspensión de células espermáticas cuyo volumen y concentración varía según la especie animal (Arthur, 1991). Se compone de la mezcla de material fluido producto de la secreción de las glándulas anexas y de los espermatozoides (Durán del Campo, 1980).

Existen tres formas de utilizar el semen recolectado de los carneros, fresco, refrigerado y congelado. El semen fresco (puro o diluido) de óptima calidad es usado cuando los carneros están en el predio o en sus cercanías, sobre todo en la estación reproductiva. La forma refrigerada se utiliza con semen de hasta 24 horas de haber sido obtenido y debe ser conservado a 4 °C. En cambio, se recomienda el semen diluido y congelado a -196 °C cuando se quiere conservar por años o incluso por un tiempo mayor a la existencia del animal (Fundación Chile, 2008).

Los espermatozoides de los mamíferos al recorrer el tubo genital de la hembra, sufren cambios estructurales y bioquímicos (aumento en la permeabilidad del Calcio intracelular, detrimento en la relación colesterol-fosfolípidos en la membrana alcalinización citoplasmática, activación de los canales de Calcio y sodio/potasio, generación de oxígeno reactivo y fosforilación de la tirosina de las proteínas), denominado capacitación espermática (CE) e indispensable para que ocurra la fertilización. Esto ocurre cuando el espermatozoide penetra su cabeza en el oocito y libera la carga genética; por su parte, la cola provee un mecanismo propulsor que favorece su motilidad (Pineda, 1991).

4.6 Congelación y descongelación del semen

Previamente al proceso de congelación del semen se realiza el proceso de enfriado, donde pasa de los 30 °C hasta alcanzar la temperatura de 5 °C, posteriormente se realiza la fase de equilibrio, donde los espermatozoides toman contacto con el glicerol que penetra a la célula espermática para establecer un balance entre las concentraciones intra y extracelular, antes de ser congelados (Dalmazzo Henriquez, 2008). Un proceso de congelación adecuado, permite mantener en el tiempo la integridad y capacidad funcional de la célula espermática, cuando es sometida a un descenso gradual de la temperatura, produciendo una reducción reversible de su actividad metabólica.

Algunos de los aspectos a considerar en el congelamiento del semen, incluye el fenómeno conocido como “choque de frío”, que depende de la velocidad de enfriamiento, del rango de temperatura descendente y del tiempo de equilibrio de la temperatura final alcanzada (López-Brea, 2002).

En líneas generales el procedimiento de congelación planteado por Fernández Abella (2015a) consta de las siguientes fases, se coloca el semen a baño maría entre 30 y 32 °C. Seguidamente se realiza la dilución en uno (todo el diluyente a 30-32 °C) o dos pasos (una fracción entre 30 y 32 °C y la restante a 4 °C), según el método de congelación. A continuación, el empaquetado se efectúa llenando las pajuelas mecánicamente, se sellan con alcohol y posteriormente se llevan a un ambiente entre 4 y 5 °C durante 2 a 3 horas (tiempo de equilibrio). En el momento de la congelación las pajuelas pasan a vapores de nitrógeno líquido en forma horizontal (4-6 centímetros por encima del nivel del nitrógeno) entre -100 y -125 °C, durante 8 a 12 minutos. Una vez que han alcanzado temperaturas en el rango de -50 y -60 °C se sumergen en nitrógeno líquido (-196 °C) y luego son almacenadas en goblets o visotubos (tubos de plástico).

El descongelamiento del semen deberá realizarse en un ambiente templado (25 °C) y libre de polvo (Cueto et al., 2016). Las pajuelas se sumergen en un recipiente con agua a 37 °C durante 15 a 20 segundos, retirándolas y secándolas antes de cortar sus extremos (Durán del Campo, 1993).

El semen de ovino presenta una aceptable supervivencia espermática al proceso de descongelado. Se ha encontrado que el índice de concepción con semen descongelado es, por lo menos, 20 % inferior al logrado con semen fresco, encontrándose así una fertilidad del 42,20 % en ovejas inseminadas con semen descongelado a 36 °C durante 8 segundos (Angulo Mejorada, Ortiz Hernández, Berruecos Villalobos, Feldman Steel y Valencia Méndez, 1999).

4.7 Consecuencia del proceso de congelación

Los cambios que causa la criopreservación en los espermatozoides, se denomina criocapacitación, siendo similares a los que ocurren en la CE. Si estos son inducidos prematuramente pueden reducir la tasa de concepción si el semen se utiliza para IA (Rodríguez-Almeida, Ávila, Anchondo, Sánchez y Jiménez, 2008).

Los principales cambios que ocurren en el almacenamiento y en la descongelación incluyen, reducción de la motilidad e integridad morfológica de los espermatozoides. A pesar de que una gran proporción (40 – 60 %) de espermatozoides de carnero preservan su motilidad después de la congelación – descongelación, sólo un 20 – 30 % permanece fisiológicamente sin daño y con capacidad fecundante (López-Brea, 2002; Dalmazzo Henriquez, 2008).

Además, los cambios de temperatura desencadenan en las células espermáticas un estado de capacitación prematuro que origina la reacción acrosómica de una forma acelerada, con un acortamiento de la viabilidad y poder fecundante. Otra alteración consecuencia de la criopreservación, es el aumento del calcio intracelular y la inducción de estrés oxidativo que provoca efectos tóxicos y comprometen la funcionalidad del espermatozoide (Dalmazzo Henriquez, 2008).

4.8. Inseminación artificial

Se define como la transferencia de gametos para llegar al oocito por medios distintos al apareamiento natural, a través de recursos mecánicos que sustituyen los órganos especializados del macho y de forma natural se realiza la fecundación en la trompa de Falopio (unión espermatozoide-óvulo). Esto incluye la inseminación de la hembra con semen fresco, diluido o congelado (Hopkins y Evans, 1991).

En general la IA tiene como ventajas, incrementar la cantidad de hembras que pueden gestarse con un solo reproductor, masificar el uso de reproductores genéticamente superiores y de machos con alteraciones físicas, así como el transporte del material genético de forma más económica y con menores riesgos de transmisión de enfermedades venéreas (Durán del Campo, 1980;1993; Gil, 2002).

Según Durán del Campo (1980), una limitante del uso de esta técnica ha sido la elevada mano de obra necesaria, la escasez de la misma y la gran cantidad de buenos carneros disponibles. Un componente importante comprende el examen el macho en cuanto a su desarrollo estructural normal y el análisis del eyaculado en relación con la calidad seminal (Hopkins y Evans, 1991).

4.9. Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF)

La IATF permite sincronizar las actividades del ciclo productivo sin la detección de celos o estros y focalizando la nutrición en momentos claves para mejorar los indicadores reproductivos. Sin embargo, tan solo el 8,5 % de los servicios de ovejas en nuestro país se hace por IA, siendo por IATF menos de un tercio de las mismas (Fierro y Olivera-Muzante, 2016).

4.9.1. Preparación de la majada (sincronización de celo)

Este procedimiento involucra la presentación simultánea del comportamiento estral en un grupo de hembras especialmente tratadas a estos efectos. Los métodos de sincronización se pueden clasificar en dos grupos, métodos farmacológicos o artificiales (aplicación de progestágenos y prostaglandinas) y métodos naturales (introducción del macho en el grupo de hembras) (Durán del Campo, 1993).

a-Protocolos en base a progestágenos y gonadotropinas (P4-eCG)

Los métodos de sincronización del estro y de la ovulación que utilizan progesterona o sus análogos sintéticos progestágenos (P4), se basan en sus efectos sobre la fase luteal del ciclo, simulando la acción de la progesterona natural producida por el CL después de la ovulación (Mejía y María, 2010).

El uso de progesterona natural es una alternativa flexible, ya que puede ser utilizada tanto en anestro estacional como en la estación reproductiva (Menchaca y Rubianes, 2004). Tiene como principio bloquear en el ciclo la descarga de LH, lo suficiente como para que todas las ovejas lleguen al término de su fase luteal. Luego de retirar el bloqueo se produce el estro y la ovulación simultáneamente (Fernández Abella, 2015b).

