



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**ADMINISTRACIÓN DE CARBETOCINA ANTES DE LA COLECCIÓN DE SEMEN EN
TOROS: EFECTOS SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN FRESCO Y LA
CRIORESISTENCIA ESPERMÁTICA**

por

**Joaquín GAMARRA CARLIS
Maresia MORAES BENINCA**

**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
2023**

PÁGINA DE APROBACIÓN

TESIS DE GRADO APROBADA POR:

PRESIDENTE DE MESA:



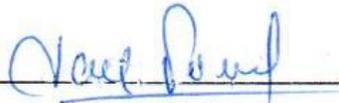
Isabel Vázquez

SEGUNDO MIEMBRO (TUTOR):



Rodolfo Ungerfeld

TERCER MIEMBRO:



Yael Filipiak

CUARTO MIEMBRO (CO-TUTOR):



Andrea Pinczak

QUINTO MIEMBRO (CO-TUTOR):

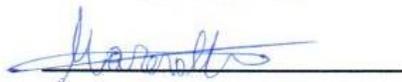


Juan Carlos Orihuela

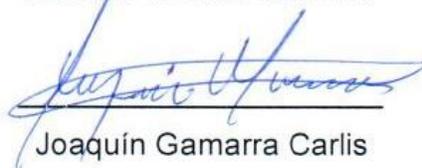
FECHA:

24/08/2023

AUTORES:



Maresia Moraes Beninca



Joaquín Gamarra Carlis

AGRADECIMIENTOS

En estos párrafos queremos agradecer a aquellas personas que directa o indirectamente fueron parte, tanto de nuestra vida estudiantil como de este proyecto.

A la Dra. Andrea Pinczak, por ofrecernos este experimento y ayudar a realizar nuestro trabajo de tesis.

Al establecimiento La Magdalena por abrirnos las puertas de su casa para realizar el trabajo práctico, brindarnos los animales y las instalaciones. A su equipo, un especial agradecimiento al Dr. Antonio Ferres por su buena predisposición y apoyo en todo momento y al personal por ayudarnos en cada instancia práctica.

A nuestro tutor Dr. Rodolfo Ungerfeld por hacernos parte de este proyecto, por ayudarnos en esta etapa de aprendizaje e investigación y por estar siempre a disposición.

A nuestro co-tutor Dr. Juan Carlos Orihuela.

Un agradecimiento al equipo de la Unidad Académica de Fisiología de la Facultad de Veterinaria, por la colaboración.

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

Por último, a nuestra querida Facultad de Veterinaria (UDELAR), que nos ha dado la oportunidad de formarnos como profesionales con las herramientas y conocimientos, tanto con valores y ética profesional.

RESUMEN

La vagina artificial es el método de obtención de semen menos estresante y más similar a la eyaculación fisiológica, aunque requiere de instalaciones apropiadas y animales entrenados. El método alternativo es la electroeyaculación (EE), que se usa para la evaluación de la calidad seminal de toros, es fácil y segura de aplicar. Se ha estudiado el uso de oxitocina previo a la EE, resultando en un aumento en el número de espermatozoides en el eyaculado. La desventaja de la oxitocina es su corta vida media, por lo que, el objetivo del presente trabajo fue determinar si la administración de un análogo de oxitocina de larga acción (carbetocina) mejora la calidad del semen colectado y la crioresistencia espermática. Se utilizaron 12 toros de la raza Bradford, realizando 2 colectas por animal, con un intervalo de 4 días entre la primera y la segunda. Se administró carbetocina a 6 toros en la primera colecta y a los 6 restantes en la segunda de forma aleatoria, la hormona fue administrada 15 minutos previo a la EE, por vía intramuscular a una dosis de 0,2 mg/100 kg. Una vez obtenida la muestra se evaluó el semen fresco (registrando volumen, concentración, motilidad de masa y vigor). Además, se fijaron 10 μ l en formol citrato para la evaluación morfológica de los espermatozoides y para la evaluación de la integridad de membrana espermática se utilizó la prueba HOST. A partir de esto, se calculó la cantidad total de espermatozoides eyaculados, espermatozoides móviles, con membrana funcional y con morfología normal. Previo al proceso de criopreservación se aplicó diluyente y se criopreservó sobre vapores de nitrógeno líquido. Luego del descongelado se realizó la evaluación objetiva del semen utilizando el sistema ISAS, se registró el porcentaje de espermatozoides estáticos, con motilidad progresiva, no progresiva y sus velocidades: curvilínea, rectilínea y promedio. Los animales tratados con carbetocina eyacularon una mayor cantidad de espermatozoides con membrana funcional íntegra ($P=0,05$) y hubo una tendencia a aumentar la cantidad total de espermatozoides morfológicamente normales ($P=0,08$). No se generaron cambios en el volumen, concentración, motilidad y vigor. Tampoco se observaron diferencias en el semen del grupo tratado y grupo control posterior a la criopreservación. La administración de carbetocina 15

minutos previo a la electroeyaculación produjo un aumento en la cantidad total de espermatozoides con membrana funcional íntegra, aumentando también la cantidad total de espermatozoides morfológicamente normales. No se generaron efectos negativos sobre otras variables evaluadas en el semen fresco ni criopreservado.

La calidad del semen no se vio afectada luego de la criopreservación descongelación, siendo apto para utilizar en planes de inseminación artificial y colecta de semen.

SUMMARY

The artificial vagina is the least stressful method and the most similar one to physiological ejaculation, although it requires appropriate facilities and trained animals. The alternative method is the electroejaculation EE, which is used for the evaluation of bulls which is easy and safe to apply. The use of oxytocin before EE has been studied, resulting in an increase in the number of spermatozoa in the ejaculation. The disadvantage of oxytocin is its short half-life, because of that, the objective of this study was to determine if the administration of a long-acting oxytocin analogue (carbetocin) improves the quality of collected semen and sperm cryoresistance. 12 bulls of the Braford breed were used, making 2 collections. In the first collection carbetocin was administered to 6 bulls and to the remaining 6 in the second. The hormone was given 15 minutes before EE, intramuscularly at a dose of 0.2 mg/100 kg. Once the sample was obtained, the fresh semen was evaluated (recording volume, concentration, mass motility and vigor). In addition, 10 μ l were fixed in formaldehyde citrate for the morphological evaluation of the spermatozoa and for the evaluation of the integrity of the spermatic membrane where we used the HOST test. After that, the total amount of ejaculated spermatozoa was calculated as well as motile spermatozoa, with functional membrane and with normal morphology. Before freezing it some diluent was applied and it was frozen over liquid nitrogen vapors. After thawing, the objective evaluation of the semen was carried out using the ISAS system, the percentage of static spermatozoa was recorded with progressive and non-progressive motility, and their velocities: curvilinear, rectilinear and average.

Animals treated with carbetocin ejaculated a greater number of fully functional membrane spermatozoa ($P=0,05$) and there was a tendency to increase the total number of morphologically normal spermatozoa ($P=0,08$). No changes were generated in volume, also in concentration, motility and vigor. There were no differences observed in the semen of the treated group and the control group after cryopreservation. In conclusion, the administration of carbetocin 15 minutes prior to electroejaculation produced an increase in the total number of spermatozoa with intact

functional membranes, probably also increasing the total number of morphologically normal spermatozoa. No negative effects were generated on other variables evaluated in fresh or thawed semen. Semen quality was not affected after freezing and thawing, being suitable for use in artificial insemination and semen collection plans.

TABLA DE CONTENIDOS

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
RESUMEN.....	4
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN	10
REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	12
Anatomía del aparato reproductor del toro	12
Escroto:	12
Testículos:	13
Epidídimos:	13
Conductos deferentes:.....	13
Glándulas accesorias:.....	13
Pene:	13
Principales hormonas que intervienen en la fisiología de la reproducción	14
Técnicas de colección de semen.....	15
Composición y evaluación del semen.....	16
Definición y composición.....	16
Olor.....	16
Color	17
Volumen	17
Ph	18
Volumen	19
Concentración.....	19
Motilidad	19
Morfología.....	21

Integridad funcional de la membrana espermática	23
Cópula y eyaculado	23
Carbetocina	26
HIPOTESIS.....	27
OBJETIVOS.....	27
MATERIALES Y METODOS	28
Animales y su manejo	28
Tratamientos experimentales	28
Metodología de electro eyaculación	28
Evaluación de semen fresco.....	29
Evaluación objetiva de semen congelado	30
Análisis estadístico	31
RESULTADOS.....	32
DISCUSION	34
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFIA.....	37

INTRODUCCIÓN

Algunas biotecnologías aplicadas en reproducción animal requieren de la colecta de semen y su crioconservación. La colecta de semen requiere de metodologías que sean sencillas y seguras de aplicar, que no afecten el bienestar de los animales, que permitan coleccionar semen de buena calidad y que resista a los procesos de criopreservación.

