



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**COLECTA DE SEMEN CON VAGINA ARTIFICIAL EN DOS  
MOMENTOS DEL DÍA: EFECTOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO SEXUAL Y  
LA CALIDAD DEL SEMEN FRESCO DE CARNEROS**

**POR**

**Valentina Camila REYES ACOSTA**

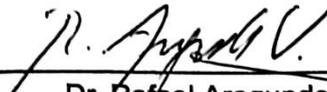
**TESIS DE GRADO** presentada como  
uno de los requisitos para obtener  
el título de Doctor en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Producción Animal

**Modalidad: Ensayo experimental**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY 2024**

**PÁGINA DE APROBACIÓN**

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:   
Dr. Rafael Aragunde

Segundo miembro (tutor):   
Dr. Juan Carlos Orihuela Porcayo

Tercer miembro:   
Dr. Danilo Fila

Cuarto miembro:   
PhD. Livia Pinto-Santini

Fecha: 03/05/2024

Autor/a:   
Br. Valentina Reyes Acosta

## **AGRADECIMIENTOS**

A Mamá, Papá y Erika por el apoyo y amor incondicional, por enseñarme a luchar por lo que quiero sin importar las trabas que ponga el camino y por estar siempre para mí.

A mi familia de sangre y de corazón, por acompañarme a lo largo de la vida y en mi carrera incondicionalmente.

A mis tutores, Juan Carlos Orihuela y Livia Pinto Santini, por su apoyo, paciencia y dedicación a lo largo de la tesis y de mi vida académica.

A la Unidad Académica de Fisiología, y en especial a Rodolfo Ungerfeld, por apoyarme y brindarme espacios donde seguir creciendo en mi proceso académico.

Al equipo de trabajo involucrado en este experimento sin el cual no hubiese sido posible su realización: Victoria Fernández, Madeleine Guerrero, Patricia Silveira y Lucia Porto.

A la gran familia de la Unidad Académica Ovinos, Lanas y Caprinos, quienes me enseñaron y enseñan día a día el amor y la vocación por la oveja y apoyan constantemente mi crecimiento tanto como persona y como profesional.

A Lorena Lacuesta, por sus consejos y apoyo.

A mis compañeras de oficina por apoyarme cada día: Josefina Mañana, Rocío González, Mercedes Ponce y Ana Egüez.

Al personal de Biblioteca de FVET por evacuar mis dudas con respecto a la redacción de este trabajo y en la búsqueda de bibliografía para el mismo.

A nuestra noble casa de estudios y a todos los aprendizajes y personas maravillosas que cruzó en mi camino, muchos de ellos amigos entrañables sin los cuales la carrera y la vida no serían lo mismo.

A Piara, Bolita, Aquiles, Margarita, Rosi y Numa, compañeros fieles que me acompañaron en más de una preparación de examen y me ayudaron a forjar mi vocación.

## Contenido

PÁGINA DE APROBACIÓN .....	¡Error! Marcador no definido.
AGRADECIMIENTOS.....	3
Lista de cuadros y figuras: .....	5
1. RESUMEN.....	6
2. SUMMARY .....	7
3. INTRODUCCIÓN .....	8
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	9
4.1 Técnicas de colección del semen .....	9
4.1.1. Vagina artificial .....	9
4.1.2. Electroeyaculación.....	9
4.2 Conducta sexual del carnero .....	10
4.3 Semen: composición y evaluación .....	10
4.3.1. Composición del semen .....	10
4.3.2. Evaluación de la calidad seminal .....	11
4.4 Fisiología endócrina de la reproducción del carnero .....	16
4.5 Patrón de variación diario del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal: Efecto sobre la concentración de testosterona, la conducta sexual, proceso eyaculatorio y calidad seminal.....	17
5. HIPÓTESIS .....	20
6. OBJETIVOS.....	21
6.1 Objetivo general .....	21
6.2 Objetivos específicos .....	21
7. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	22
7.1 Ubicación y manejo general de los animales .....	22
7.2 Diseño experimental y tratamientos .....	22
7.3 Comportamiento sexual .....	23
7.4 Calidad seminal .....	23
7.5. Análisis estadístico .....	24
8. RESULTADOS.....	25
8.1. Comportamiento sexual.....	25
8.2. Semen fresco.....	25
9. DISCUSIÓN .....	29
10. CONCLUSIÓN .....	30
11. BIBLIOGRAFÍA .....	30

## **Lista de cuadros y figuras:**

**Cuadro 1.** Determinación de la concentración espermática a través del color del eyaculado (Adaptado de Olivera, Gil, Fierro, Minteguiaga, 2019). **Página 12.**

**Cuadro 2.** Escala de motilidad de masa espermática adaptada de (Evans & Maxwell, 1987). **Página 13.**

**Figura 1.** Principales anomalías morfológicas del semen de carnero, clasificadas según región espermática. Fuente: Fernández Abella, 2015. **Página 15.**

**Figura 2.** Diagrama del protocolo de sincronización de celo en ovejas empleado en este experimento. **Página 23.**

**Figura 3.** Diagrama del diseño experimental utilizado en este experimento. **Página 23.**

**Cuadro 3.** Frecuencias de los comportamientos de monta de los carneros cuando se colecta semen con vagina artificial en dos momentos del día: en la mañana (07:00 - 09:00 h) y al anochecer (19:00 – 21:00 h). **Página 26.**

**Cuadro 4.** Características del semen fresco de carneros recolectado con vagina artificial en dos momentos del día: en la mañana (07:00 – 09:00 h) y al anochecer (19:00-21:00 h). **Página 27.**

**Cuadro 5.** Velocidades registradas con sistema ISAS de semen fresco de carneros recolectado con vagina artificial en la mañana (07:00-09:00 h) y al anochecer (19:00 a 21:00 h). **Página 28.**