Los progestágenos sintéticos son sustancias de igual acción fisiológica que la progesterona, pero con mayor actividad biológica. Su aplicación en pesarios o esponjas vaginales de poliuretano favoreció su expansión (Fernández Abella, 2015b). Al momento de la retirada, con la finalidad de mejorar la maduración folicular y la sincronización de la ovulación, se combina con la administración de eCG en dosis que varían de 250 a 600 U.I., según raza, peso del animal y época del año (Greyling, Erasmus, Taylor y Van der Merwe, 1997; Langford, Marcus y Batra 1983; Leyva, Buckrell, y Walton 1998; Roberts y Hafez, 1969). De esta forma se mejora la prolificidad y fertilidad al provocar una pequeña superovulación, más aún cuando se insemina con semen congelado (Fernández Abella, 2015b).

La ovulación ocurre a las 60 horas promedio de retirados los dispositivos (Maxwell, 1986), por lo cual se recomienda realizar la IATF dentro de las 48 a 60 horas, con aceptables resultados que dependen de la vía de IA (cervical o uterina) y de la conservación seminal realizada. El uso de estas hormonas combinadas (P4-eCG) ha obtenido hasta el momento mejores resultados reproductivos que otros protocolos en base a prostaglandinas (Olivera Muzante, Fierro, López y Gil, 2011).

b-Protocolos en base a prostaglandinas

El uso de prostaglandina F2 α o sus análogos sintéticos (PG) tiene como ventaja el menor costo respecto al método P4-eCG; su vía de administración es intramuscular lo que conlleva a una mejora en el manejo, sanidad y bienestar de las hembras ovinas (Abecia, Forcada y González-Bulnes, 2012). Debido a esto, no se producen problemas por vaginitis o adherencias, ni por contaminación medio ambiental (Fierro, Gil, Viñoles y Olivera Muzante, 2013). Como desventaja tiene que la utilización se restringe a la estación reproductiva al necesitar de un CL activo para su función (McCracken, Glew y Scaramuzzi 1970) y con el cuidado de que administrada en ovejas preñadas hasta 40-45 días de gestación produce abortos (Fernández Abella, 2015b).

La PGF2 α y análogos provoca la regresión del CL, la sincronización del estro y la ovulación. El celo se manifiesta 36-48 horas luego de su administración, produciéndose la ovulación 10 horas más tarde que cuando se sincroniza con progestágenos. La luteólisis se puede provocar solo entre los días 5 y 14 del ciclo estral (Fernández Abella, 2015b).

4.9.2. Preparación de los retarjos

El comportamiento sexual pasivo de las ovejas necesita de la colaboración del macho para intensificarlo en momentos de celo. Esto se puede lograr mediante carneros enteros deferectomizados, epididectomizados o incluso castrados. De esta forma, los retarjos marcarán las hembras en celo en la parte posterior de grupa y vulva (Durán del Campo, 1993).

4.9.3 Tipos de inseminación

De acuerdo a donde se deposite el semen, pueden describirse tres tipos de inseminación, intravaginal, intracervical o intrauterina.

La vía intravaginal implica la deposición del semen en forma ciega en el fondo de la vagina sin visualización del cérvix, requiere dosis dos o tres veces mayores para incrementar la posibilidad de fecundación, siendo el método utilizado en aquellos casos donde no es posible la introducción de la cánula en el cérvix. Este método desvirtúa uno de los principales fines de la IA que hace referencia al uso más eficiente del esperma (Durán del Campo, 1993; Fernández Abella, 2003; Fernández Abella y Villegas, 2015).

La intracervical comprende la localización del cérvix y la deposición del semen dentro del mismo o lo más cerca posible (Durán del Campo, 1993). En los ovinos la inseminación se realiza cervical superficial, depositando el semen en el segmento más próximo a la vagina. Esto se debe a la complejidad del cuello del útero y a los pliegues que se forman en la mucosa de la pared vaginal que aumentan con la edad, permitiendo solamente la introducción de la cánula hasta 0,5 a 1,0 cm. La vía cervical con semen congelado requiere dosis superiores a 120 millones de espermatozoides teniendo en cuenta las pérdidas en el proceso de congelado- descongelado, lo que hace que no se utilice con frecuencia (Fernández Abella y Villegas, 2015).

El método intrauterino implica la introducción del semen directamente dentro del cuerno uterino, pudiendo ejecutarse mediante las técnicas quirúrgica y laparoscopia (Durán del Campo, 1993). El semen en el cuerno del útero mantiene la capacidad fertilizante por 18-35 horas y requiere menor cantidad de espermatozoides. Las técnicas intrauterinas con semen fresco utilizan 20 a 50 millones de espermatozoides y con semen congelado 50 a 100 millones, lo cual significa una economía si comparamos con las cantidades necesarias mediante la vía cervical. Tiene la desventaja el costo del equipamiento y la especialización de la persona que utiliza el laparoscopio. De las tres posibles técnicas, quirúrgica (laparotomía), intracervical y endoscópica (laparoscopia), ésta última es la más utilizada, y alcanza resultados iguales o superiores a los obtenidos con el método cervical (Fernández Abella y Villegas, 2015).

4.10 Diagnóstico de gestación

La ecografía o ultrasonografía es un método para diagnosticar gestación y permite corroborar ovejas preñadas con uno, dos o más fetos y vacías. De esta forma, se puede dar un manejo diferencial en alimentación y sanidad, tanto a únicas como melliceras durante las últimas etapas de la gestación, mejorando la supervivencia de los corderos. Así mismo, al conocer el número de ovejas con gestaciones múltiples permite destinarlas a potreros más abrigados y con mejor calidad de forraje para el pre y post-parto. Además, posibilita determinar la edad de las crías y separar majadas en lotes de acuerdo a las fechas de parto, dando prioridad a las madres en la medida que se acercan al último tercio de la gestación. También, mediante la ecografía se puede separar los animales gestantes de una inseminación y los preñados en el repaso por servicio natural, así como detectar anomalías reproductivas y otras patologías (Secretariado Uruguayo de la Lana, 2020a).

4.11. Factores que inciden en la reproducción

4.11.1. Edad reproductiva

Las ovejas llegan a la pubertad a la edad de 5 a 10 meses y los carneros a los 3 a 6 meses, siendo ideal para iniciar la reproducción al año de vida (Cruz, 2010).

En las borregas en comparación con las ovejas se constata un menor desarrollo uterino, desequilibrio hormonal que lleva a menores porcentajes de fecundación y mortalidad embrionaria (McMillan y Mc Donald, 1985). En categorías jóvenes, los niveles bajos de progesterona en plasma podrían aumentar las pérdidas embrionarias en situaciones de subnutrición severa (Edey, 1976).

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

4.11.2. Nutricionales

El estado nutricional de las ovejas y carneros puede influenciar la iniciación de la estación sexual, la fertilidad y la fecundidad (Durán del Campo, 1993).

La condición corporal (CC) es una medida subjetiva del estado nutricional de un animal, que se determina por la palpación de la columna vertebral y los procesos lumbares detrás de la última costilla (Montossi et al., 1998) desarrolló una escala de 6 puntos de condición corporal para la oveja de cría. El rango utilizado para CC comienza en 0 y culmina en 5, siendo CC 0 un animal extremadamente flaco próximo a la muerte y CC 5 un animal con un grado de engrasamiento excesivo.

Existe abundante evidencia acerca de la menor supervivencia de los embriones en ovejas con muy bajo peso vivo (PV) al servicio (Edey, 1976; Guerra, Thwaites y Edey 1971). La CC está más relacionada con el verdadero “estado nutricional” que el PV, e inciden en la tasa ovulatoria (TO) y fertilidad de las ovejas. En este sentido, ovejas con CC 2,25 mostraron menor fertilidad y supervivencia embrionaria (Fernández Abella et al., 1992).

En los carneros niveles muy bajos o muy altos de alimentación, así como desbalances en los nutrientes afectan la reproducción. Cuando la CC es baja, (situación más frecuente en animales criados a campo) suelen tener menor concentración y calidad de semen, así como disminución de la libido. Particularmente, deficiencias de Vitamina A ocasionadas a partir del consumo de pastos conservados o por pastoreo en condiciones de sequía prolongada, pueden producir degeneraciones seminales y por lo tanto, influyen en la

fertilidad. También, es importante destacar que un exceso de gordura afecta negativamente la fertilidad; si bien ésta no es la situación normal en animales criados a campo, sí suele ocurrir con aquellos en confinamiento (Simonetti, Lynch y McCormick, 2014).