Entre las técnicas más utilizadas actualmente para la colecta de semen en bovinos están el uso de la vagina artificial (VA) y la electroeyaculación (EE). El uso de la VA es el método menos estresante y más similar a la eyaculación fisiológica (Sylla, Palombi, Stradaoli, Vagniluca, y Monaci, 2015), aunque requiere de instalaciones apropiadas, de animales dóciles y que estén previamente entrenados (Arieta, Fernández, y Menchaca, 2014). El método alternativo mayormente empleado es la EE, que se usa frecuentemente para la evaluación del estado reproductivo de los toros (Whitlock, Coffman, Coetzee, y Daniel, 2012). A su vez, la EE es muy fácil y segura de aplicar, permite la protrusión del pene, lo que mejora tanto la capacidad de observar la anatomía del mismo como la calidad del semen coleccionado (Palmer, 2005).

Se ha estudiado el uso de hormonas en combinación con la EE, un ejemplo es la oxitocina. Cuando se administra oxitocina previo a la EE se reduce el tiempo de estimulación necesario para obtener la emisión de semen (Palmer, Amundson, Brito, Waldner, y Barth, 2004). La oxitocina estimula las contracciones del músculo liso del epidídimo y las glándulas sexuales accesorias, aumentando el pasaje de espermatozoides de la cola del epidídimo al conducto deferente (Da Silva Souza, 1975; Hib, 1974, 1977), por lo que resulta en un aumento del número de espermatozoides en el eyaculado de toros coleccionados con VA (Milovanov, Bereznev, y Gorohov, 1962) o por EE (Berndtson y Igboeli, 1988). Sin embargo, la oxitocina es una hormona que se metaboliza muy rápido. Palmer *et al.*, (2004) plantearon que, si bien la duración de la EE se reduce después del tratamiento con oxitocina, esto de por sí solo no sería suficiente para justificar su uso, lo que probablemente se deba a que la vida media en sangre de la oxitocina es

muy corta, de 2 a 3 min (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios España, 2017).

Un análogo de la oxitocina que no se metaboliza tan rápidamente en el organismo es la carbetocina, lo que se debe a su gran resistencia a las peptidasas y su poder lipofílico generando que su degradación sea muy lenta en el organismo (6-7 h) lo que le confiere una eficacia prolongada (Calier Argentina, 2021). Por tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar si la administración de carbetocina antes de la electroeyaculación en toros mejora la calidad del semen colectado y la crioresistencia espermática del mismo. Este análogo podría permitir mayor flexibilidad en los tiempos de colecta de semen.

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

Anatomía del aparato reproductor del toro

Los componentes fundamentales del aparato reproductor del toro son: el escroto, los testículos, los epidídimos, los conductos deferentes, las glándulas accesorias y el pene (Figura 1).

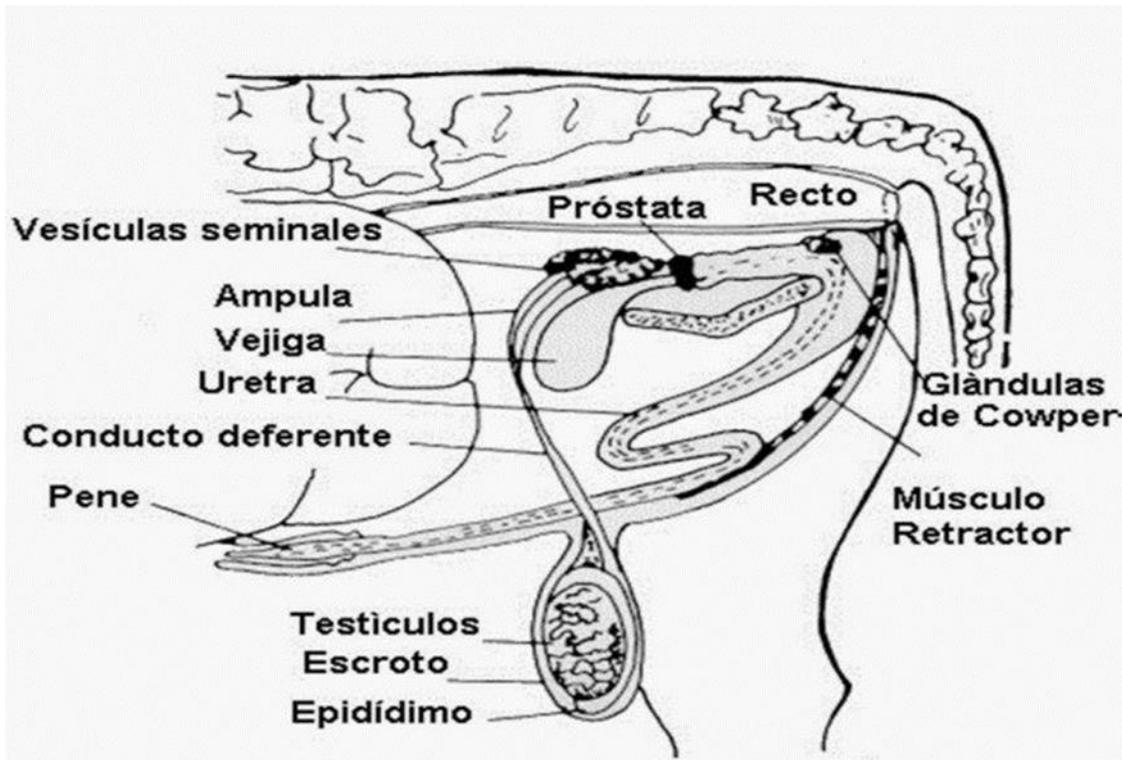


Figura 1-Órganos genitales del toro (Tomado de IRAC, 2020).

Escroto: bolsa ovoide de piel, ubicada en la parte caudal del abdomen, entre la ingle y el periné. Cada testículo y su epidídimo van suspendidos separadamente dentro del escroto por un cordón espermático y estructuras con el conducto deferente y los vasos y nervios correspondientes encerrados en una doble cubierta de peritoneo. Se encuentra en posición vertical con respecto al abdomen. El escroto junto con los músculos

cremáster y el plexo pampiniforme juegan un rol importante en la termorregulación testicular (Dyce, Sack, y Wensing, 1999).

Testículos: los testículos de los rumiantes son elipsoides, alargados y grandes, y penden casi verticalmente dentro del escroto donde se los puede palpar. Los testículos básicamente tienen una función gametogénica y endócrina (Dyce *et al.*, 1999; Hafez, 1996 y Robles 2004).

Epidídimos: son órganos tubulares que nacen del polo dorsal de cada testículo, a partir de los conductos eferentes. Se lo divide en tres partes tanto anatómica como funcionalmente: la cabeza, el cuerpo y la cola (Salisbury, 1978), de donde se continua con el conducto deferente. Las funciones del epidídimo son: transporte, maduración y almacenamiento de los espermatozoides (Hafez, 1996; Robles, 2004; Schoenian, 2006), adquiriendo la capacidad motil durante el tránsito por el epidídimo.

Conductos deferentes: los conductos deferentes se originan en la cola del epidídimo, que luego se hace recto en su camino hacia el abdomen, recorre el borde posterior del cordón espermático y luego pasa a través del canal inguinal para llegar a colocarse lateralmente a la vejiga. Llevan el esperma desde el epidídimo hasta la uretra durante la eyaculación (Dyce *et al.*, 1999).

Glándulas accesorias: la glándulas accesorias o también denominados órganos genitales internos comprenden las glándulas vesiculares, las ampollas del deferente, la próstata, las glándulas bulbo-uretrales (Arthur *et al.*, 1991). Producen parte del líquido o plasma seminal, que son secreciones ricas en sustancias nutritivas como fructosa, proteínas, iones, sustancias buffer, hormonas y enzimas.

Pene: El pene del toro adulto mide casi un metro de longitud, pero una cuarta parte de esto corresponde a la flexura sigmoidea ó "S" peneana que está encima y detrás del escroto. Al ser

de tipo fibroelástico es relativamente rígido aun no estando en erección. Su función es depositar el semen en el tracto reproductivo de la hembra (Dyce *et al.*, 1999).