## 1. RESUMEN

En carneros, la concentración de testosterona presenta un patrón de variación diario caracterizado por una mayor concentración en las tardes. La testosterona influye en el comportamiento sexual y la calidad seminal de los machos por lo que, en carneros, probablemente, estas variables puedan ser influidas por las variaciones en las concentraciones de testosterona durante el día. Con base en ello, el objetivo del experimento fue comparar el comportamiento sexual y la calidad del semen fresco de los carneros colectado en la mañana o en el anochecer con vagina artificial. Se utilizaron 16 carneros Corriedale, adultos, con experiencia sexual y andrológicamente aptos. Los carneros fueron manejados en corrales y alimentados con fardos de alfalfa (entre las 6:00 y 6:30 h), alimento concentrado comercial (entre las 15:00 y 15:30 h) y acceso al agua ad libitum. El experimento se realizó durante el mes de febrero (estación reproductiva). Las colectas se realizaron en dos días, con una separación de 3 d entre ambas. Cada día hubo dos turnos de colecta de semen: un turno en la mañana (entre las 07:00 y las 09:00h) y un turno al anochecer (entre las 19:00 y las 21:00); el grupo de carneros a los que el primer día se les colectó semen por la mañana, se le colectó al anochecer al segundo día de colecta y, viceversa. Los comportamientos sexuales del carnero frente a la hembra en celo evaluados al momento de la colecta fueron: número de olfateos ano-genitales, flehmen, acercamientos laterales, intentos de monta y montas sin eyaculación. Además, se registró el tiempo desde que el carnero ingresaba al corral de colecta hasta que efectuaba una monta completa. Las características seminales evaluadas fueron volumen, motilidad espermática de masa (escala 0 a 5), concentración, porcentaje de espermatozoides motiles y con motilidad progresiva, velocidades de los espermatozoides (curvilínea, rectilínea y promedio tanto de espermatozoides lentos, medios y rápidos), integridad de la membrana, porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y porcentaje de espermatozoides con cola doblada simple. Se calculó la cantidad total de espermatozoides eyaculados, de espermatozoides motiles y con motilidad progresiva, con membrana íntegra, morfológicamente normales y con cola doblada simple. El análisis estadístico se efectuó mediante modelo mixto (SAS On Demand for Academics), incluyendo como efecto fijo el horario de colecta de semen (mañana y anochecer), y como efecto aleatorio el día de colecta y el carnero. Durante la estación reproductiva, la hora de la colecta de semen con vagina artificial no modificó el comportamiento sexual ni la calidad seminal de los carneros. Aunque se observó una tendencia a un mayor despliegue de la conducta sexual (acercamientos laterales;  $P = 0,06$ ) y sobre la cinética de los espermatozoides (motilidad progresiva y velocidad rectilínea lenta de los mismos;  $P = 0,07$  y  $P = 0,09$ , respectivamente) al anochecer, los cambios no permiten sugerir modificar la hora de colecta en la especie.

## 2. SUMMARY

In rams, testosterone concentration presents a daily variation pattern characterized by a higher concentration in the afternoon. Testosterone influences sexual behavior and seminal quality in males, so in rams, these variables could be influenced by variations in testosterone concentrations during the day. According to this, the experiment aimed to compare the sexual behavior and quality of fresh semen from rams collected in the morning or the evening with an artificial vagina. Sixteen Corriedale rams, adults with sexual experience, and andrological health were used. The rams were managed in pens and fed with alfalfa hay (between 6:00 and 6:30 h), commercial concentrate feed (between 15:00 and 15:30 h), and access to water ad libitum. The experiment was carried out in February (breeding season). The rams were managed in pens and fed with alfalfa hay (between 6:00 and 6:30 h), commercial concentrate feed (between 15:00 and 15:30 h), and access to water ad libitum. The experiment was carried out in February (breeding season). The semen was collected on two days, with an interval of 3 d between them. Each day, there were two times for collection: during the morning (between 07:00 and 09:00) and during the evening (between 19:00 and 21:00); the group of rams from which semen was collected in the morning on the first day was collected in the evening on the second day of collection, and vice versa. The sexual behaviors of the ram in front of the ewe in estrus evaluated at the time of the semen collection were the number of anogenital sniffs, flehmen, lateral approaches, mount attempts, and mounts without ejaculation. In addition, the time from when the ram entered the collection pen until it made a complete mating was recorded. The seminal characteristics evaluated were volume ejaculated, sperm mass motility (scale 0 to 5), sperm concentration, motile sperm and sperm with progressive motility, kinematic variables (curvilinear, linear, and average path velocities), membrane integrity, percentage of morphologically normal spermatozoa and percentage of spermatozoa with simple bent tails. The total number of sperms ejaculated, motile sperms and sperm progressive motility, sperm with functional membrane, morphologically normal, and sperm with simple bent tails were calculated. Statistical analysis was performed using a mixed model (SAS On Demand for Academics). The time of the semen collection was included as a fixed effect (morning and evening), and the day of collection and the ram were included in the model as random effects. During the breeding season, the time of semen collection with an artificial vagina did not modify the sexual behavior or seminal quality of rams. Although there was a tendency for a greater display of sexual behavior (lateral approaches;  $P = 0.06$ ) and sperm kinetics (progressive motility and slow linear sperm velocity;  $P = 0.07$  and  $P = 0.09$ , respectively) in the evening, the changes presented does not suggest to modify the time of semen collection in rams.

### 3. INTRODUCCIÓN

Algunas funciones fisiológicas y conductuales de los carneros presentan un patrón de variación diario (Pinto-Santini, Pérez-Clariget & Ungerfeld, 2022). Tal es el caso de la hormona luteinizante y, consecuentemente, de la testosterona, las cuales, en carneros, presentan una frecuencia y amplitud menores en las primeras horas de la mañana en comparación con las horas de la tarde (Lincoln, Peet & Cunningham, 1977; Lincoln & Peet, 1977; Ortavant et al., 1982). Recientemente se reportó un patrón similar en carnero Corriedale, con mayores concentraciones de testosterona entre 9 y 10 horas después del amanecer (Pinto-Santini et al., 2022). Aunque se desconoce la función fisiológica del incremento en la concentración de testosterona por la tarde, algunos autores han señalado que la misma podría estar asociada con el inicio del período de descanso y de menor actividad de los carneros (Lincoln & Peet, 1977; Pinto-Santini et al., 2022). Existen reportes en algunas especies que evidencian la implicancia de la testosterona sobre el comportamiento sexual y la calidad seminal (humanos: Morelli et al., 2004; ratas: Breedlove & Arnold, 1980; machos cabríos: Fritz, Sena, Becker & Katz, 2019). En carneros también se ha reportado que la testosterona tiene influencia sobre el comportamiento de monta, producción espermática y seminal (Kishk, 2008; Orihuela, 2014; Yarney & Sanford, 1983). Es razonable inferir que el aumento vespertino de dicha hormona pueda tener un impacto positivo sobre el comportamiento de monta, proceso eyaculatorio y calidad seminal del carnero.