4.11.3. Sanidad

Una producción de semen adecuada requiere de un buen estado sanitario general y particular del aparato reproductor. Las enfermedades que cursan con un aumento de la temperatura corporal podrían alterar la espermatogénesis (Durán del Campo, 1993). Las parasitosis comprometen el estado nutricional, pudiendo afectar indirectamente su desempeño reproductivo. Las afecciones podales limitan el desplazamiento y monta de los carneros. La brucelosis (*Brucella ovis*) es una enfermedad infecciosa importante, que produce inflamación en testículos y epidídimos, afectando severamente la producción espermática (Simonetti et al., 2014).

Así mismo, en las ovejas un correcto estado sanitario incide en un mayor porcentaje de celos y cantidad de ovulaciones múltiples. En este sentido, el control de los parásitos internos es de vital importancia en borregas y ovejas en momentos estratégicos como previo al servicio y parto (Manazza, 2004).

La alta presencia de *Haemonchus contortus*, uno de los nematodos más prevalentes en la majada uruguaya (Nari y Cardozo, 1987), se encontró que afecta parámetros reproductivos, y las altas cargas parasitarias en general ocasionan pérdidas en la calidad de la ovulación y CL de mala funcionalidad (Fernández Abella et al., 2006). En consecuencia, la tasa de concepción se reduce marcadamente, determinando menor fertilidad, prolificidad y fecundidad; la fertilidad disminuyó significativamente cuando la carga parasitaria superó los 900 huevos por gramo (HPG) (Fernández Abella y Villegas, 2015).

Una forma de cuantificar la magnitud de las parasitosis es mediante la técnica de Mc Master (cuantitativa) que permite determinar la cantidad de huevos de nematodos gastrointestinales u ooquistes que son eliminados con la materia fecal. El resultado se expresa en HPG u ooquistes por gramo de heces. La mayoría de los huevos de los nematodos gastrointestinales son indiferenciables morfológicamente, requiriendo otra técnica coprológica como el cultivo de larvas para determinar los géneros parasitarios presentes. Una de las técnicas propuestas es la de Roberts y O'Sullivan que consiste en proporcionar las condiciones de temperatura, humedad y oxígeno a los huevos de nematodos gastrointestinales para obtener las larvas 3, que presentan características morfológicas diferenciables (Vignau, Venturini, Romero, Eiras y Baso, 2005).

4.11.4. Estrés

El estrés puede influir negativamente sobre el transporte espermático a través de modificaciones en la emisión de hormonas gonadotrópicas (Durán del Campo, 1993).

4.11.5. Calidad seminal

Luego de su recolección, es importante que el semen se mantenga protegido de los cambios bruscos de temperatura, contacto con el agua y metales, radiación solar directa e impurezas (Cueto et al., 2016).

Los métodos de evaluación de la calidad del semen se pueden clasificar en, pruebas macroscópicas (volumen, color, olor, movilidad en masa, pH), pruebas microscópicas (concentración, movilidad, morfología, porcentaje de espermatozoides vivos o muertos, pureza), pruebas biológicas (porcentaje de preñez, resistencia del espermatozoide, viabilidad), pruebas bioquímicas (coeficiente respiratorio, índice de fructolisis, poder deshidrogenante, acidez) (Fernández Abella y Villegas, 2015). Si bien estos parámetros brindan información sobre la calidad seminal de una muestra, no son indicadores directos de fertilidad (Buzón Cuevas, 2013).

4.11.6. Conservación del semen

Durante los procesos de conservación, congelación y descongelación se producen alteraciones bioquímicas como en las proteínas citoplasmáticas, sobre todo las del acrosoma y provocan lesiones secundarias a nivel de las fibrillas de la pieza media por acumulación de calcio, así como también, cambios en la anatomía de las células espermáticas que determinan pérdidas en la capacidad fecundante de los espermatozoides. Los protocolos de conservación espermática deben asegurar una supervivencia en cantidad y calidad que permiten obtener resultados en tasas de concepción superiores al 50 % (Fernández Abella, 2015a). La refrigeración y criopreservación de los espermatozoides reducen o interrumpen su actividad metabólica y alargan su viabilidad (Rodríguez, Ávila, Anchondo, Sánchez y Jiménez, 2008).

5. HIPÓTESIS

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

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Evaluar “*in vivo*” la fertilidad del semen de carneros Merino Australiano categoría dos dientes, congelado en diferentes protocolos, mediante el porcentaje de preñez en ovejas Merino Australiano.

6.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el impacto de diferentes momentos y temperaturas de empaquetado en los protocolos de congelamiento del semen sobre la fertilidad de las ovejas.
2. Observar si las subpoblaciones de espermatozoides rápidas progresivas determinadas “*in vitro*” correlacionan con la fertilidad “*in vivo*”.
3. Observar si las velocidades de las subpoblaciones rápidas determinadas “*in vitro*” correlacionan con la fertilidad “*in vivo*”.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Localización del área de estudio

Este trabajo se realizó en el año 2020 y se llevó a cabo en el departamento de Salto – Uruguay, en el establecimiento Santa Margarita “El Pum” (agrícola-ganadero), ubicado sobre ruta 31, km 42, al norte del país (Latitud 31°.34'.15" / Longitud 57°.45'. 23"). El tipo de suelo que predomina es basalto profundo y en menor cantidad basalto superficial, con un índice CONEAT de 130 promedio.

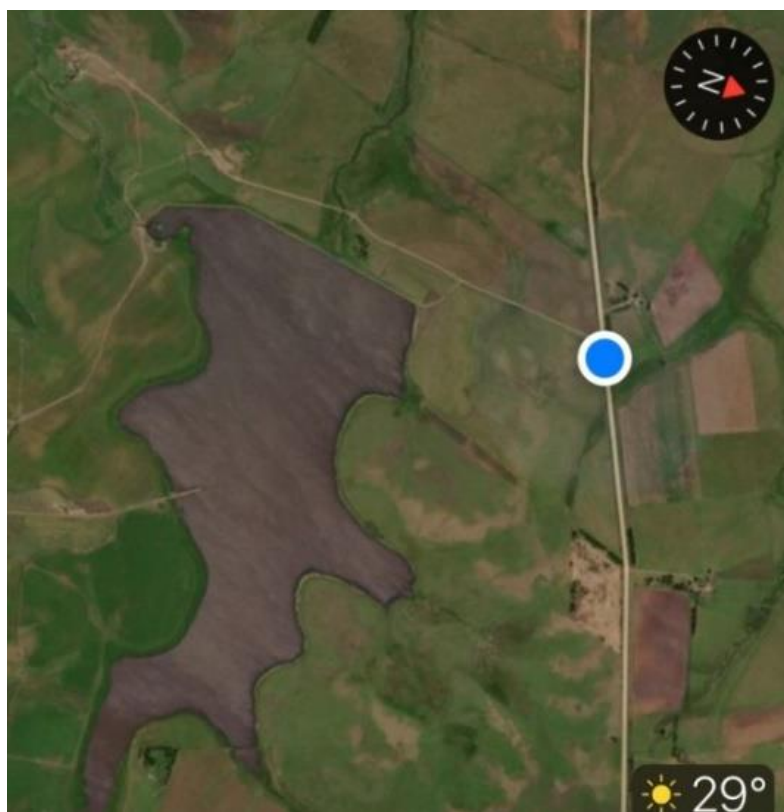


Figura 1. Ubicación Geográfica. Santa Margarita “El Pum”, Departamento de Salto.

Fuente: Google Earth

7.2. Ensayo de campo

Se utilizaron 90 ovejas de cría multíparas de la raza Merino Australiano categoría 6 dientes y boca llena, constituyendo un grupo homogéneo (figura 7) en cuanto a condición corporal y sanitaria. Los animales permanecieron pastoreando sobre campo natural en el mismo potrero durante todo el ensayo.

El día 1 del ensayo (26 de febrero): se formaron 3 grupos al azar, los animales se identificaron con caravanas numeradas y de distinto color (amarilla, blanca y verde).