Principales hormonas que intervienen en la fisiología de la reproducción

El proceso de espermatogénesis se encuentra bajo control endócrino. Las principales glándulas implicadas son el Hipotálamo, la Hipófisis y los testículos (Salisbury, 1978). El funcionamiento testicular requiere de estimulación hormonal por gonadotropinas adenohipofisarias, las cuales son controladas por la secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) producida por el Hipotálamo (Hafez, 2002). La GnRH llega en altas concentraciones a la adenohipófisis donde determina que las células gonadotropas liberen LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona folículo estimulante). Tanto la LH como la FSH regulan la producción de gametos y de hormonas testiculares (Ungerfeld, 2002). A su vez, los andrógenos (testosterona principalmente) son muy importantes en el macho, regulando tanto la proliferación como la maduración funcional de gametos masculinos (Centola *et al.*, 2020), además de que también son los responsables de desarrollar las características secundarias corporales (Cunningham, 2003), y modulan la conducta sexual y agresiva del macho (Nelson y Chiavegatto, 2001). Las células de Sertoli también producen inhibina, una hormona proteica que tiene un efecto supresor en la secreción de FSH.

Técnicas de obtención de semen

Los tres métodos principalmente empleados para la obtención de semen en toros son VA, EE y MR (masaje rectal). La VA es un método bastante similar a la vagina de las hembras por tener dimensiones, temperatura y humedad semejantes. El macho eyacula previa desviación del pene para que penetre en la VA. Es aconsejable excitar previamente al toro con vacas en celo para obtener un buen volumen de eyaculado. En cuanto a la frecuencia de colecta de semen, se pueden obtener tres o inclusive cuatro eyaculados diarios, con un intervalo de 10 a 15 minutos del anterior. La obtención de semen por VA también permite la observación de la conducta sexual y el apareamiento (Barth, 2004), aunque tiene el inconveniente de requerir el entrenamiento previo de los animales (Wulster-Radcliffe, 2001), por lo que en algunas situaciones no es práctica, además de que algunos animales nunca se adaptan a esta técnica. Por otra parte, los pequeños rumiantes, como los caprinos u ovinos, presentan una actividad comportamental sexual muy baja durante la época no reproductiva en países con latitudes altas o intermedias (Chemineau *et al.*, 2008), lo que limita la obtención de semen mediante VA.

El método alternativo más usualmente empleado es la EE, para lo que se usa un electroeyaculador, que consiste en un vástago conectado a una batería que genera estimulaciones eléctricas rítmicas provocadas por descargas no mayores a 20 voltios (Rangel, 2007). Los electroeyaculadores están diseñados para estimular los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos con pulsos de bajo voltaje y amperaje y de esta forma pueden inducir erección peneana y eyaculación. La técnica de EE consiste en dar pulsos eléctricos muy leves en la próstata y vesículas seminales, y la musculatura de la región para generar erección peneana y eyaculación (Cancino, 2009; Duarte, 2008). Cabe destacar que antes de la utilización del electroeyaculador se procede a la preparación del animal, lo cual incluye, recortar los pelos del orificio prepucial y limpiarlo, si es necesario se debe lavar y secar cuidadosamente el área. Se procede a limpiar el recto y a estimular mediante masaje transrectal las glándulas accesorias

(glándulas vesiculares y ampollas de los conductos deferentes), y posteriormente, se introduce el electrodo (Morillo *et al.*, 2012). La EE permite la colecta de semen en animales no entrenados, pre-púberes (Damián, 2015; Ungerfeld y González-Pensado, 2008), durante la estación no reproductiva, o en especies salvajes (Santiago-Moreno, 2009, 2011, 2013). Por lo tanto, la EE elimina la influencia del comportamiento sexual sobre la colecta de semen y no requiere demasiado entrenamiento previo del operador, todo lo que la vuelve muy práctica en ganadería y determina que, por ejemplo, se la use frecuentemente en evaluaciones andrológicas. Otra ventaja de la EE es que permite la obtención de material seminal de toros que no pueden efectuar la monta o de aquellos que por alguna razón no realizan el salto natural o no admiten la vagina artificial.

Composición y evaluación del semen

Definición y composición

El semen es la suspensión líquida que contiene los espermatozoides y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor. La porción líquida de dicha suspensión se conoce como plasma seminal (Hafez, 2002). Por lo tanto, el semen es una combinación de las secreciones de los testículos, las vías de conducción y de las secreciones de las glándulas accesorias, a medida que los espermatozoides van pasando por los conductos excretores se le van adicionando las secreciones de los conductos y glándulas accesorias (Bloom-Fawcett, 1968).

Características del semen

Olor

El olor natural es bastante característico de cada especie animal y en general no es muy intenso. El semen puede tomar un olor urinoso si se encuentra mezclado con orina, y un olor más o menos intensamente alterado, de putrefacción, cuando se mezcla con productos purulentos (Bonadonna, 1989).

Color

En general el semen es de color blanco cremoso, que más o menos tiende al tono marfil, en relación con la cantidad de espermatozoides contenidos. La mayoría de toros tienen un semen de color y aspecto blanco lechoso variando hacia un color crema, aunque algo más del 10% producen un semen que es normalmente amarillo (Corneo 1940). Según Kaemmerer y Kramoitz (1955), el tono amarillo del semen de toro y de macho cabrío se debe a la riboflavina contenida en las secreciones de las glándulas vesiculares, cuya presencia varía con la raza, alimentación y con el individuo. En ocasiones el semen es de color verdoso, lo cual indica la existencia de procesos necrotizantes, de carácter purulento, causados por algún órgano del aparato genital masculino. El semen puede estar coloreado de rojo vivo por la presencia de sangre cuando hay heridas recientes en el prepucio, el glande o la uretra, a menudo producidas durante la colecta artificial de semen (Bonadonna, 1989).

Volumen

El volumen del eyaculado varía con cada toro, dependiendo principalmente de la edad. En general el volumen aumenta con la edad y el tamaño corporal del toro y se modifica con su salud y vigor reproductor y con la frecuencia de servicios. Los toros jóvenes, inmediatamente de su entrada en servicio, producen solamente 1 a 2 mL o menos en cada eyaculado, mientras que los toros totalmente desarrollados y vigorosos pueden llegar a producir 10 a 15 mL en cada eyaculado (Salisbury *et al.*, 1978).

El régimen sexual tiene una importancia concreta, donde la notable hiperexcitación durante la época de servicios a veces hace aumentar el volumen del eyaculado. También el estímulo precoital prolongado favorece el aumento volumétrico (Roberts, 1979). Se toman como parámetros normales para volumen valores de entre 4 y 10 mL (Cavestany, 1994).

Densidad y viscosidad

Los datos de Allard (1947) indican una correlación positiva de densidad con la concentración de células espermáticas, el mismo sentido la viscosidad aumenta con el incremento de la concentración de células espermáticas (Salisbury *et al.*, 1978).

pH

La mayoría de las muestras seminales normales están cerca de la neutralidad con una pequeña tendencia a la acidez, variando entre un pH de 6,5 a 6,9, pudiendo estar en un rango que va desde menos de 6 hasta un máximo de 8, o levemente por encima de este valor. El semen de buena calidad es usualmente más ácido (pH menor) que las muestras de semen con baja concentración de espermatozoides. Normalmente el semen de calidad pobre contiene proporcionalmente más contenido de fluido proveniente de las glándulas uretrales y accesorias (Salisbury *et al.*, 1978).

Evaluación del semen

Para poder fecundar, un espermatozoide debe estar vivo, ser mótil y tener una morfología normal. Estas son características importantes que conforman el componente compensable de la calidad seminal. Luego de haber obtenido un eyaculado normal, se le puede realizar y de manera satisfactoria, un correcto examen de calidad de semen. La evaluación del semen es indicio de fertilidad, pero no prueba de ella (Roberts, 1979). Una vez realizada la colecta de semen, posteriormente a recibir la copa, el tubo o la bolsa de polietileno protegida de la luz solar y el shock térmico, se le realizan ciertos controles macroscópicos y microscópicos. Se evalúa el volumen, aspecto/color, pH, presencia de sustancias extrañas, concentración espermática, motilidad masal e individual, vigor espermático, morfología espermática, entre los principales.

Volumen

Es común esperar de toros jóvenes y sin experiencia volúmenes relativamente bajos, entre 2 y 4 mL (Cuenca *et al.*, 1986).