Recientemente Orihuela et al. (2023) detectaron ligeras diferencias en el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y en la velocidad rectilínea de espermatozoides lentos del semen fresco según la hora del día en que se realizó la colecta mediante electroeyaculación (EE) en carneros. Estas variables tendían a aumentar en la fase vespertina del día. La falta de resultados más contundentes, posiblemente se asocien a que la intensidad de los pulsos eléctricos producidos por la EE pudiera estar enmascarando el efecto del incremento natural de la concentración de testosterona al final de la fase diurna del día, lo que no permitió detectar un mayor efecto sobre la calidad seminal. La colecta de semen con vagina artificial (VA) permitiría a los machos expresar mejor los posibles cambios fisiológicos y conductuales que pudieran estar modulados por los patrones de variación diario de la concentración de testosterona. Sin embargo, hasta donde puede conocerse, no hay reportes de cambios en la expresión de la conducta de monta y cópula y calidad del eyaculado en carneros de acuerdo a la hora de colecta usando esta técnica. Resulta interesante, tanto a nivel académico como productivo, evaluar si el momento del día en que se colecta el semen de los carneros con VA afecta la expresión de la conducta de monta y cópula y la calidad seminal.

## 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Técnicas de colección del semen

La colecta del semen en rumiantes se efectúa con diferentes propósitos. Desde la sola evaluación de la capacidad reproductiva del macho hasta su utilización en técnicas reproductivas (inseminación artificial y fertilización in vitro) o simplemente con fines de preservación genética. En el caso de los carneros, los métodos de colección de uso más extendido son la VA y la EE (Fernández Abella, 2015). A continuación, se explicarán las técnicas que utiliza cada uno de los métodos mencionados:

#### *4.1.1. Vagina artificial*

Es el método más difundido de colección de semen en ovinos (Hafez, 1989). Es considerado un método para fisiológico (Bonadonna, 1986) ya que durante la colecta el macho eyacula dentro de una VA que simula la dimensión, temperatura y humedad de la vagina de la hembra de la especie (Fernández Abella, 2015). Para ello, el macho es estimulado con una hembra en celo o un maniquí y el técnico que colecta desvía el pene del carnero para que penetre en la misma.

En general, en ovinos, la VA consta de un tubo rígido o semirrígido de aproximadamente 15-20 cm de largo y 6-8 cm de diámetro, que cuenta con una válvula. Por dentro de este tubo se coloca un tubo de látex o goma de mayor longitud, pero menor diámetro y sus extremos se ajustan a los del tubo rígido. A través de la válvula se coloca agua caliente y aire entre la pared del tubo rígido y la pared del tubo de látex, lo que da el aporte térmico y reducción de diámetro a la vagina, se sugiere una temperatura de entre 45 a 50 °C. El agua y el aire que fueron incorporados generan un circuito de similares dimensiones y presión que la vagina de la hembra. En uno de los extremos se fija la copa colectora y el otro extremo se destina a la introducción del pene del carnero, a dicho extremo se le puede colocar algún lubricante si se considera necesario como glicerina, vaselina o carboximetilcelulosa (Durán del Campo, 1994).

La vagina artificial es el método de colecta más recomendado en términos de bienestar animal, debido a la similitud fisiológica con la vagina de la hembra, el nivel de estrés generado en los animales por el procedimiento es muy bajo además de que se colecta semen de mejor calidad (más concentrado y sin contaminación con orina) (Sylla, Palombi, Stradaoli, Vagniluca, & Monaci, 2015). Sin embargo, su aplicación en carneros está sujeta a diversas limitaciones y consideraciones. Entre ellas se incluye la edad del animal, entrenamiento previo, nivel de excitación previa del carnero y solo se puede aplicar en animales con capacidad de monta y en estación reproductiva (Fernández Abella, 2015; Lacuesta, Orihuela & Ungerfeld, 2015; Lincoln et al., 1977).

#### *4.1.2. Electroeyaculación*

La EE se basa en la estimulación mediante pulsos eléctricos dirigidos a los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos y también sobre las glándulas anexas del macho (Austin, Hupp & Murphree, 1961). Se usa una sonda transrectal provista de electrodos, de aproximadamente 15-20 cm, por la cual pasa una corriente de 6-7 V y elevado amperaje (Fernández Abella, 2015).

El método de EE, puede ser utilizado en carneros prepúberes, con algún tipo de impotencia coeundi, fuera de la estación reproductiva y no se requiere de un entrenamiento intenso ni del personal ni del animal. Es de fácil y efectiva aplicación, sin embargo, representa una experiencia estresante y dolorosa para los animales (Abril-Sánchez, Freitas-de-Melo, Giriboni, Santiago-Moreno & Ungerfeld, 2019). El semen colectado mediante esta técnica contiene mayor cantidad de plasma seminal ya que estimula las glándulas anexas del aparato reproductor incrementando el volumen del eyaculado (Austin, Leidy, Krise & Hupp, 1968; Giuliano, Director, Gambarotta, Trasorras & Miragaya, 2008) y la concentración espermática es menor (Mattner & Voglmayr, 1962; Memon, Bretzlaff & Ott, 1986) que el semen colectado con VA. Es decir que la muestra de semen colectado con vagina artificial es muy similar al que se eyacula en la monta natural a diferencia del semen colectado mediante EE que experimenta variaciones de volumen y concentración.

## **4.2 Conducta sexual del carnero**

El comportamiento de cópula del carnero es el resultado de varias unidades conductuales que comprenden la identificación de la hembra, el cortejo y finalmente, la eyaculación (Orihuela, 2014). Para identificar a la hembra en celo, el carnero olfatea su región ano-genital, también es frecuente que realice el reflejo de flehmen, para determinar la presencia o no de feromonas de la hembra (Orihuela, 2014; Ungerfeld, 2011).