Se determinó la CC (Jefferies,1961) y la edad a través de la dentición y se extrajo materia fecal individual para análisis coproparasitario.

Día 2 y 3 (27 y 28 de febrero): se estimó la carga parasitaria de nematodos gastrointestinales a través de la técnica de Mc Master en el Laboratorio de Parasitología, Facultad de Veterinaria, CENUR, Litoral Norte Salto. Se realizó el diagnóstico de *Fasciola hepatica* mediante la técnica de Happich & Boray (Thienpont et al., 1986) (Figura 2).

Día 4 (29 de febrero): se dosificaron todas las ovejas con un antiparasitario compuesto de Ivermectina 0,2 %, Levamisol 8% y Albendazol 5%.

Día 15 (12 de marzo): se colocaron esponjas vaginales impregnadas con 60 mg de acetato medroxiprogesterona (Progespon) para la sincronización de celos para la realización de IATF.

Día 29 (26 de marzo): se realizó el retiro de esponjas y la administración de 400 UI de eCG (Dermaglon) intra muscular.

Día 30 (27 de marzo): para detectar celo, se introdujeron retarjos con la majada para detección de celo y con el consiguiente “efecto macho”.

Día 31 (28 de marzo): se realizó la IA intrauterina por laparoscopia según Fernández Abella y Villegas (2015). Para este procedimiento se utilizó semen previamente criopreservado y evaluado “*in vitro*” por Cayrus et al. (2019).

Cada grupo fue inseminado según el tratamiento correspondiente y de acuerdo al siguiente detalle:

T1 Grupo caravanas amarillas: semen empaquetado a 20,0 °C, se dejó en reposo horizontalmente durante 15 minutos a la temperatura antes indicada y posteriormente fue equilibrado a 4,0 °C durante 90 minutos

T2 Grupo caravanas verdes: semen empaquetado a 4,0 °C se dejó en reposo horizontalmente durante 15 minutos a la temperatura antes indicada y posteriormente fue equilibrado a 4,0 °C durante 90 minutos

T4 Grupo caravanas blancas: semen equilibrado a 4,0 °C durante 90 minutos y empaquetado a 7,8 °C dejando estabilizar durante 15 minutos a 4,0 °C para finalizar congelamiento de las mismas.

Día 72 (8 de mayo): se realizó el diagnóstico de gestación por vía transrectal, utilizando ecógrafo DRAMINSKI Mini 4Vet iScan (Figura 8).



Figura 2. Técnica de Mc Master, Laboratorio de Parasitología, Facultad de Veterinaria, CENUR, Litoral Norte Salto.



Figura 3. Técnica de inseminación artificial intrauterina por laparoscopia.

7.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se implementó la prueba de Chi- Cuadrado con valores absolutos para el estudio del porcentaje de preñez entre tratamientos, donde se plantea como hipótesis nula “T1=T2=T4” e hipótesis alternativa “al menos uno es diferente”. Con un margen de error de 0,05 y con un grado de libertad equivalente a 2.

Para obtener el valor de Chi- Cuadrado calculado se tiene la fórmula:

$$\chi^2 = \sum (f_o - f_e)^2 / f$$

f_o: frecuencia de valor observado

f_e: frecuencia del valor esperado

Se aplicó la prueba de Kolmogorov- Smirnov para constatar si las variables HPG y CC seguían la misma distribución para los diferentes tratamientos.

8. RESULTADOS

HPG

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

Cuadro 1. p-valor de prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución para HPG entre tratamientos, al comienzo del ensayo.

	T1	T2	T4
T1	1,000	0,236	0,998
T2		1,000	0,586
T4			1,000

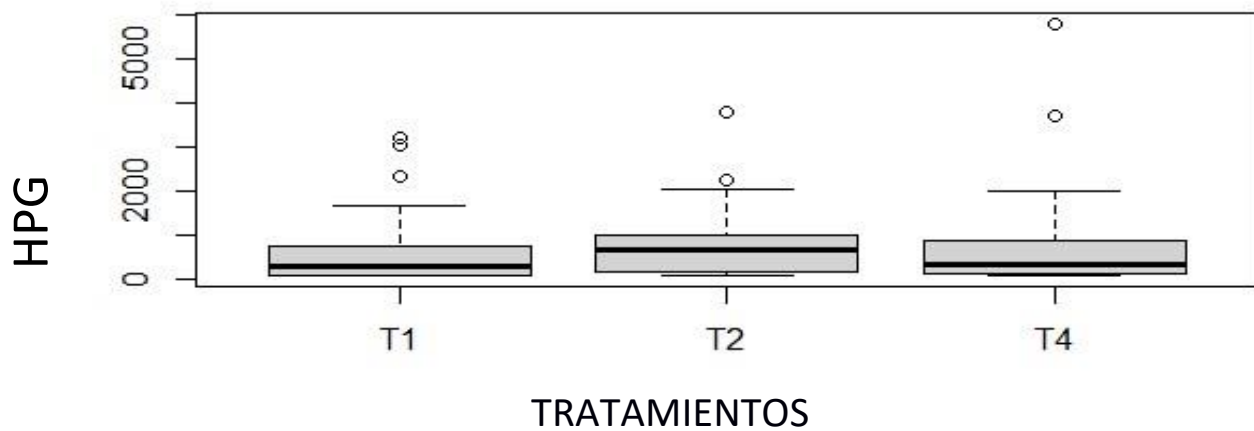


Figura 4. Diagrama de cajas para HPG por lote de ovejas según tratamiento.

Condición Corporal

La prueba de Kolmogorov- Smirnov no detectó diferencias significativas en la distribución de la variable condición corporal ($p>0,05$) entre tratamientos.

Cuadro 2. p-valor de prueba Kolmogorov- Smirnov de igualdad de distribución para condición corporal entre tratamientos, al comienzo del ensayo.

	T1	T2	T4
T1	1,000	0,799	0,952
T2		1,000	0,799
T4			1,000

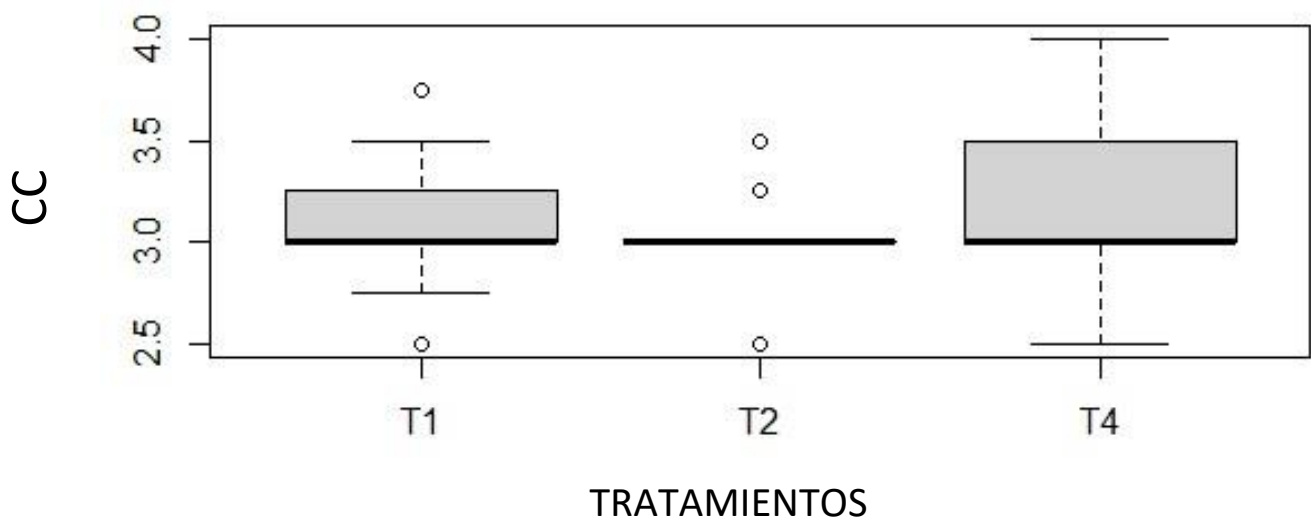


Figura 5. Diagrama de cajas para condición corporal por lote de ovejas según tratamiento.