Aspecto/Color

Las variaciones de color y aspecto están dadas por la concentración espermática o por elementos extraños como sangre, pus, orina, pelos o pigmentos (Cuenca *et al.*, 1986).

Cuadro 1- Evaluación subjetiva de la densidad seminal mediante el aspecto del eyaculado.

Aspecto	Densidad (espermatozoides/mm ³)
Cre moso	1.000.000
Le choso	de 500.000 - 800.000
Aguachento	de 100.000 - 300.000

Cuenca, (1986).

Concentración espermática

Se correlaciona con la densidad y con el aspecto/color. Se puede medir mediante evaluación subjetiva tal como se expone en el cuadro 1, también por medio de un espermodensímetro de Karras o evaluación objetiva por medio de cámaras de Neubaüer, Makler o mediante un fotómetro (Gil *et al.*, 2000).

Motilidad

Motilidad masal: es un dato subjetivo que se refiere a la motilidad de la masa como resultado del movimiento conjunto de los espermatozoides. Es particularmente evidente en el semen rico en elementos celulares vivos y activos y se lo puede evaluar poniéndolo a contraluz. Sin embargo, la aparente escasez de actividad masiva no es un elemento suficiente para juzgar que determinado semen es menos bueno que otros (Bonadonna, 1989). En el eyaculado de los rumiantes, dada su elevada concentración espermática en un relativamente escaso volumen, se

puede valorar la motilidad masal, definida como movimientos en ondas y/o remolinos del total de espermatozoides de la muestra, al observarlo en un microscopio a poco aumento (Bonadonna, 1989).

Motilidad individual: la motilidad del semen es una de las características más importantes asociadas a la capacidad fecundante del mismo y por muchos años se ha reconocido como esencial para el transporte de espermatozoides y la fecundación en el tracto reproductor femenino (Januskauskas, 1999; Verstegen, 2002).

La evaluación, que es subjetiva, consiste en colocar una gota con cubreobjeto y se observa en el microscopio a poco aumento. Se utiliza una escala apropiada (Bonadonna, 1989) y se evalúa la proporción de espermatozoides que poseen un movimiento progresivo, rectilíneo y uniforme, caudocefálico, prácticamente en línea recta (normal).

Movimiento anormal:

1) Movimiento rotatorio o circular: el espermatozoide describe círculos concéntricos con diámetro aproximado a su propia longitud. Por lo general este tipo de movimiento se ve cuando el ambiente biofísico y bioquímico está alterado, por lo cual su aparición demuestra una condición vital desfavorable, normalmente irreversible (Bonadonna, 1989).

2) Movimiento oscilatorio: el espermatozoide se mueve en sentido latero-lateral, sin avanzar. Este movimiento es frecuente en dos casos: en la fase de revitalización inicial del estado dinámico que estaba adormecida (conservación en frío); o bien condiciones ambientales desfavorables (ej., anabiosis por hambre, pH no óptimo, etc.) (Bonadonna, 1989).

3) De retroceso: lo presentan los espermatozoides cuyas colas se encuentran enroscadas sobre sí mismas. En general los movimientos de retroceso son rápidos o rapidísimos; a veces se establece alternándose con movimientos de quietud más o menos prolongados. Dicho movimiento está vinculado con una malformación caudal que no excluye la simultánea lesión

cefálica, y por lo tanto los espermatozoides con esta cinética deben considerarse en estado de irreversibilidad (Bonadonna, 1989).

Otro método para la evaluación de la motilidad individual es mediante el sistema CASA. Desde los 80, los sistemas CASA (por sus siglas en inglés: computer assisted sperm analysis) se han ido perfeccionando y modernizando. El sistema CASA consta de varias unidades independientes: un microscopio de contraste de fase conectado a una cámara de vídeo, que envía la imagen desde el microscopio a un monitor de TV. Posteriormente, la imagen es enviada a un ordenador, de donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías seriadas de cada 26 campos microscópicos seleccionados, normalmente en menos de un segundo. El software discrimina a los espermatozoides de otras partículas que pueden aparecer en la imagen por su tamaño, y analiza la trayectoria de recorrido por cada espermatozoide individual durante esa fracción de segundos. Al final del proceso el CASA proporciona una serie de datos relativos a la velocidad y trayectoria de cada espermatozoide individual, con lo que permite obtener información precisa, objetiva y repetible, sobre el porcentaje de células móviles presentes en la muestra, y la calidad media de ese movimiento. Pero además permite identificar la existencia de subpoblaciones de espermatozoides con distintos patrones de movimiento que coexisten en la misma muestra de semen, lo cual es una visión más real que la motilidad media de la muestra, puesto que una muestra de semen contiene una población heterogénea de espermatozoides. Esto explica, al menos en parte, que no se haya observado correlación entre parámetros medios y la fertilidad in vivo de una dosis seminal (Holt y Van Look, 2004).

Morfología espermática

Las anomalías espermáticas en el semen de toro tienen un importante efecto negativo sobre la fertilidad. La morfología de los espermatozoides refleja la salud de los túbulos seminíferos y hasta cierto punto, la del epidídimo. El semen eyaculado culmina su pasaje por los túbulos seminíferos hasta dos semanas antes, además el proceso de formación de

espermatozoides se lleva a cabo durante un periodo que entorna los 60 días antes de la espermiación, por lo tanto, las anomalías encontradas podrían reflejar alteraciones en la función testicular que ocurrieron hace algún tiempo ya (Freneau, 2010). Generalmente se acepta que el semen del toro clasificado como satisfactorio debería contener al menos 70% de espermatozoides morfológicamente normales, con no más del 20% de espermatozoides con anormalidades de cabeza (Menon *et al.*, 2011).

Las anormalidades en espermatozoide se pueden clasificar por la ubicación del defecto, el que se puede encontrar en cabeza, pieza intermedia o cola (Menon *et al.*, 2011), o por su lugar de origen primario: testículo; secundaria: epidídimo; terciario: glándulas accesorias / post-eyaculación (Menon, *et al.*, 2011).

Los defectos principales incluyen la mayoría de las anormalidades de la cabeza y pieza intermedia, gotas citoplasmáticas proximales y anormalidades individuales presentes en un alto porcentaje, mientras que los defectos de menor importancia incluyen bucle colas, cabezas separadas o sueltas y gotas citoplasmáticas distales (Menon *et al.*, 2010).

Las anomalías de la pieza intermedia y de la cola generalmente surgen como defectos de la espermatogénesis y espermatozoides con tales anomalías son o no son motiles o tienen motilidad anormal. Por consiguiente, la presencia de tales anomalías generalmente se asocia con subfertilidad. Una gota proximal citoplasmática se considera un defecto de la espermatogénesis y un alto porcentaje de espermatozoides afectados con gotas proximales citoplasmáticas tienen resultado o se reflejan en los problemas de fertilidad (Menon *et al.*, 2010).

Anomalías como las colas enrolladas o los plegamientos de la pieza intermedia, si son abundantes en el eyaculado, pueden comprometer la fertilidad del toro, ya que los espermatozoides defectuosos no poseen una motilidad normal, y por tanto no van a poder alcanzar las proximidades del ovocito.

Integridad funcional de la membrana espermática

La prueba de hinchazón hipoosmótica (HOST, por sus siglas en inglés: hypo-osmotic swelling test) se introdujo por primera vez en 1984 para evaluar la integridad (Jeyendran, Van der Ven, Perez-Pelaez, Crabo y Zaneveld, 1984) funcional de la membrana espermática. En esta técnica, los espermatozoides se incuban en una solución hipoosmótica (preparada a partir de cloruro de sodio o citrato de sodio y fructosa) que induce la inflamación flagelar en células con una membrana celular intacta. Esta hinchazón es causada por una entrada de fluidos que se produce a través de una membrana morfológica y fisiológicamente sana. Esta evaluación es importante, ya que la criopreservación implica estrés osmótico en los espermatozoides al igual que la formación o remodelación de hielo intracelular (Dorado *et al.*, 2011). Cuando la temperatura desciende por debajo del punto de congelación, se forman cristales de hielo. El agua extracelular se cristaliza, dejando así los solutos restantes con una mayor concentración de iones (Pena, 2006). Se genera un importante gradiente osmótico a través de la membrana de la célula espermática (Petrunkina *et al.*, 2004) que da como resultado una salida de agua del espermatozoide. Los espermatozoides se encogen debido a la deshidratación. Para resistir estos desafíos osmóticos, las membranas funcionales de los espermatozoides pueden regular los cambios de volumen mediante la modulación de las concentraciones de iones intracelulares (Jeyendran *et al.*, 1984).