Tras identificar a la hembra en celo, el carnero realiza una serie de comportamientos de cortejo, bastante estereotipados, caracterizados por acercamientos laterales, vocalizaciones de bajo tono e intentos de monta (Banks, 1964). Si la hembra se muestra receptiva al macho, el carnero realiza la cópula la cual es desencadenada por una serie de estímulos neuroendocrinos y comprende la erección del pene, la monta, intromisión del pene y la eyaculación (Ungerfeld, 2011). La cópula se consuma con la eyaculación, la cual se produce cuando el glande del pene toma contacto con la mucosa vaginal de la oveja (Banks, 1964). Se evidencia tras un fenómeno denominado “golpe de riñón” que se caracteriza por una contracción pélvica vigorosa, que va acompañada por el movimiento de propulsión de los miembros posteriores, los cuales quedan suspendidos en el aire por fracciones de segundo. Se evidencia también el movimiento de la cabeza hacia atrás de forma sincrónica y finaliza con el desmonte del macho (Banks, 1964; Orihuela, 2014).

## **4.3 Semen: composición y evaluación**

### *4.3.1. Composición del semen*

El semen de carnero se compone de una fracción fluida o líquida, denominada plasma seminal, que representa un 75% del volumen total del eyaculado, y una fracción celular o morfológica compuesta por los espermatozoides, que representa aproximadamente un 25% del volumen total del eyaculado (Duran Del Campo, 1980; Garner & Hafez, 2000). El plasma seminal es el producto de las glándulas anexas del aparato genital del carnero (vesículas seminales, glándulas bulbouretrales o de Cowper y próstata); mientras que la fracción celular del semen, es decir los espermatozoides, son producto

de la espermatogénesis, proceso que se lleva a cabo en los túbulos seminíferos del parénquima testicular (Duran Del Campo, 1980). El plasma actúa como medio de capacitación, transporte y sustento nutritivo de los espermatozoides en el trayecto del deaparato reproductivo del macho al tracto reproductivo de la hembra (De Graaf et al., 2014; Troedsson et al., 2005).

#### 4.3.2. Evaluación de la calidad seminal

Las evaluaciones de las muestras de semen solo se pueden realizar sobre eyaculados normales, dentro de un breve período posterior a la recolección (Roberts, 1979). Las muestras no deben ser expuestas a cambios bruscos de temperatura, tampoco deben estar en contacto con agua, metales, radiación solar directa o impurezas. Es importante manipular las muestras en el menor tiempo posible, debe trabajarse con objetos de vidrio o plástico preferentemente, estériles, secos y con la misma temperatura seminal (Gibbons, Cueto, García Vinent, Wolff & Arrigo, 1993).

La evaluación del semen consta de determinaciones macroscópicas y microscópicas. A continuación, se detallan las mismas:

##### Determinaciones macroscópicas:

**Volumen:** se evalúa en copa o tubo graduado, también puede determinarse con el uso de micropipetas de diferentes graduaciones, comenzando con una graduación de 1000  $\mu\text{L}$  y disminuyendo según el volumen restante hasta finalizar con el total de semen recolectado. En carneros el volumen normalmente oscila entre los 0,8 a 1,5 mL. Cambios en el volumen del eyaculado podrían depender del nivel de excitación previa del animal, la época del año en que se obtiene la muestra, la edad, el estado nutricional y la sanidad del carnero, cantidad de eyaculados por día y el método de colecta (Fernández Abella, 2015). Como se verá más adelante, el momento del día podría modificar el volumen del semen colectado.

**Aspecto y color:** el color normal del semen se describe como blanco mientras que el aspecto se describe como cremoso. Ambos se relacionan estrechamente con la concentración de espermatozoides. Una menor concentración espermática le hace tomar un color y aspecto más lechoso e incoloro en la azoospermia (Durán del Campo, 1994; Fernández Abella, 2015). Pueden existir también coloraciones atípicas (rojizo, gris, marrón) que son indicio de infecciones o lesiones a nivel de pene o prepucio y en tal caso la muestra debe ser desechada (Cueto, Gibbons, Bruno-Galarraga & Fernández, 2016). En el Cuadro 1 observamos la relación entre el color del semen y la concentración espermática.

**Olor:** el olor del eyaculado se define como *sui generis*, cualquier olor anormal que se perciba puede ser indicativo de infección o contaminación con orina (Fernández Abella, 2015).

**pH:** oscila entre 6,3 a 7,2 (Fernández Abella, 2015) y puede ser medido con papel indicador.

**Cuadro 1.** Determinación de la concentración espermática a través del color del eyaculado (Adaptado de Olivera, Gil, Fierro & Minteguiaga, 2019).

Tonalidad	Concentración estimada (millones/ml)	Escala	Uso
Cremoso espeso	4500-6000	5	Utilizable
Cremoso	3500-4500	4	Utilizable
Crema liviana	2500-3500	3	Utilizable
Lechoso	1000-2500	2	Descarte
Turbio	300-1000	1	Descarte
Acuoso	Insignificante	0	Descarte

#### Determinaciones microscópicas:

Las determinaciones microscópicas comprenden la evaluación de la motilidad masal, motilidad individual, concentración, morfología y vitalidad espermática, algunas de estas variables se determinan con microscopio óptico y otras con sistema de análisis computarizado CASA (Computer Assisted Sperm Analysis; por sus siglas en inglés).

Las determinaciones con el CASA posibilitan el análisis de muchas características funcionales, morfológicas y cinéticas de los espermatozoides (Quintero-Moreno et al., 2011), mitigando el factor subjetivo de la evaluación seminal proveniente de la evaluación visual del técnico (Moussa, Martinet, Trimeche, Tainturier & Anton, 2002). Esta técnica puede ser utilizada tanto para muestras de semen fresco como de semen congelado.

**Motilidad de masa espermática:** valora la formación y progresión de las ondas producidas por el desplazamiento de los espermatozoides. Debe ser evaluada inmediatamente luego de la colección de la muestra en condiciones isotérmicas y sin diluirlo (Duran del Campo, 1980; Evans & Maxwell, 1989). Dichas ondas se observan en eyaculados de alta concentración espermática especialmente en ovinos (Evans & Maxwell, 1990). Se puede hacer una evaluación primaria a simple vista en la propia copa o tubo de recolección. Sin embargo, se recomienda evaluarla mediante microscopio óptico a 4-10x. Para ello se coloca una gota de semen fresco y puro sobre un cubreobjetos templado a 37 °C. Debemos saber que es una medida subjetiva y la escala utilizada va de 0 a 5, donde 5 se corresponde con muy buena motilidad espermática y 0 con motilidad espermática nula (Cuadro 2). La clasificación está condicionada según la concentración de espermatozoides del eyaculado, la motilidad individual y vigor de los mismos. Lo recomendable es que el eyaculado tenga como mínimo una motilidad de masa espermática de 3.