Porcentaje de preñez

Con la metodología de IA Intrauterina, los porcentajes de preñez obtenidos, determinados ecográficamente a los 40 días post inseminación fueron, 63,0 % en el T1, 60,0 % en el T2 y 46,6 % en el T4. (figura 6)

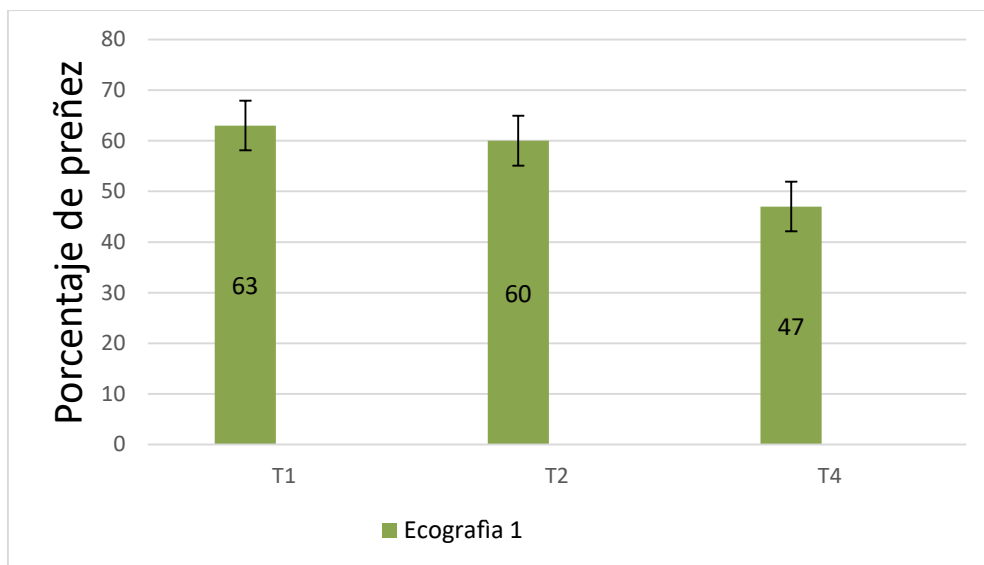


Figura 6. Porcentaje de preñez en los distintos tratamientos al día 40 de gestación, según ecografía.

La prueba Chi- Cuadrado no detectó diferencias significativas para el estudio del porcentaje de preñez ($p > 0,05$) entre tratamientos. X^2 calculado es menor X^2 tabla. Por lo tanto, no se rechaza la hipótesis nula.

Cuadro 3. Valores absolutos de la prueba Chi- cuadrado para el estudio de porcentajes de preñez entre tratamientos.

Observados	T1	T2	T4	Total
Preñada	19	18	14	51
Vacía	11	12	16	39
Total	30	30	30	90

El cálculo del P-valor para la prueba de chi- cuadrado de independencia entre las variables es de 0.387.

Las diferencias observadas en la motilidad progresiva y en la distribución de velocidades en el estudio “*in vitro*” (Cayrus et al, 2019) a favor de T4 no se vieron reflejadas en el porcentaje de preñez obtenido en dicho tratamiento.



Figura 7. Grupo homogéneo de majada Merino Australiano.



Figura 8. Diagnóstico ecográfico. Embrión a los 40 días

9. DISCUSIÓN

En este trabajo se utilizó el porcentaje de preñez como indicador de la fertilidad de semen de carneros Merino Australiano categoría dos dientes empaquetado en diferentes momentos y temperaturas.

Con la metodología de IA Intrauterina, los porcentajes de preñez obtenidos, determinados ecográficamente a los 40 días post inseminación fueron, 63,0 % en el T1, 60,0 % en el T2 y 46,6 % en el T4.

Rodríguez (2004) reporta mejores resultados utilizando semen congelado cuando se deposita el semen directamente en el útero, esto se relaciona con los porcentajes de preñez obtenidos por Maxwell y Hewitt (1986) utilizando vía cervical o intrauterina siendo sus resultados 40 % y 60 % respectivamente. Otros autores reportan una tasa de preñez con valores entre 50- 65% utilizando inseminación intrauterina (Gibbons y Cueto, 1995; Hafez, 1996; Haresign y Read, 1986; Hunton 1987; Maxwell, Butler y Wilson 1984; Maxwell y Hewitt, 1986; Raimundo, 1993; Salamon y Maxwell, 1995;). Angulo Dominguez y Angulo Dominguez (2019), utilizando la raza East Frislean, en la categoría borregas y con un protocolo de congelamiento similar a T4, obtienen porcentajes de preñez entre 45 y 50%.

En la raza Merino Australiano Fernández Abella et al. (2003) reporta porcentajes de preñez entre 30 y 37 %, combinando inseminación intrauterina con diferentes métodos de sincronización de celo. Olivera Muzante, Gil, Fierro, Duran y Alabart (2007), utilizando la misma raza en categoría borregas obtuvieron una tasa de no retorno (NR) a los 21 días de 63,2 % y un porcentaje de preñez de 47,4 % a los 60 días mediante ecografía. En la categoría adultos una tasa de NR de 54,1 % y 41,9 % respectivamente. Asimismo, estos autores utilizan machos adultos, exigen porcentajes de espermatozoides móviles superiores al 30 % y utilizan 250×10^6 espermatozoides/pajuela. Para Fernández Abella (2015a) las pajuelas con menos del 35 % de motilidad, cuando se trabaja con semen de carnero, deberían ser rechazadas.

El material utilizado en esta tesis (Cayrus et al., 2019), proviene de machos categoría dos dientes con porcentajes de motilidad post congelamiento-descongelamiento que no superan el 20 % y con 60×10^6 espermatozoides/pajuela. La categoría dos dientes es reportada como de menor desempeño reproductivo con respecto a machos adultos (Morón Cedillo et al., 2012; Ostrowski, 1980; Silva y Fassana, 2017). A pesar de ello y de las dosis inseminantes inferiores empleadas, los porcentajes de preñez obtenidos en este trabajo, son concordantes con los reportes nacionales e internacionales utilizando inseminación intrauterina.

En los diferentes protocolos de congelamiento la variación en la temperatura y momento de empaquetado han sido reportados por diferentes autores como condiciones que impactan en la calidad del semen y en su capacidad fertilizante. En el presente trabajo las pajuelas correspondientes a T1 y T2 fueron llenadas a temperatura ambiente controlada, 20,0 ° y 4,0 °C respectivamente, luego de

reposar, fueron equilibradas a 4,0 °C y congeladas. Fernández Abella (2015a), recomienda el uso del T1 para la obtención de mejores resultados frente al protocolo tradicional utilizado a campo, en el cual el semen diluido se equilibra enfriándolo a 4,0 °C durante 90 minutos y luego se empaqueta a temperatura superior, que en nuestro ensayo corresponde al T4. Maxwell et al. (1995) recomiendan empaquetar entre 4,0 a 6,0 °C para obtener mejores resultados, en nuestro ensayo esto corresponde al T2. Beriau et al. (2016) al comparar tres temperaturas de empaquetado del semen de carnero Merino Australiano, 35,0 °, 4,0 ° y 20,0 °C, encontraron que la primera de ellas era la condición más desfavorable, siendo 4,0 °C y 20,0 °C, de desempeño muy similar, con respecto a los espermatozoides rápidos progresivos, rápidos y medios, presentes al descongelar el mismo. Concordando con lo que reportan estos autores, a pesar de no presentar diferencias significativas entre tratamientos, T1(63 %) presentó el mayor porcentaje de preñez seguido de T2(60 %) (20,0 y 4,0 °C respectivamente).