Cópula y eyaculado

Una vez que una hembra receptiva se encuentra con un macho en condiciones de completar la monta comienza el comportamiento de cópula, el cual está controlado por el sistema nervioso autónomo, los nervios somáticos, y el sistema endócrino (Arai, 2002; Fraser, 1992; Kihara, 2002). Las neuronas motoras que inervan los órganos pélvicos implicados en la cópula y en los episodios de erección y eyaculación están controlados por circuitos de neuronas que se localizan en los núcleos dorsomedial y dorsolateral de las regiones lumbar y sacra de la médula espinal

(Cottrell, Iggo y Kitchell, 1978; Kirk, Kitchell y Carr, 1987). El órgano copulador del macho es el pene, cuya erección es desencadenada por un estímulo neural iniciado por estimulación táctil, por estímulos visuales o ambientales. La erección del pene requiere vasodilatación dentro del mismo, lo que resulta en un incremento del flujo sanguíneo hacia el pene. Esta vasodilatación es producida por la liberación de acetilcolina por el sistema nervioso parasimpático, la que actúa sobre las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos secretando así óxido nítrico, que es el responsable de actuar sobre el músculo liso vascular y así producir la vasodilatación (Frandsen *et al.*, 1965).

La eyaculación consiste en la salida del semen por el orificio uretral debido a las contracciones de la musculatura pélvica y el peristaltismo uretral. Es un reflejo complejo que consta de dos fases distintas: emisión y expulsión o salida del semen (Hellstrom, 2006). La fase de emisión resulta de la liberación de espermatozoides y líquidos de las glándulas accesorias hacia la uretra como resultado de un reflejo toracolumbar mediado por el sistema simpático que lleva a la contracción del músculo liso del conducto deferente y de las glándulas accesorias (Klein, 2014). La fase de expulsión es la salida del semen desde la uretra, generada por un reflejo parasimpático que produce contracciones en los músculos bulboesponjoso, isquiocavernoso y uretral (Klein, 2014). También se asocia con las contracciones del epidídimo y del conducto deferente (Frandsen *et al.*, 1965). Además de conducción, el deferente es un órgano de reserva (Amman, 1981), siendo un órgano inicialmente tubular que se continúa con la ampolla del deferente, principal secretor de compuestos que integran al plasma seminal (Ungerfeld *et al.*, 2002). Las glándulas anexas vuelcan su secreción en la uretra, suministrando un vehículo líquido isoosmolar para el transporte durante la eyaculación (Garner y Hafez, 1987; Mann, 1974). La fructosa aportada por las ampollas es el sustrato energético exógeno más abundante (Garner y Hafez, 1987; Mann, 1974).

Rol de la oxitocina en la eyaculación

La oxitocina es secretada principalmente por el hipotálamo y liberada al torrente sanguíneo desde la neurohipófisis (Brownstein, 1980; Thackare, 2006). Además, también es secretada a nivel local por las gónadas (Wathes, 1984). La oxitocina se ha implicado en la regulación de casi todos los aspectos de la reproducción y las interacciones entre animales, incluida la expresión del comportamiento sexual (Maina y Katz, 1999) y conductas de cortejo. Aunque la mayoría de los estudios que investigan el efecto de la oxitocina en el comportamiento sexual masculino se han realizado con roedores, la liberación de oxitocina en la circulación sistémica durante la actividad sexual masculina se ha medido e informado en una variedad de especies, incluidos los ovinos y bovinos (Sharma y Hays, 1973).

La oxitocina estimula las contracciones del músculo liso de las células del epidídimo, conducto deferente y la ampolla del vaso deferente, y por tanto el transporte del material espermático (Nicholson, 1999; Whittington, 2001), lo que permite aumentar el volumen de semen colectado, la motilidad masal, y la motilidad espermática (Bozkurt, 2007), esto se explica gracias a que la oxitocina está involucrada en la estimulación de las glándulas anexas, principalmente la próstata y la expulsión resultante de secreción prostática en el eyaculado (Da Silva e Souza, 1975; Gimpl y Fahrenholz, 2001; Thackare, 2006). En diversos trabajos administraron oxitocina antes de la colecta de semen, obteniendo como resultado una mayor producción de semen en carneros (Bozkurt, 2007; Nicholson, 1999), búfalos (Ibrahim, 1988), toros (Berndtson e Igboeli, 1988; Palmer, 2004) y conejos (Fjellstrom, 1968). En toros, la calidad del semen mejora (Perumal, 2015), así como muchas otras variables espermáticas cuando se administra oxitocina previo a la colecta de semen por EE (Berndtson e Igboeli, 1988). A pesar de las ventajas del uso de oxitocina en la EE, una desventaja como ya se mencionó es su corta vida media en sangre, por lo que Ungerfeld (2018) planteó que podría ser interesante estudiar el uso de presentaciones de la

hormona de acción prolongada o su inyección repetida. En este contexto, una hormona que la puede sustituir es la carbetocina, un agonista de receptores de oxitocina de larga duración.

Carbetocina

La carbetocina es una sustancia sintética de características análogas a la oxitocina que por su estructura química presenta una vida media superior a la de la oxitocina (6 – 7 h) (Calier Argentina, 2021). Por su mayor vida media, la carbetocina mantendría en forma continua los estímulos en los órganos reproductores del macho por un período de tiempo más prolongado que la oxitocina. En un trabajo realizado (Lafourcade, Molina, 2021) en carneros observaron que la administración de carbetocina previo a la EE resultó en un claro incremento en la cantidad de espermatozoides eyaculados, lo que probablemente se explica por la acción contráctil de la hormona en el epidídimo (Hib, 1974; Nicholson, 1999; Thackare, 2006) y conductos deferentes de carneros (Maggi, 1987; Whittington, 2001).

Adicionalmente, la aplicación de carbetocina previo a la EE podría resultó en un incremento del volumen del semen colectado, esto es posible debido al efecto prolongado de la hormona en las glándulas accesorias del macho, ya que dichas glándulas son las principales en aportar el plasma seminal (Arthur, 2001; Frandson, 1965; Ortiz, 1999). En el mismo sentido, en el trabajo de Lafourcade y Molina (2021) vieron que otras variables seminales resultaron en fuertes tendencias a favor del tratamiento con carbetocina, como la cantidad de espermatozoides eyaculados con integridad de membrana y el porcentaje de espermatozoides normales, que se puede asociar directamente al estímulo de la hormona en el epidídimo (Filippi, 2005; Hib, 1974; Mewe, 2007; Nicholson, 1999; Thackare, 2006) y túbulos seminíferos (Gimpl y Fahrenholz, 2001; Hargrove et al., 1977; Thackare et al., 2006).

Estas ventajas que posee la carbetocina en relación a la oxitocina ya fueron demostradas en carneros, podrían ser aprovechables al utilizar la EE en toros.

HIPOTESIS

La administración de carbetocina (análogo sintético de la oxitocina) previo a la EE en toros mejora la calidad seminal y la crioresistencia espermática.

OBJETIVOS

Determinar si la administración de carbetocina 15 minutos antes de la EE en toros mejora la calidad del semen colectado y la crioresistencia espermática.

MATERIALES Y METODOS

Animales y su manejo

El trabajo se realizó en la cabaña “La Magdalena” ubicada en la Colonia Itapebi, departamento de Salto. Se utilizaron 12 toros de la raza Braford entre 2 y 6 años, con un peso vivo promedio de 724 kg. Esta raza fue elegida por sus características particulares como poseer prepucio péndulo y gran tamaño corporal lo que dificulta la colecta por medio de VA. Los toros se encontraban alimentados a base de forraje (pradera toros de dos años y campo natural mejorado toros mayores de tres años). En el mes de noviembre, una semana antes de realizar el trabajo, los animales fueron andrológicamente evaluados y aprobados (en dicha evaluación andrológica se realizó examen objetivo general y particular de reproductor). Los animales se encontraban en reposo sexual.

Tratamientos experimentales

Se realizaron 2 colectas de semen (con un intervalo de 4 días), administrando carbetocina a 6 toros el primer día, y a los restantes 6 en la segunda colecta, de forma que cada toro pasó por ambos tratamientos siendo su propio control. La carbetocina Decomoton (Calier, Barcelona, España) se administró siempre 15 minutos antes de iniciar la electroeyaculación por vía intramuscular a una dosis de 0.2 mg/100 kg de peso vivo.