**Motilidad individual:** refiere al desplazamiento de los espermatozoides y es un parámetro de referencia a la hora de evaluar calidad seminal debido a su asociación con su capacidad fertilizante (Evans & Maxwell, 1990; Pomerol & Arrondo, 1994). La motilidad individual se expresa como el porcentaje de espermatozoides con movimiento en una muestra de semen previamente diluida en una solución isosmótica

(Evans & Maxwell, 1989). Se estima un semen con motilidad aceptable o muy buena aquel que presenta entre 60 y 90% (Sorensen, 1982). El movimiento de los espermatozoides puede clasificarse en: a) progresivo o rectilíneo, cuando los espermatozoides se desplazan hacia adelante; b) de retroceso y en zigzag (cuando el desplazamiento de los espermatozoides es oscilante, se desplaza de manera curvilínea algunas veces y otras el desplazamiento es en retroceso, estos movimientos anormales pueden deberse a defectos de la cola), c) movimiento oscilatorio (el espermatozoide gira sin avanzar y presenta reducidos movimientos, precede a la inmovilización), d) movimiento vibratorio (movimiento a modo de vibración que frecuentemente describen una trayectoria circular) (Fernández Abella, 2015).

**Cuadro 2.** Escala de Motilidad de masa espermática adaptada de Evans & Maxwell, (1987).

Valor	Clase	Descripción
5	Muy buena	Ondas densas con movimiento muy rápido. No se observan spz individuales, 90% o más de los spz activos.
4	Buena	Ondas y remolinos vigorosos de menos velocidad que la clase anterior, 75-80% de los spz activos.
3	Aceptable	Ondas con movimiento lento, se observan spz individuales, 50-60% de spz activos.
2	Pobre	No se visualizan ondas, se observan movimientos espermáticos, 20-40% de los spz están vivos y su motilidad individual es escasa.
1	Muy pobre	Solo el 10% de los spz muestran signos vitales.
0	Muertos	Ausencia de movimiento, 0% de spz vivos.

La evaluación visual de la motilidad espermática individual a través de microscopio óptico es el método más sencillo, barato y rápido. Sin embargo, es un método subjetivo y por tanto dependiente en gran medida de la habilidad y experiencia del observador (Phillips, McGowan, Johnston & Mayer, 2004); asimismo depende de la concentración espermática de la muestra que se observe, en caso de alta concentración tiende a sobreestimarse la motilidad.

En la actualidad, la evaluación de la motilidad espermática seminal puede ser realizada con el sistema CASA en donde en función de su progresividad, los espermatozoides se clasifican en: estáticos, motiles progresivos y mótils no progresivos. Adicionalmente este sistema posibilita la valoración de la calidad del movimiento espermático generando los siguientes parámetros: velocidad curvilínea, velocidad lineal, velocidad media, que se definirán a continuación:

- ✓ Velocidad curvilínea (VCL), distancia recorrida por el espermatozoide en su trayectoria real en función del tiempo de captura considerado, como medida de la vigorosidad del espermatozoide [ $\mu\text{m/s}$ ] (de Monserrat Vallvè, s/f).
- ✓ Velocidad lineal (VSL), distancia recorrida en línea recta por el espermatozoide entre el primer y el último punto de su trayectoria real, indicando el

desplazamiento neto de la célula en el tiempo considerado [ $\mu\text{m/s}$ ] (de Monserrat Vallvè, s/f).

- ✓ Velocidad media (VAP), trayectoria media del espermatozoide en el tiempo considerado. que se calcula como una interpolación entre los puntos correspondientes a la trayectoria de la VCL, en un intento de mejor aproximación al desplazamiento real de la célula [ $\mu\text{m/s}$ ] (de Monserrat Vallvè, s/f).

**Concentración seminal:** la concentración seminal se define como la cantidad de espermatozoides por unidad de volumen (mL). En carneros la concentración espermática normal oscila entre los 2000 a 3000 millones de spz/mL. Existen distintas técnicas para determinar la concentración entre las que se destacan cámara de Neubauer y fotómetros. Ambas son precisas, siendo el fotómetro más rápido en comparación al recuento en cámara de Neubauer, en contraposición, este último es un método menos costoso y, por tanto, más accesible (Gibbons et al., 1993).

- ✓ Cámara de conteo Neubauer: El semen se diluye en proporción 1:200 a 1:500, usando como diluyente suero fisiológico. Se aspira con pipeta una muestra de dicha solución y se procede a limpiar el extremo de la pipeta de manera de no alterar los resultados. Se procede a cargar la cámara, se coloca la pipeta en el borde del cubreobjetos y se dejan caer las gotas de semen y de tal forma la cámara se carga por capilaridad. Se debe esperar unos minutos así el semen sedimenta y luego se observa. En general, la cámara tiene dos compartimentos, con 5 cuadrados grandes en cada uno. Cada uno de los cuadrados grandes se divide en 16 cuadrados más pequeños, que se encuentran delimitados por líneas. En total, posee 160 cuadraditos ((5x16) x 2). La superficie total de la cámara es de  $1/2,5 \text{ mm}^2$ , la altura es de  $1/10 \text{ mm}$  y la dilución 1:200 o 1:500, por lo que la concentración se obtiene (millones por  $\text{mm}^2$ ) multiplicando el número de cuadrados grandes por el factor 5000. Para el conteo en cada cuadrado se consideran todas las cabezas de los espermatozoides que se encuentran dentro del cuadrado (Fernández Abella, 2015).
- ✓ Fotómetro: Esta técnica consiste en exponer la muestra de semen a un haz de luz y registrar la luz que absorbe, determina la absorbancia, directamente proporcional a la concentración espermática (Cueto et al., 2016). El fotómetro debe ser calibrado con 10 o 15 conteos en Cámara de Neubauer y la dilución con la que fue calibrado debe ser conocida (Fernández Abella, 2015).