En este trabajo el semen utilizado fue evaluado previamente "*in vitro*" por Cayrus et al. (2019) utilizando la motilidad como principal indicador de calidad seminal, (combinando progresividad y velocidad). Varios autores reportan una correlación positiva entre este parámetro y la fertilidad del semen post descongelamiento en diferentes especies y razas (Abaigar et al., 1999; Davis et al., 1995; Holt, 1995; Martínez-Pastor et al., 2005; Muiño et al., 2005; Muiño et al., 2015; Ramón et al., 2013; Rodríguez- Martínez, 2001; Yániz et al., 2015). Según Fernández Abella (2015a) el movimiento progresivo o normal es el que determina que el espermatozoide avance y pueda fecundar, por lo cual importa que exista un alto número de espermatozoides con dicho movimiento. Cayrus et al (2019), reportan que, si bien no encontraron diferencias significativas entre tratamientos, el T4 presentaba valores más altos de la subpoblación de espermatozoides rápidos progresivos y mayor cantidad de espermatozoides con velocidades superiores a 100 µm/s, en velocidad curvilínea, rectilínea y promedio. Al igual que "*in vitro*" el ensayo "*in vivo*" no muestra diferencias significativas entre tratamientos, aunque difieren los porcentajes de preñez alcanzados siendo el T4 el de peor desempeño. Esto puede deberse a lo planteado por Fernández Abella (2015a), quien manifiesta que el empaquetado a temperaturas superiores a 6 °C y previamente equilibrado, podría provocar daños irreversibles en los espermatozoides, lo que afectaría la fertilidad del semen.

Según Muiño et al. (2005) pocos parámetros individuales de viabilidad espermática, motilidad, integridad de membrana o acrosoma, con cromatina normal, entre otros, muestran una relación significativa con la fertilidad, teniendo en cuenta que el proceso de fertilización es multifactorial, deberían evaluarse varios al momento de determinar la calidad seminal.

Los espermatozoides pueden sufrir la pérdida de la integridad de sus membranas, así como la inactivación de enzimas acrosomales y la pérdida de fosfolípidos en el proceso de congelación y descongelación (Angulo Mejorada et al., 1999). Muiño, et al. (2005) obtuvieron una correlación significativa entre el estado de los acrosomas y la fertilidad de semen congelado en bovinos. El deterioro del acrosoma impide la penetración a las membranas que rodean al ovocito (Thundathil, 2002).

Asimismo, la calidad del semen se ve afectada por la presencia de especies oxígeno reactivas (ROS), estas provocan daños sobre la estructura del ADN el

cual es muy sensible al estrés oxidativo (Mehraban et al., 2020; Tvrdá, 2011). Estas especies aumentan su concentración durante el proceso de congelación-descongelación, a consecuencia de ello, durante el mismo se produce la fragmentación del ADN afectando la capacidad fecundante de los espermatozoides (Posado. R et al.,2011). Cualquier anomalía que afecte alguna condición del esperma, dificultará su capacidad fecundante (Falchi et al., 2018; Maxwell y Watson, 1996; Rodríguez-Martínez, 1999).

10. CONCLUSIONES

En las condiciones de este trabajo:

1- Respecto a la fertilidad del semen:

1.a. Mediante la evaluación "*in vivo*" se podría inferir que la fertilidad del semen de carneros Merino Australiano categoría dos dientes, es apta para su utilización en un programa de IA intrauterina.

1.b. Esto permitiría la utilización de machos de alto valor genético en forma más temprana en programas de IA.

2- Respecto a los porcentajes de preñez a pesar de no haber diferencia significativa entre tratamientos, las diferencias de 16 y 13 puntos porcentuales entre T1 y T2 con T4 respectivamente, podría impactar en la rentabilidad del programa de IA aplicado. Esto ameritaría repetir el ensayo con una muestra mayor de animales.

3- Respecto a la calidad seminal se debería evaluar varios parámetros "*in vitro*" debido al carácter multifactorial de la fertilización y la no concordancia con el desempeño "*in vivo*" de T4.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abaigar, T., Holt, W.V., Harrison, R.A.P., y Del Barrio, G. (1999). Sperm subpopulations in Boar (*Sus scrofa*) and Gazelle (*Gazella dama mhor*) semen as revealed by pattern analysis of computer- assisted motility assessments. *Biology of Reproduction*, 60, 32-41.
- Abecia, J.A., Forcada, F., y González-Bulnes, A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130,173-179.
- Angulo Domínguez, A. R., y Angulo Domínguez, E.F. (2019). *Estudio comparativo de dos sistemas de congelamiento de semen y su efecto sobre la fertilidad en ovinos, Centro Experimental Casaraca* (Tesis de grado). Facultad de ciencias agropecuarias, Cerro de Pasco.
- Angulo Mejorada, R. B., Ortiz Hernández, A., Berruecos Villalobos, J.M., Feldman Steel, D., y Valencia Méndez, J. (1999). Motilidad y fertilidad del semen de carnero descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. *Veterinaria México*, 30(3), 265-268.
- Arthur, G.H. (1991). *Reproducción y obstetricia en veterinaria* (6ª ed). Madrid: McGraw Hill Interamerica.
- Beriau, I.J., Calvo, E.R., y Pérez, M.I. (2016). *Efecto de la temperatura ambiente en el empaquetado de pajuelas sobre la calidad de semen ovino* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo.
- Bervejillo, J., y Bottaro, M.P. (2021). Situación y perspectivas de la cadena ovina. En Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, *Anuario OPYPA 2021*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-opypa-2021/analisis-sectorial-cadenas-productivas/situacion-0>
- Bonino, J. (2004). *Incremento de los procreos ovinos*. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Ed.), *Jornadas Uruguayas de Buiatría* (Vol. XXXII, pp. 45-51). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.
- Buzón Cuevas, A. (2013). *Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba.
- Cayrus, P.W., Rodríguez, J.M., y Machiavello, R. (2019). *Impacto de variaciones en los protocolos de congelamiento sobre la calidad del semen ovino* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo.
- Cruz, R. (2010). *Manual de Producción Ovina*. Asunción: OPS. Recuperado de https://www.paho.org/par/index.php?option=com_docman&view=download&alias=

- Cueto, M., Gibbons, A., Bruno-Galarragam, M., y Fernandez, J. (2016). *Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino* (2ª ed.). Buenos Aires: INTA.
- Dagnew, Y., Urge, M., Tadesse, Y., y Gizaw, S., (2017). Sheep Production and Breeding Systems in North Western Lowlands of Amhara Region, Ethiopia: Implication for Conservation and Improvement of Gumz Sheep Breed. *Open Journal of Animal Sciences*, 7(02), 179.
- Dalmazzo Henriquez, P. F. (2008). *Comparación de dos métodos de congelación de semen ovino* (Memoria de Título). Universidad austral de Chile, Valdivia.
- Davis, R.O., Drobnis, E.Z., y Overstreet, J.W. (1995). Application of multivariate cluster, discriminate function, and stepwise regression analyses to variable selection and predictive modeling of sperm criosurvival. *Fertility and Sterility*, 63, 1051- 1057. doi: 10.1016 / S0015-0282 (16) 57547-5
- Durán del Campo, A. (1980). *Anatomía, Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en Ovinos*. Montevideo: Hemisferio Sur.
- Durán del Campo, A. (1993). *Manual Práctico de reproducción e inseminación artificial el ovinos*. Montevideo: Hemisferio Sur.
- Edey, T.N. (1976). Embryo mortality in sheep breeding. En *Sheep Breeding Proceedings International Congress, Muresk and Perth* (pp.400-401). South Bentley: Western Australian Institute of Technology.
- Falchi, L., Galleri, G., Zedda, M. T., Pau, S., Bogliolo, L., Ariu, F., y Ledda, S. (2018). Liquid storage of ram semen for 96 h: Effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. *Livestock Science*, 207, 1-6. doi:0.1016/j.livsci.2017.11.001
- Fernández Abella, D. (1987). *Temas de reproducción ovina*. Montevideo: Universidad de la República.
- Fernández Abella, D. (1993). *Principios de fisiología reproductiva ovina*. Montevideo: Hemisferio Sur.
- Fernández Abella, D. (2003). *Manual de inseminación artificial por vía cervical en ovinos*. Montevideo: Secretariado Uruguayo de la Lana.
- Fernández Abella, D. (2015a). Conservación de semen en bovinos y ovinos. En *Tecnologías reproductivas bovinas y ovinas* (pp. 165-178). Montevideo: Hemisferio Sur.