Metodología de electro eyaculación

Para la colecta del semen se utilizó un electroeyaculador (Electrojac 6, Michigan, Estados Unidos) con un vástago de 2,5 pulgadas y 3 electrodos longitudinales, en sistema automático aumentando de 0 a 40 pulsos eléctricos. En el proceso una persona sostenía el vástago, otra persona colectaba el semen y una tercera persona registraba los pulsos a partir de la protrusión del pene, líquido seminal y eyaculación propiamente dicha. Se colectó todo el semen eyaculado dando por finalizado el proceso una vez que no se observaba presencia del mismo. También se registró la hora de inicio y fin del proceso.

Evaluación de semen fresco

Una vez obtenida la muestra se realizó la evaluación del semen fresco (registrando volumen, concentración y motilidad de masa). En primer lugar, se registró el volumen del semen obtenido (mediante tubo graduado) y se procedió inmediatamente a su evaluación. Para medir la concentración se utilizó un espectrofotómetro (Minitube, MPP1, Tiefenbach, Alemania) previamente calibrado para semen bovino. Posteriormente se tomó una muestra para evaluar la motilidad de masa y la motilidad individual progresiva con gota aplastada. La motilidad de masa se evaluó mediante un microscopio óptico (Olympus, CX21, Tokio, Japón) con platina térmica incorporada, relacionando las corrientes de onda con una escala (0-5) para esta variable. Para la evaluación del vigor se utilizó una escala de 0-5, el cual fue caracterizado de acuerdo con la intensidad de los movimientos espermáticos, puntuándose 0 aquellos espermatozoides sin movimiento, 1 espermatozoides con ligera ondulación o vibración de cola, 2 espermatozoides con movilidad progresiva lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento, 3 movimientos progresivos continuos y de moderada velocidad, 4 movimientos progresivos rápidos y 5 movimientos progresivos muy rápidos (Ax *et al.*, 2000a). A partir de estos datos se calculó la cantidad total de espermatozoides eyaculados (volumen x concentración espermática).

El siguiente paso fue fijar 10 μ L de semen en una solución de 4 mL de formol citrato para la evaluación morfológica de los espermatozoides y para la evaluación de la integridad funcional de membrana espermática se utilizó la prueba de HOST (Jeyendran *et al.*, 1984).

Con dicha información se registró el total de espermatozoides con membrana funcional (total de espermatozoides eyaculados x el porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra) y total de espermatozoides con morfología normal en el eyaculado (porcentaje de cada categoría x total de espermatozoides en el eyaculado).

Posteriormente a la evaluación de semen fresco se acondicionaron las muestras (colocación de papel absorbente para proteger del frío directo, colocación de bolsas de polietileno para

impermeabilizar, luego se colocaron en conservadora mediana ya con hielo hasta la mitad del espacio y se colocaron las muestras para el enfriado, se verificó que las muestras hayan quedado bien selladas y en contacto con el hielo) para luego ser trasladadas de forma refrigerada a 5 °C hasta el laboratorio ubicado a 204 km de la cabaña, con una duración de recorrido de aproximadamente dos horas treinta minutos. La ubicación de laboratorio es en el km 601 de la Ruta 3 (poblado Mones Quintela, departamento de Artigas).

Para la criopreservación de las muestras de semen, primero se colocaron en una vitrina horizontal donde permanecieron refrigeradas a 5 °C durante 5-6 horas. Posteriormente se realizó la evaluación de los eyaculados utilizando un microscopio óptico con contraste de fase (Nikon, Tokio, Japón). El diluyente utilizado fue en base a Tris, ácido cítrico, yema de huevo y Glicerol con el agregado de un cóctel de antibióticos GTLS (Gentamicina, Tilosina, Lincomicina y Espectomicina). La mitad del diluyente se agregó previo al enfriado y la otra mitad previo a realizar la criopreservación del semen. Las pajuelas utilizadas fueron los envases de 0,5 mL, con una dosis final de 30 millones de espermatozoides/mL, impresas con los datos del toro utilizando una impresora EasyCode (Minitube®, Tiefenbach, Alemania). El llenado de las mismas se realizó en forma automática mediante una llenadora MPP Uno (Minitube®, Tiefenbach, Alemania) y la criopreservación se realizó sobre vapores de nitrógeno líquido. Finalmente, las pajuelas permanecieron en tanques de nitrógeno por un tiempo aproximado de 9 meses hasta su evaluación post-criopreservación.

Evaluación objetiva de semen criopreservado.

La evaluación objetiva de las muestras criopreservadas se realizó en la Facultad de Veterinaria, ubicada en Montevideo (ruta 8 km 18).

Las muestras se descongelaron en baño maría a 37 °C, se utilizaron 10 µl de semen para su evaluación en el sistema ISAS (Sistema Integrado de Análisis Espermático, ISAS V1, PROISER,

Valencia, España), determinando el porcentaje de espermatozoides estáticos, con motilidad progresiva y no progresiva, así como sus velocidades: curvilínea, rectilínea y velocidad promedio.

Por otro lado, se evaluó la integridad de la membrana espermática y el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales igual que en el semen fresco.

Análisis estadístico

Se utilizó un procedimiento mixto (mixed proc, ISAS University Edition), incluyendo el tratamiento como efecto principal y el día de colecta como efecto aleatorio. Se consideraron como diferencias significativas aquellas con $P \leq 0,05$, y como tendencias cuando $0,05 < P < 0,1$.

RESULTADOS

En el cuadro 2 se observan los resultados del semen fresco, donde la cantidad total de espermatozoides con membrana funcional fue mayor en el grupo tratado (CB) que en el control. En las variables total de espermatozoides motiles al enfriado y total de espermatozoides con morfología normal hubo tendencias a un efecto positivo del tratamiento.

Cuadro 2- Resultados de Espermiograma básico en semen fresco para grupo sin administración de carbetocina (control) y grupo con administración de carbetocina (CB).

Variable	Control	CB	Error	
			Estándar	Valor P
Volumen (mL)	5,2	8,5	1,4	0,13
Concentración espermática(mil zoides/mL)	400	507	119	0,42
Total espermatozoides eyaculados (mill)	2.756	5.583	1.412	0,15
Motilidad de masa	1,7	2,3	0,3	0,21
Espermatozoides con motilidad individual progresiva (mill)	1.761	3670	833	0,12
Vigor	2,8	3,2	0,4	0,54
Espermatozoides morfológicamente normales (%)	27,0	34,2	7,3	0,21

Total de espermatozoides morfológicamente normales (mill).	846	2.778	1.043	0,08
Espermatozoides con integridad funcional de la membrana espermática (%)	69,1	81,5	17,7	0,28
Total de espermatozoides con integridad funcional de la membrana espermática (mill).	1.792 ^b	4.775 ^a	1.517	0,05

Literales a y b en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas.

En el cuadro 3 se presenta el porcentaje de espermatozoides de cada variable luego del descongelado post criopreservación.

Cuadro 3- Resultados de la evaluación de los espermatozoides al descongelado para grupo sin tratamiento y grupo tratado.

Variable	Control	CB	Error Estándar	Valor P
Espermatozoides estáticos (%)	44,4	42,7	7,7	0,74
Espermatozoides móviles progresivos (%)	36,4	35,3	5,4	0,79
Espermatozoides móviles no progresivos (%)	19,2	22,0	2,92	0,22
Velocidad curvilínea (µm/s)	67	64	5,5	0,55
Velocidad rectilínea (µm/s)	30	29	3,6	0,66
Velocidad promedio (µm/s)	35	35	3	0,8

DISCUSION

La administración de carbetocina previo a la EE en toros resultó en un incremento de la cantidad total de espermatozoides con membrana funcional íntegra. A su vez, hubo una tendencia a aumentar la cantidad total de espermatozoides morfológicamente normales. Por su vida media larga, la carbetocina mantendría en forma continua los estímulos en los órganos reproductores del macho, por un período de tiempo más prolongado que la oxitocina, por lo que el aumento en la cantidad total de espermatozoides con membrana funcional íntegra y morfológicamente normales, podría estar asociado a la acción contráctil de la hormona en el epidídimo (Hib, 1974; Nicholson *et al.*, 1999; Thackare *et al.*, 2006) y conductos deferentes (Maggi *et al.*, 1987; Whittington *et al.*, 2001). Por otro lado, se asume que los espermatozoides con membrana funcional íntegra y normales, provienen de la cola del epidídimo, donde previamente adquirieron motilidad y capacidad para fecundar (Arthur, 2001; Gil, 2020). A pesar de adquirir motilidad en dicho órgano, los espermatozoides no despliegan la motilidad en sí hasta el momento de la eyaculación donde se activan al mezclarse con el plasma seminal (Arthur, 2001). En este sentido, el plasma seminal podría estar involucrado al tener una composición diferente por el estímulo persistente de la carbetocina sobre las glándulas anexas, reforzando el concepto de que los espermatozoides no fueron dañados en el pasaje desde cola del epidídimo hasta el conducto deferente, ni en el proceso de eyaculación.