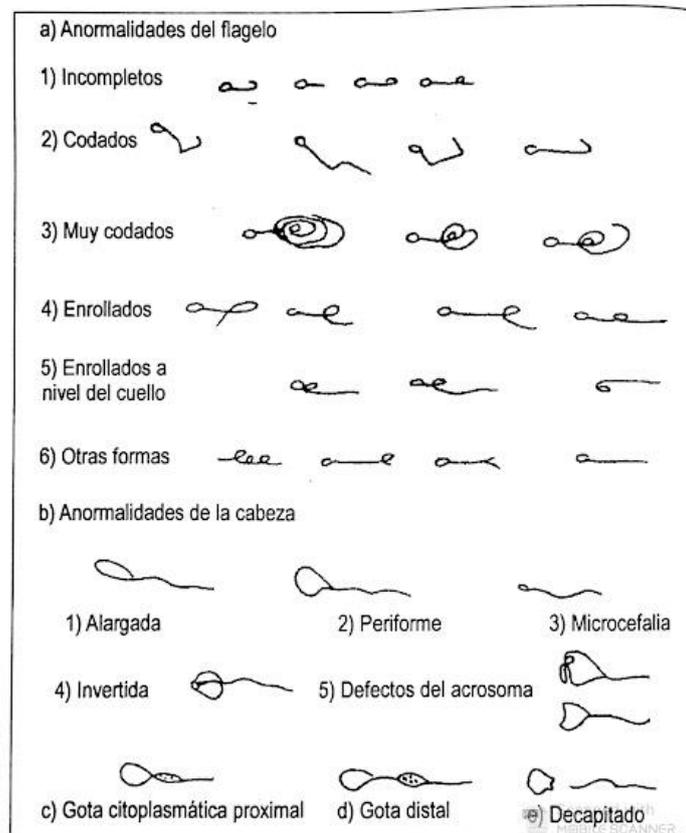
La concentración espermática también puede ser estimada mediante la utilización del sistema CASA, el cual mide la concentración mediante la aplicación de un software.

**Morfología:** existe una correlación negativa entre el porcentaje de anomalías y el poder fecundante de los espermatozoides por lo que es muy importante su evaluación (Fernández Abella, 2015). Un eyaculado con un porcentaje superior a 20% de formas anormales debería ser eliminado, con excepción de que predominen las anomalías de flagelo, las cuales se correlacionan en menor medida a la fertilidad (Fernández Abella, 2015).

Para la determinación de las anormales espermáticas es común la fijación en formol con 0,3 g de citrato de sodio dihidratado de una muestra de semen (sin tinción) para su posterior observación en microscopio con contraste de fase (Voglmayr, Chartier & Sawyer, 1983). Se han establecido distintas clasificaciones para las anomalías espermáticas, según distintos criterios:

- Primarias (si se originan en los túbulos seminíferos durante la espermatogénesis) o secundarias (si se originan durante el tránsito epididimario o tras la eyaculación) (Barth & Oko, 1989; Bloom, 1977).
- Mayores o menores: según si se relacionan con infertilidad o no respectivamente (Bloom, 1977).
- Según la región espermática implicada, entiéndase anomalías de cabeza, pieza intermedia o cuello y cola o flagelo (Figura 1).

Cualquier anomalía, sea primaria o secundaria, si afecta a un porcentaje considerable de espermatozoides puede comprometer la fertilidad del semen.



**Figura 1.** Principales anomalías morfológicas del semen de carnero, clasificadas según región espermática. Fuente: Fernández Abella, 2015.

**Vitalidad – Integridad de membrana:** esta característica se evalúa mediante el test de hipo-osmosis (HOST por su denominación en inglés hypo-osmotic swelling test). Es una prueba sencilla y económica que se basa en las propiedades físicas y bioquímicas de la membrana plasmática del espermatozoide, cuya permeabilidad y

resistencia se correlacionan positivamente con la capacidad fertilizante del espermatozoide. Se introducen los espermatozoides en una solución hipo-osmótica; en células sanas, produce el desplazamiento de agua desde el medio interno al exterior para así lograr el equilibrio osmótico (Eckert, Randall & Auoustitne, 1989). Este fenómeno desencadena cambios morfológicos en la cola del espermatozoide, la cual se curva y enrolla. Si estos cambios no se producen se interpreta que la membrana plasmática ha sufrido algún tipo de alteración en su integridad. La técnica se puede hacer a través de microscopía con contraste de fases o con contadores electrónicos (Vázquez, 1980).

#### **4.4 Fisiología endócrina de la reproducción del carnero**

El desarrollo, coordinación y función del aparato reproductor del carnero está regulado por un complejo eje neuro-endocrino que involucra estructuras anatómicas, glándulas y sus hormonas (Rubianes, 2000). La base de la regulación neuro-endócrina es el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (Pacheco & Quirino, 2010). El hipotálamo secreta, en forma pulsátil, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) la cual actúa a nivel de la adenohipófisis estimulando la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) por las células gonadotropas (Fernández Abella, 1993). Ambas hormonas hipofisarias son volcadas a la circulación y regulan la producción de gametos y hormonas testiculares (Hafez & Hafez, 2002).

En los machos de todas las especies, la FSH actúa sobre las células germinales de los túbulos seminíferos del testículo (Fernández Abella, 1993) y es responsable de la espermatogénesis (Hafez, 1993). La LH actúa a nivel de las células de Leydig, las cuales se encuentran formando parte del intersticio testicular, estimulando la producción de andrógenos, principalmente testosterona (Hafez & Hafez, 2002; Neill., 2006). En este mismo orden de ideas, existe una estrecha vinculación entre la secreción de LH y la de testosterona (Hochereau de Reviers et al., 1980; Lee et al., 1976; Savoie et al., 1979), así, los pulsos de LH provocan un aumento de testosterona plasmática. La regulación de la secreción, tanto de LH como de testosterona, está dada por un sistema de retroalimentación negativo entre estas. Es decir que, altas concentraciones de testosterona inhiben directamente la secreción de GnRH en el hipotálamo y por tanto se inhibe también la liberación de LH (Hafez & Hafez, 2002).