- Fernández Abella, D. (2015b). Control biotecnológico de la reproducción en la oveja. En *Tecnologías reproductivas bovinas y ovinas* (pp. 75-95). Montevideo: Hemisferio Sur.
- Fernández Abella, D., Bonilla Riera, C. Irabuena, O., y Sterla, S. (2003). *Importancia de la sincronización del celo y de la calidad del semen en la fertilidad obtenida por inseminación intrauterina*. Recuperado de https://drive.google.com/file/d/11nqq89dPEPDdd02HA-pvbXicPzdm_6YD/view
- Fernández Abella, D., Castells, D., Piaggio, L., y Deleon, N. (2006). Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos. I. Efecto de distintas cargas 46 parasitarias y su interacción con la alimentación sobre las pérdidas embrionarias y fecundidad. *Producción Ovina*, 18, 25-31.
- Fernández Abella, D., y Villegas, N. (2015). Inseminación Artificial en Ovinos. En D. Fernández Abella, *Tecnologías Reproductivas Bovinas y Ovinas* (pp. 127-151). Montevideo: Hemisferio Sur.
- Fierro, S., Gil, J., Viñoles, C., y Olivera-Muzante, J. (2013). The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: a review. *Theriogenology*, 79, 399-408.
- Fierro, S., y Olivera-Muzante, J. (2016). *Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en Ovinos: nuevas alternativas para incrementar su adopción*. Recuperado de http://www.eemac.edu.uy/canque/joomdocs/canque_37/canque_8-13.pdf
- Fundación Chile. (2008). *Manual de producción ovina*. Recuperado de <https://www.indap.gob.cl/docs/default-source/default-document-library/manual-de-producci%C3%B3n-ovina-para-extensionistas.pdf?sfvrsn=0>
- Gaviria Scioville, M.T., y Arias Bernal, L. (2005). Características seminales del jaguar (*Panthera onca*) en cautiverio en dos zoológicos colombianos. *Revista De Investigación (Bogotá)*, 5(2), 241 - 246.
- Gibbons, A., y Cueto, M. (1995). *Manual de Inseminación Artificial en la Especie Ovina*. Buenos Aires: INTA Bariloche. Recuperado de http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/07-manual_ia.pdf
- Gil, J. (2002). Inseminación artificial en ovinos. En R. Ungerfeld, *Reproducción en los animales domésticos* (Vol. 2, pp. 319-338). Montevideo: Melibea.
- Godoy, J.M., y Meneses, R. (2010). *Inseminación artificial*. Recuperado de <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/informativos/NR38608.pdf>
- Greyling, J.P.C., Erasmus, J.A., Taylor, G.J., y Van der Merwe, S. (1997). Synchronization of estrus in sheep using progestagen and inseminating with chilled semen during the breeding season. *Small Ruminant Research*, 26, 137-143.
- Guerra, J. C., Thwaites, C. J., y Edey, T. N. (1971). The effects of live weight on the ovarian response to pregnant mare serum gonadotrophin and on embryo mortality in the ewe. *Journal of Agricultural Science*, 76, 177-178.

- Hafez, E. (1996). *Reproducción e Inseminación Artificial de Animales*. México: Interamericana.
- Hafez, E., y Hafez, B. (2002). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales* (7ª ed.). México: Mc Graw-Hill Interamericana.
- Haresign, W., y Read, S.R. (1986). A note on the use of laparoscopy for insemination of frozen – thawed semen in the ewe. *Animal Science*, 43(3), 553-556.
- Hernández, J.A., Benítez, J.A., Gómez, A., y Moreno, L. (2017). *Inseminación artificial animal: historia y evolución*. Mololoa: Universidad Tecnocientífica del Pacífico.
- Hidalgo, C., Cohen, A., y Méndez, J. (1995). *Reproducción de animales domésticos*. México: Limusa.
- Holt, W. (1995). Can we predict fertility rates? making sense of sperm motility. *Reproduction in Domestic Animals*, 31, 17–24. doi: 10.1111 /j.1439-0531.1995.tb00001.x
- Hopkins, S., y Evans, L. (1991). Inseminación artificial. En L.E. McDonald y L.H. Pineda, *Endocrinología veterinaria y reproducción* (4ª ed., pp. 345-378). México: Interamericana.
- Hunton, J, Flecker.S y Maxwell, W. (1987). Pregnancy rates following intra – uterine insemination with pellet or straw frozen ram semen. *The Journal of Agricultural Science*, 109(1), 189-191. Recuperado de <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-agricultural-science/article/abs/pregnancy-rates-following-intrauterine-insemination-with-pellet-or-strawfrozen-ram-semen/DE10901212C96537C8F5B5BBF467A213>
- Jefferies, B.C. (1961). Body condition scoring and its use in management. *Tasmanian Journal of Agriculture*, 32, 19-21.
- Langford, G.A., Marcus, G.J., y Batra, T.R. (1983). Seasonal effects of PMSG and number of inseminations on fertility of progestagen-treated sheep. *Animal Reproduction Science*, 57, 307-312.
- Leyva, V., Buckrell, B.C., y Walton, J.S. (1998). Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology*, 50, 395-416.
- López-Brea, J. (2002). *Congelación de semen de la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas* (Tesis de grado). Universidad Complutense de Madrid.
- Lozano, H. (2009). Factores que afectan la calidad seminal en toros. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 59(3), 258-272.
- Manazza, J. (2004). *Manejo sanitario y reproductivo de los ovinos*. Recuperado de https://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecci

- Martínez-Pastor, F., García-Macias, V., Álvarez, M., Herráez, P., Anel, L., y De Paz, P. (2005). Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biology of Reproduction*, 72, 316-327.
- Maxwell, W.M.C. (1986). Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronized oestrus. Effect of time of onset of oestrus, ovulation and insemination on fertility. *Animal Reproduction Science*, 10, 301-308.
- Maxwell, W.M.C., Landers, A.J., y Evans, G. (1995). Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology*, 43, 1201 - 1210.
- Maxwell, W.M.C., Wilson, H.R., y Butler, L.G. (1984) Fertility of ewes after intrauterine insemination with frozen semen. *Animal Production in Australia*, 15, 448 –451.
- Maxwell, W.M.C. y Hewitt, L.J. (1986) A comparison of vaginal, cervical and intrauterine insemination of sheep. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)*, 106, 191 – 193.
- Maxwell, W.M.C. y Watson, P. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 42(1-4), 55-65.
- McCracken, J.A., Glew, M.E., y Scaramuzzi, R.J. (1970). Corpus luteum regression induced by prostaglandin F₂-alpha. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 30, 544-546.
- McMillan., W. H., y McDonald, M. F. (1985). Survival of fertilized ova from ewe lambs and adult ewes in the uteri of ewe lambs. *Animal Reproduction Science*, 8, 235-240.
- Mehraban, F., Mostafazadeh, M., Sadeghi, H., Azizi, A., Toori, M. A., Gramizadeh, B., ... Sadeghi, H. (2020). Anticancer activity of *Astragalus ovinus* against 7, 12 dimethyl benz (a) anthracene (DMBA)-induced breast cancer in rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 10(5), 533.
- Mejía, O., y María, P. (2010). Características reproductivas de los ovinos. En *Curso teórico-práctico técnicas de reproducción asistida en ovinos* (pp. 66-72). Guamo: Asociación de Ovinocultura.
- Menchaca, A., y Rubianes, E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction Fertility and Development*, 16, 403-413.

- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2021). *Anuario OPYPA 2021*. Montevideo: OPYPA.
- Montossi, F., San Julián, R., de Mattos, D., Berretta, E.J., Zamit, W., Levratto, J.C., y Ríos, M. (1998). *Impacto del manejo de la Condición Corporal al Parto sobre la productividad de ovejas Corriedale y Merino*. Recuperado de <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/7957/1/ST-102-185-193.pdf>.
- Morón-Cedillo, F. de J., Ochoa-Cordero, M. A., Trejo-González, A., y Díaz-Gómez, M.O. (2012). *Relación del peso y edad a la pubertad, desarrollo testicular y características seminales en corderos Rambouillet*. Recuperado de <http://132.248.9.34/hevila/Abanicoveterinario/2012/vol2/no2/1.pdf>
- Morrant, A.I., y Dunn, R.B. (1960). Artificial insemination of sheep II. Techniques and equipment used at Trangia Agricultural Experiment Station. *Australian Veterinary Journal*, 63(1), 1-7.
- Muiño, R., Fernández, H., Arean, H., Viana, J.L., Lopez, M., Femandez, A., y Peña, A.I. (2005). Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. *ITEA*, 101(3), 175-191.
- Muiño, R., Peña, A.I., Quintela, L.A., Becerra, J., Herradón, P., y González, F.H. (2015). Manejo del almacenamiento de esperma crio conservado en granjas de ganado lechero. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 31, 85–100.
- Nari, A., y Cardozo, H. (1987). Enfermedades causadas por los parásitos internos. Nematodos gastrointestinales. En J. Bonino Morlán, A. Durán del Campo, y J.J. Mari, *Enfermedades de los Laneros* (Vol. 1, pp. 1-155). Montevideo: Hemisferio Sur.
- Olivera Muzante, J., Fierro, S., López, V., y Gil, J. (2011). Comparison of prostaglandin and progesterone based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, 75, 1232-1238.
- Olivera Muzante, J., Gil, J., Fierro, S., Duran, G., y Alabart, J.L. (2007). *Pérdidas embrionarias entre el no retorno al servicio y la fertilidad a ecografía en ovinos bajo diferentes tecnologías de IA*. Recuperado de <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/10528/1/SAD-523p54-59.pdf>
- Ostrowski J.E.B. (1980). Teriogenología. *Temas sobre manejo reproductivo e inseminación artificial en bovinos y ovinos* (Vol. 1). Montevideo: Hemisferio Sur.
- Pineda, M.H. (1991). Reproducción del macho. En L.E. McDonald y L.H. Pineda, *Endocrinología veterinaria y reproducción* (4ª ed., pp. 253-293). México: Interamericana.
- Posado, R., Hernández, M., García, J.J., Bartolomé, D.J., López-Fernández, C., y Gosálvez, J. (2011). *Evolución de la fragmentación del ADN en semen criopreservado de toros de Lidia*. Recuperado de

https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-05922011000300031

- Raimundo, G. (1993). *Evaluación de la fertilidad de ovejas inseminadas por vía intrauterina con semen congelado / descongelado de diferentes calidades* (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias Agrarias, INTA, Balcarce.
- Ramón, M., Soler, A.J., Ortiz, J.A., García-Álvarez, O., y Maroto-Morales, A., Roldan, E.R.S., y Garde, J.J. (2013). Estructura de la población de espermatozoides y fertilidad masculina: un estudio intraespecífico del diseño y la velocidad del espermatozoides en el ciervo. *Biology of Reproduction*, 89,110.
- Roberts, E.M., y Hafez, E.S. (1969). Synchronization of estrus in cyclic merino ewes with vaginal sponges and pregnant mare serum. *American Journal of Veterinary Research*, 30, 207-210.
- Rodríguez, F.A., Ávila, C.O., Anchondo, A., Sánchez, B., y Jiménez, J.A. (2008). Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Agrociencia*, 42(4), 399-406.
- Rodríguez, O. (2004). *Evaluación de dos metodologías de inseminación artificial utilizando semen congelado con un tratamiento para la sincronización de celo en ovinos de la raza criolla colombiana* (Tesis de grado). Universidad de la Salle, Bogotá.
- Rodríguez-Martínez, H. (1999) Nuevas técnicas de evaluación de la fertilidad en el macho. En *II Congreso Ibérico de Reproducción Animal* (pp. 302-316). Recuperado de [https://books.google.com.uy/books?id=97rPdZOFzdgC&pg=PA100&lpg=PA100&dq=Rodr%C3%ADguez-Mart%C3%ADnez,+H.+\(1999\)+Nuevas+t%C3%A9cnicas+de+evaluaci%C3%B3n+de+la+fertilidad+en+el+macho.+II+Congreso+Ib%C3%A9rico+de+Reproducci%C3%B3n+Animal,+pp.:+302-316&source=bl&ots=ILQkw5j0eX&sig=ACfU3U2J2sr4NDwgpzcHmMUJhmzInRTUjA&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiwsumL3P32AhWbrZUCHbsmDLcQ6AF6BAgCEAM#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.uy/books?id=97rPdZOFzdgC&pg=PA100&lpg=PA100&dq=Rodr%C3%ADguez-Mart%C3%ADnez,+H.+(1999)+Nuevas+t%C3%A9cnicas+de+evaluaci%C3%B3n+de+la+fertilidad+en+el+macho.+II+Congreso+Ib%C3%A9rico+de+Reproducci%C3%B3n+Animal,+pp.:+302-316&source=bl&ots=ILQkw5j0eX&sig=ACfU3U2J2sr4NDwgpzcHmMUJhmzInRTUjA&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiwsumL3P32AhWbrZUCHbsmDLcQ6AF6BAgCEAM#v=onepage&q&f=false)
- Romero, O. (2015). Evaluación de la condición corporal y edad de los ovinos. *Informativo INIA (Chile)*, (79). Recuperado de <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/informativos/NR40188.pdf>.
- Salomon, S., y Maxwell, W.M.C. (1995). Almacenamiento congelado de semen de carnero, procesamiento, congelación, descongelación y fertilidad después de la inseminación cervical. *Animal ciencia*, 37, 185-249.
- Saltiel, A y Bustamante, G. (1995). Anatomía Funcional del aparato reproductor. En *Reproducción de animales domésticos*.(pp 17- 34). Mexico: Limusa.+++

- Scott, E.G. (1977). *The Sheepman's Production handbook* (2ª ed.). Denver: Sheep Industry Development Program.
- Secretariado Uruguayo de la Lana. (2020a). Importancia de la ecografía en el manejo preparto. *Ovinos notas prácticas*. Recuperado de <https://www.sul.org.uy/descargas/hojas/7-Manejo.pdf>.
- Secretariado Uruguayo de la Lana. (2020b). *Inicio de la producción ovina en el Uruguay*. Recuperado de <https://www.sul.org.uy/noticias/416>
- Silva, V., y Fassana, F. (2017). *Evaluación de semen en corderos, borregos y carneros Merino Australiano a campo y en equipo computarizado de análisis de semen* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Udelar. Montevideo.
- Simonetti, L., Lynch, G.M., y McCormick, M. (2014). Factores que inciden sobre la capacidad reproductiva, Aspectos reproductivos de los carneros. *Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental*, 1(1) 15-20. Recuperado de <http://revistafcaunlz.gramaweb.com.ar/wp-content/uploads/2014/07/aspectos-reproductivos.pdf>
- Stornelli, M.A., y De la Sota, R.L. (2006). Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. *Analecta Veterinaria*, 25(2), 29-38.
- Thienpont, D., Rochette, F., y Vanparijs, O. (1986). *Diagnosing helminthiasis by coprological examination* (2ª ed.). Beerse: Janssen Research Foundation.
- Thundathil, J., Palasz, A., Barth, A.D., y Mapletoft, R. (2002). Plasma membrane and acrosomal integrity in bovine spermatozoa with the knobbed acrosome defecto. *Theriogenology*, 58(1), 87-102.
- Tvrda, E., Kňazická, Z., Bárdos, L., Massányi, P., y Lukáč, N. (2011). Impact of oxidative stress on male fertility—A review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 59(4), 465-484.
- Ungerfeld, R. (2002). *Reproducción en Animales Domésticos* (Vol. 1). Montevideo: Melivea.
- Vignau, M.L., Venturini, L.M., Romero, G.R., Eiras, D.F., y Baso, W.U. (2005). Técnicas de diagnóstico. En *Parasitología práctica y modelos de enfermedades parasitarias en los animales domésticos* (pp. 155-184). La plata: UNLP.
- Yaniz, J., Gosálvez, J., Lopez, C., Silvestre, M., y Santolaria, P. (2015). *Efecto de la composición del diluyente sobre la dinámica de la fragmentación del ADN espermático y otros parámetros de calidad del espermatozoa durante la incubación a 37 °C*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/279313618_Effect_of_diluent_composition_on_the_dynamics_of_sperm_DNA_fragmentation_and_other_sperm_quality_parameters_in_ram_during_incubation_at_37_C