Se puede observar que en el volumen y otras variables cuantitativas no llegó a producir efecto, esto revela la posibilidad de que las variables en las que hubo resultados positivos sean más sensibles a la contracción prolongada que produce la hormona sobre órganos reproductores. Esto también nos genera la pregunta de qué pasaría con estas variables cuantitativas si aumentáramos el tamaño de la muestra.

En la práctica, el aumento en la cantidad total de espermatozoides con integridad de membrana permitiría obtener una mayor cantidad de dosis inseminantes de semen fresco o de

dosis criopreservadas. A su vez, se podría disminuir la cantidad total de espermatozoides, ya que habrá un mayor porcentaje de espermatozoides funcionales en cada pajuela, potenciando el uso del toro y su manejo. También, se podría disminuir la frecuencia de colectas con EE al alcanzar mayor cantidad de dosis en una sola colecta, reduciendo el estrés que se produce en el animal, el trabajo asociado con la colección y procesamiento del semen. La administración de carbetocina previo a la EE se podría utilizar de forma periódica en planes de inseminación artificial y colecta de semen, ya que en este trabajo no produjo consecuencias negativas en los porcentajes de espermatozoides normales, vivos y motiles; variables que evaluadas en conjunto se correlacionan con la fertilidad potencial del toro (Frandsen *et al.*, 1965).

El semen se criopreservó para evaluar la crioresistencia espermática y los resultados de dicho procedimiento indican que los espermatozoides de los animales tratados con carbetocina resisten la criopreservación-descongelación al igual que los no tratados. Además, el aumento en la cantidad total de espermatozoides con integridad de membrana de los animales tratados permitiría obtener una mayor cantidad de pajuelas criopreservadas y a su vez, mayor porcentaje de espermatozoides funcionales por cada pajuela. Con este procedimiento se demuestra, que el tratamiento con carbetocina no repercute negativamente sobre la calidad del semen luego de la criopreservación, con lo cual se puede utilizar en planes de inseminación artificial con semen criopreservado y colecta de semen mediante EE.

CONCLUSIONES

La administración de carbetocina 15 minutos previo a la electroeyaculación produjo un aumento en la cantidad total de espermatozoides con membrana funcional integra, aumentando también la cantidad total de espermatozoides morfológicamente normales. No se generaron efectos negativos sobre otras variables evaluadas en el semen fresco ni criopreservado.

La calidad del semen no se vio afectada luego de la criopreservación-descongelación, siendo apto para utilizar en planes de inseminación artificial y colecta de semen.

BIBLIOGRAFIA

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios España. (2017). *Oxitocina Diana* [prospecto]. Recuperado de

https://cimavet.aemps.es/cimavet/pdfs/es/ft/669+ESP/FT_669+ESP.pdf

Allard, A.H. (1947). *Determination of the density of lipid and solids, application to the determination of density of bull semen and of Brandie's solution*. Laboratory of Animal Breeding and Artificial Insemination, Cornell University.

Amann, R. P. (1981). A review of anatomy and physiology of the stallion. *Journal of Equine Veterinary Science*, 1, 83-105.

Arai, Y. (2002). Central nervous control of male reproduction. *Nippon Rinsho*, 60, 7-15.

Arieta, R., Fernández, J., y Menchaca, J. (2014). Métodos de extracción de semen bovino. *Redvet*, 15, 1-8.

Arthur, G.H. (2001). *Veterinary Reproduction and Obstetrics. Theriogenology*. (8ª ed.).

Londres: Saunders.

Arthur, G. H., y Noakes, D. E. (1991). *Reproducción y obstetricia en veterinaria* (6ª ed.). Madrid: Interamericana.

Ax, R. L., Dally, M., Didion, B. A., Lenz, R. W., Love, C. C., Varner, D. D., Bellin, M. E. (2000). Semen evaluation. En *Reproduction in farm animals* (7ª ed., pp. 363-375). Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.

- Baas, J.W., Molan, P.C., y Shannon, P. (1983). Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 68, 275-280.
- Bailey J., Morrier, A., y Cormier, N. (2003). Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Canadian Journal of Animal Science*, 3, 393-401.
- Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tatóo, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T., y Cebrián-Pérez, J. (2000). Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction*, 63,1531-1537.
- Berndtson, W. E., y Igboeli, G. (1988). Spermatogenesis, sperm output and seminal quality of Holstein bulls electroejaculated after administration of oxytocin. *Journal of Reproduction and Fertility*, 82, 467-475.
- Bozkurt, T., Tuerk, G., y Guer, S. (2007). Effects of exogenous oxytocin on serologic and seminal steroids and semen characteristics in rams. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 31, 303-309.
- Brownstein, M. J., Russell, J. T., y Gainer, H. (1980). Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science*, 207, 373-378.
- Calier Argentina. (2021). *Decomoton* [prospecto]. Recuperado de <https://www.calier.com/argentina/es-ar/product/download/1502>
- Cavestany, D. (1994). *Procesamiento y Criopreservacion de Semen de Toro*. Montevideo: Santa Catalina.
- Centola, C. L., Rindone, G. M., Gorga, A., Pellizzari, E. H., Cigorraga, S. B., Riera, M. F., y Galardo, M. N. L. (2020). Señales de transducción y mecanismos moleculares

- involucrados en la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli. *Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva*, 27, 35-45.
- Chemineau, P., Guillaume, D., Migaud, M., Thiéry, J.C., Pellicer-Rubio, M.T., y Malpoux, B. (2008). Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 40-47.
- Corneo, G. (1940). El llamado "semen amarillo" en el toro. *Fecondazione artificiale degli animali domestici*, 2, 4-19.
- Cottrell, D. F., Iggo, A., y Kitchell, R. L. (1978). Electrophysiology of the afferent innervation of the penis of the domestic ram. *The Journal of Physiology*, 283, 347-367.
- Cubas, G. (2013). *Evaluación seminal en toros por métodos manuales o computarizados* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Udelar, Montevideo.
- Cuenca, L., Chiossoni, M., Ferraris, A., Haedo, F., y Rivero, R. (1986). Evaluación de la Capacidad Reproductiva del Toro. En *Aptitud reproductiva del toro. Calidad seminal* (pp. 73-112). Montevideo: MGAP-IICA.
- Cunningham, J.G. (2003). *Fisiología veterinaria* (3ª ed.). Madrid: Elsevier.
- Damián, J.P., y Ungerfeld, R. (2011). The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural parameters. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 646-450.
- DaSilva e Souza, M., Gimeno, M., y Gimeno, A. (1975). Physiologic and pharmacologic studies on the motility of isolated guinea pig cauda epididymis. *Fertility and Sterility*, 26, 1250-1256.
- Dorado, J., Alcaráz, L., Duarte, N., Portero, J. M., Acha, D., y Hidalgo, M. (2011). Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both

- cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient. *Animal Reproduction Science*, 125, 211-218.
- Duarte Elías, C. C. (2008). *Efecto de la aplicación de oxitocina sobre la calidad seminal en bovinos en el trópico húmedo* (Tesis de grado). FMVZ, Universidad Veracruzana, Veracruz.
- Dyce, K.M., Sack, W.O., y Wensing, C.J.G. (1999). *Anatomía Veterinaria* (2ª ed.). México: McGraw-Hill Interamericana.
- Filippi, S., Morelli, A., Vignozzi, L., Vannelli, G.B., Marini, M., Ferruzzi, P., y Maggi, M. (2005). Oxytocin mediates the estrogen-dependent contractile activity of endothelin-1 in human and rabbit epididymis. *Endocrinology*, 146, 3506-3517.
- Fjellström, D., Kihlström, J., y Melin, P. (1968). The effect of synthetic oxytocin upon seminal characteristics and sexual behaviour in male rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility*, 17, 207-209.
- Frandsen, R.D., Lee Wilke, W., y Dee Fails, A. (1965). *Anatomy and physiology of farm animals* (7ª ed.). Nueva Jersey: Wiley Blackwell.
- Fraser, A. F. (1992). *The behaviour of the horse*. Wallingford: CAB international.
- Freneau, G.E., Chenoweth, P.J., Ellis, R., y Rupp, G. (2010). Sperm Morphology of Beef Bulls Evaluated by Two Different Methods. *Animal Reproduction Science*, 118,176-181.
- Garner, D. L. (1997). Ancillary tests of bull semen quality. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 13, 313-330.
- Gil, J., Januskauskas, A., Håård, M., Håård, M. G. M., Johanisson, A., Söderquist, L., y Rodríguez-Mártinez, H. (2000). Functional sperm parameters and fertility of bull semen