Específicamente la testosterona es vital para el proceso de espermatogénesis, además de cumplir otros importantes roles en la reproducción, ya que está involucrada en el desarrollo del macho, mantenimiento de la libido, actividad secretoria de las glándulas anexas y con rasgos corporales asociados a la masculinidad (Ungerfeld, 2012). En tal sentido se requiere de una determinada concentración plasmática de dicha hormona para el correcto desarrollo de los animales, tanto en la pubertad, como para la expresión de la conducta sexual del macho y el mantenimiento de la libido en los machos adultos (Pacheco & Quirino, 2010; Perkins & Roselli, 2007). Por ejemplo, en machos cabríos las concentraciones circulantes de testosterona aumentan durante la estación reproductiva, lo que provoca cambios en el comportamiento que facilitan el cortejo y la cópula (Delgadillo, Gelez, Ungerfeld, Hawken & Martin, 2009). Existen reportes en ovinos de que la restricción de hormonas sexuales (GnRH, LH y testosterona) en borregos enteros prepúberes reduce el desarrollo e inhibe casi por

completo la libido de los mismos (Brown, 1994). Los reportes de Orihuela (2014) señalan que el implante de testosterona a nivel hipotalámico restaura la conducta copulatoria suprimida en carneros adultos castrados, asimismo se demostró que la inyección exógena de testosterona en carneros castrados restaura el patrón completo de cortejo masculino (Banks, 1964). En carneros, Yarney & Sandford (1983) sugieren que la LH y testosterona están involucradas en el proceso de erección y en la eyaculación. En adición, en machos cabríos se ha descubierto que la testosterona cumple un rol determinado en la erección, eyaculación y autourinación (proceso particular de esta especie) (Fritz et al., 2019). En humanos, se ha demostrado que la testosterona regula la actividad de ciertas enzimas involucradas en la contractilidad de los músculos del tracto genital masculino (Morelli et al., 2004) y se sugiere que esta hormona sensibiliza dichas enzimas y da una respuesta eyaculatoria más rápida.

En cuanto a la composición y calidad del semen existen reportes en toros, en donde se demuestra que la testosterona participa en la síntesis de algunas proteínas plasmáticas seminales (Kasimanickam, Kasimanickam, Kastelic, & Stevenson, 2013). En humanos, se han observado receptores de andrógenos en los espermatozoides (Aquila et al., 2007; Solakidi, Psarra, Nikolaropoulos & Sekeris, 2005). En este sentido, se han reportado correlaciones positivas entre la concentración de testosterona y la concentración espermática, porcentaje de motilidad de los espermatozoides y volumen del eyaculado en carneros (Kishk, 2008).

En el carnero, la reproducción también está influenciada por factores genéticos y ambientales (Hafez & Hafez, 2004). Desde el punto de vista ambiental, el fotoperíodo y la consecuente secreción de melatonina (Lincoln, 1976; Pelletier & Ortavant, 1975) ajustan el ritmo reproductivo endógeno a un período de 365 días (Malpoux, Thiéry & Chemineau, 1999). El efecto de este fenómeno se refleja en variaciones estacionales y diarias en las concentraciones de hormonas hipofisarias y gonadales. Respecto a las variaciones estacionales, estudios realizados en Uruguay sobre carneros de distintas razas reportan que, si bien existen diferencias en el período estacional para cada una de ellas, a nivel general, existe un período de mayor actividad sexual (tanto comportamental como fisiológico) que se extiende aproximadamente desde fines de diciembre a junio (Gastel et al., 1995; Pérez-Clariget, Forsberg, López, & Castrillejo, 1998; Ungerfeld, 2012).

#### **4.5 Patrón de variación diario del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal: Efecto sobre la concentración de testosterona, la conducta sexual, proceso eyaculatorio y calidad seminal**

En los seres vivos existen ritmos circadianos, es decir que se repiten con una periodicidad de 24h, los cuales se fundamentan en un sistema de sincronización internalizado que regula los procesos celulares, conductuales y fisiológicos de los organismos con los cambios del ambiente y los ajusta a determinados momentos del día (Refinetti, 2016). A nivel del hipotálamo existe un reloj interno, el núcleo supraquiasmático, el cual coordina y sincroniza los ritmos circadianos de todo el organismo en respuesta a las señales ambientales, principalmente ciclo luz/oscuridad (Refinetti, 2016).

En este orden de ideas, la melatonina es una hormona que actúa como mediador hormonal entre la información lumínica, el sistema nervioso central y el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal) (Malpaux, 2006). Independiente de las variaciones estacionales de concentración que experimenta, la melatonina también se secreta con un ritmo circadiano. En algunas especies como equinos, ovinos y caprinos presenta una acrofase nocturna (Carcangiu et al., 2014), es decir que, durante las horas de oscuridad, la concentración de melatonina es mayor y disminuye a valores basales durante la fase lumínica del día (Malpaux, Skinner & Maurice, 1995; Malpaux, Vigui, Skinner, Thiéry & Chemineau, 1997). En este sentido entre los sistemas que están bajo la influencia de los ritmos circadianos se encuentra el sistema reproductivo, tanto de hembras como de machos. La mayoría de la bibliografía estudia la influencia de la ritmicidad circadiana en humanos y animales experimentales, principalmente roedores, especies en las cuales existe suficiente evidencia sobre la expresión de genes de reloj en el tejido reproductivo lo que sugiere su implicancia sobre la fertilidad y patrones comportamentales (Kennaway, 2005; Li et al., 2022; Liang et al., 2013; Sen & Hoffmann, 2020). No obstante, existen algunos trabajos en animales de producción que reportan la existencia de patrones circadianos y su influencia en la regulación del funcionamiento, por ejemplo, del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal.

En tal sentido según Ortavant et al. (1982), en ovinos, la disminución de la concentración de melatonina al amanecer, es decir, al inicio de la fase lumínica del día, actúa como sincronizador de la actividad gonadotropa, estimulando la secreción de FSH, LH y testosterona. Los recientes reportes de Pinto-Santini et al. (2022) constatan un patrón de variación diario de la concentración de testosterona en carneros, donde la máxima concentración se produce aproximadamente entre 9 y 10 h (fase acrofase) después del amanecer en Uruguay (independientemente del momento del año). En tal sentido la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH y testosterona son bajas en las primeras horas de la mañana (Lincoln & Peet, 1977; Ortavant et al., 1982) y experimentan su acrofase durante la tarde y las primeras horas de la noche (ovinos: Lincoln et al. 1977; ovinos y bovinos: Perumal et al. 2021).