- extended in Biociphos-Plus® and Triladyl®. *Reproduction in Domestic Animals*, 35, 69-77.
- Gimpl, G., y Fahrenholz, F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiological Reviews*, 81, 629-683.
- Hafez, E. (1996). *Reproducción e Inseminación Artificial* (6ª ed.). México: Mc. Graw- Hill.
- Hafez, E. (2002). *Reproducción e Inseminación Artificial* (7ª ed.). México: Mc. Graw- Hill.
- Hargrove, J. L., MacIndoe, J. H., y Ellis, L. C. (1977). Testicular contractile cells and sperm transport. *Fertility and Sterility*, 28, 1146-1157.
- Hellstrom, W. (2006). Current and future pharmacotherapies of premature ejaculation. *The Journal of Sexual Medicine*, 3, 332-41.
- Hib, J. (1974). The in vitro effects of oxytocin and vasopressin on spontaneous contractility of the mouse cauda epididymidis. *Biology of Reproduction*, 11, 436-439.
- Hib, J. (1977). The in vivo effects of oxytocin and vasopressin on spontaneous contractility of the rat epididymis. *International Journal of Fertility*, 22, 63-64.
- Holt, W.V., y Van Look, J.W. (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction*, 127, 527-535.
- Íñiguez, C., Brito, D., Reinoso, N., Galarza, D., Argudo, D., y Alberio, R. (2017). Efecto de un tranquilizante sobre las características seminales de toros colectados con electroeyaculador. *Maskana*, 8, 121-123.
- Januskauskas, A., Gil, J., Söderquist, L., Hrd, M. G. M., Hrd, M. C., Johannisson, A., y Rodriguez-Martinez, H. (1999). Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility,

- membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, 52, 641-658.
- Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., y Zaneveld, L.J.D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70, 219-228.
- Kihara, K. (2002). Mechanism of ejaculation. *Nippon Rinsho*, 60, 83-87.
- Kirk, E. J., Kitchell, R. L., y Carr, D. H. (1987). Neurophysiologic maps of cutaneous innervation of the external genitalia of the ram. *American Journal of Veterinary Research*, 48, 1162-1166.
- Klein, G.B. (2014). Cunningham fisiología veterinaria (5ª ed.). Barcelona: Elsevier.
- Lafourcade, S., y Molina M.M. (2021). Administración de una oxitocina de larga acción antes de la electroeyaculación en carneros: efectos sobre la calidad del semen fresco (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Maggi, M., Malozowski, S., Kassis, S., Guardabasso, V., y Rodbard, D. (1987). Identification and characterization of two classes of receptors for oxytocin and vasopressin in porcine tunica albuginea, epididymis, and vas deferens. *Endocrinology*, 120, 986-994.
- Maina, D., y Katz, L. S. (1999). Scent of a ewe: transmission of a social cue by conspecifics affects sexual performance in male sheep. *Biology of Reproduction*, 60, 1373-1377.
- Mann, T. (1974). Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *Reproduction*, 37, 179-188.

- Menon, A.J., Barkema, H.W., Wilde, R., Kastelic, J.P., y Thundathil, J.C. (2011). Association between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *The Canadian Journal of Veterinary*, 75, 241-247.
- Mewe, M., Wulfsen, I., Middendorff, R., y Bauer, C. K. (2007). Differential modulation of bovine epididymal activity by oxytocin and noradrenaline. *Reproduction*, 134, 493-501.
- Milovanov, V. K., Bereznev, A., y Gorohov, L. (1962). The effect of oxytocin on the reproductive system of male livestock. *Animal Breeding Abstracts*, 32, 101.
- Morillo, M., Salazar, S., y Castillo, E. (2012). *Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino*. Maracay: Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas.
- Nelson, R. J., y Chiavegatto, S. (2001). Molecular basis of aggression. *Trends in Neurosciences*, 24, 713-719.
- Nicholson, H., Parkinson, T., y Lapwood, K. (1999). Effects of oxytocin and vasopressin on sperm transport from the cauda epididymis in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117, 299-305.
- Ortiz, W. G., Rizo, J. A., Carvalheira, L. R., Ahmed, B. M. S., Estrada-Cortes, E., Harstine, B. R., ... Hansen, P. J. (2019). Effects of intrauterine infusion of seminal plasma at artificial insemination on fertility of lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 102(7), 6587-6594.
- Palmer, C.W. (2005). Welfare aspects of theriogenology: investigating alternatives to electroejaculation of bulls. *Theriogenology*, 64, 469-479.
- Palmer, C.W., Amundson, S.D., Brito, L.F.C., Waldner, C.L., y Barth A.D. (2004). Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. *Animal Reproduction Science*, 80, 213-223.

- Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J., y Muiño-Blanco, T. (2001). Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*, 56, 425-434.
- Perumal, P. (2015). Effect of hormones on semen collection and its quality in mithun (*Bos frontalis*). *Indian Journal of Applied Research*, 5, 548-549.
- Petrunkina, A. M., Gröpper, B., Günzel-Apel, A. R., y Töpfer-Petersen, E. (2004). Functional significance of the cell volume for detecting sperm membrane changes and predicting freezability in dog semen. *Reproduction*, 128, 829-842.
- Rangel, P. L. E. (2007). *Evaluación de la salud de sementales bovinos*. México: FMVZ-UNAM.
- Robles, C. (2004). *Salud reproductiva del camero*. Bariloche: INTA - EEA Bariloche.
- Román, R. D. J. A., Figueroa, J. A. F., y Peña, J. M. (2014). Métodos de extracción de semen bovino. *REDVET*, 15, 1-8.
- Salisbury, G., Van Demark, N., y Lodge, J. (1978). *Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle* (2ª ed.). San Francisco: W.H. Freeman and Company.
- Sharma, S.C., Fitzpatrick, R.J., y Ward, W.R. (1972). Coital-induced release of oxytocin in the ram. *Journal of Reproduction and Fertility*, 31, 488-489.
- Sylla, L., Palombi, C., Stradaoli, G., Vagniluca, A., y Monaci, M. (2015). Effect of semen collection by transrectal massage of accessory sexual glands or artificial vagina on the outcome of breeding soundness examinations of Italian yearling beef bulls. *Theriogenology*, 83, 779-785.
- Thackare, H., Nicholson, H. D., y Whittington, K. (2006). Oxytocin—its role in male reproduction and new potential therapeutic uses. *Human Reproduction Update*, 12, 437-448.
- Ungerfeld R. (2002). *Reproducción en los animales domésticos* (Vol. 1). Montevideo: Melibea.

- Ungerfeld, R., Casuriaga, D., Giriboni, J., Freitas-de-Melo, A., Silveira, P., y Zandonadi Brandao, F. (2018). Administration of cloprostenol and oxytocin before electroejaculation in goat bucks reduces the needed amount of electrical stimulation without affecting seminal quality. *Theriogenology*, 107, 1-5.
- Ungerfeld, R., Ramos, M. A., y González-Pensado, S. P. (2008). Ram effect: adult rams induce a greater reproductive response in anestrous ewes than yearling rams. *Animal Reproduction Science*, 103, 271-277.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., y Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57, 149-179.
- Wathes, D. (1984). Possible actions of gonadal oxytocin and vasopressin. *Reproduction*, 71, 315-345.
- Whitlock, B. K., Coffman, E. A., Coetzee, J. F., y Daniel, J. A. (2012). Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls. *Theriogenology*, 78, 737-746.
- Whittington, K., Assinder, S.J., Parkinson, T., Lapwood, K.R., y Nicholson, H.D. (2001). Function and localization of oxytocin receptors in the reproductive tissue of rams. *Reproduction*, 122, 317-325.
- Wulster-Radcliffe, M.C., Williams, M.A., Stellflug, J.N., y Lewis, G.S. (2001). Artificial vagina vs a vaginal collection vial for collecting semen from rams. *Journal Animal Science*, 79, 296