Aunque se desconoce la función fisiológica del incremento de testosterona al final de la tarde e inicios de la fase de oscuridad, algunos autores señalan que podría asociarse con el inicio del período de descanso y de la menor actividad de los carneros (Lincoln & Peet, 1977), esto es, que la testosterona modularía los patrones de conducta (ciclo actividad: reposo) de los carneros (Pinto-Santini et al., 2022). Sin embargo, existe sólida evidencia acerca de la implicancia de los ritmos circadianos en la reproducción de los machos de distintas especies. Por ejemplo, en ratas, se ha demostrado que la mutación en genes relacionados con el reloj circadiano influye en la expresión de la masculinidad (Liang et al., 2013). En humanos, la acrofase de testosterona se presenta en las primeras horas de la mañana (Bribiescas, & Hill, 2010; Lacerda, Kowarski, Johanson, Athanasiou & Migeon, 1973) momento en el cual, la calidad seminal es superior en dicha especie (Xie, Utzinger, Blickenstorfer & Leeners, 2018). Con base en esto, podría pensarse que el patrón de variación diario de la concentración de testosterona de los carneros podría modificar tanto la calidad seminal como mejorar la conducta general de cortejo y cópula de los carneros.

Orihuela et al. (2023) reportaron escasas diferencias en los resultados de la recolección de semen con EE y las características del semen según la hora de la

colecta. En tal sentido, reportaron que el tiempo de recolección fue menor cuando se colecta semen por la tarde y, además, se presenta una ligera mejoría en las características del semen fresco (mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva al mediodía). Este trabajo fue realizado utilizando EE y, hasta donde puede conocerse, es el primer reporte de variaciones en la calidad seminal de los carneros de acuerdo a la hora de la colecta de semen. La colecta con EE, además de ser una experiencia estresante para el animal, puede modificar algunas características del semen como el volumen y la concentración (Abril-Sánchez et al., 2019; Hulet, Foote & Blackwell, 1964). Es posible que los pocos cambios reportados en la calidad seminal se asocien a que la intensidad de los pulsos eléctricos producidos por la EE es superior a la que pudiera provocar el incremento natural de la concentración de testosterona al final de la fase diurna del día. La colecta de semen con VA, por su gran similitud con la vagina de la hembra, puede permitir a los machos expresar mejor los posibles cambios fisiológicos y conductuales que presuntamente podrían estar modulados por los patrones de variación diario de la concentración de testosterona.

Adicionalmente, si bien existe evidencia en carneros a cerca de la influencia del ritmo circadiano sobre algunos comportamientos por ejemplo comportamiento locomotor (Abecia, Palacios, Plaza & Canto, 2023), no hay reportes que evidencien cambios en la expresión de la conducta de monta y cópula y calidad del eyaculado de acuerdo a la hora de colecta ya sea con EE o con VA. Con base en lo anteriormente descrito es que resulta interesante evaluar si el momento del día en que se colecta el semen de los carneros con VA afecta la expresión de la conducta de monta y cópula y la calidad seminal.

## **5. HIPÓTESIS**

La colecta de semen en carneros al anochecer con vagina artificial tiene una influencia positiva sobre la expresión de comportamientos sexuales y la calidad del semen fresco.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

Comparar el comportamiento sexual y la calidad del semen fresco de los carneros cuando se colecta con vagina artificial en la mañana o en el anochecer.

### **6.2 Objetivos específicos:**

- Determinar si el momento del día en que se colecta semen de carneros con VA tiene influencia en la expresión de su comportamiento sexual.
- Determinar si el momento del día en que se colecta semen de carneros con VA produce cambios:
  - en las características macroscópicas del semen colectado (volumen y motilidad masal) y,
  - en las características microscópicas del semen colectado (concentración del eyaculado, integridad de membrana, morfología espermática y características cinemáticas de motilidad espermática).

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

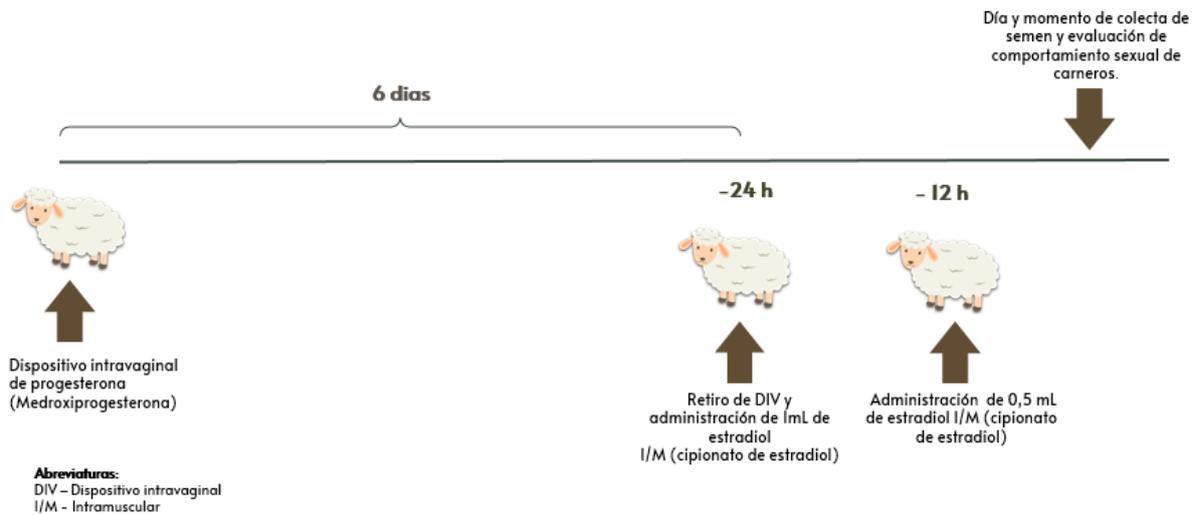
### 7.1 Ubicación y manejo general de los animales

Los procedimientos experimentales utilizados en este trabajo fueron aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Veterinaria (CEUA-FVET-1652). El experimento se llevó a cabo en la sede central de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República (UdelaR), en las instalaciones para animales de la Unidad Académica de Fisiología; durante el mes de febrero de 2023 (mediados del verano, estación reproductiva). Se utilizaron 16 carneros de la raza Corriedale, adultos (edad: entre 4 y 8 años), con un peso promedio de  $82,5 \pm 5$ kg, andrológicamente aprobados y previamente entrenados a la colecta de semen con vagina artificial.

Los carneros permanecieron en un corral cuya superficie era de 500 m<sup>2</sup>, constituido por un área techada de 100 m<sup>2</sup> de piso de concreto y un área con pasto natural de 400 m<sup>2</sup>. El manejo alimenticio de los carneros durante el período experimental según sus requerimientos de mantenimiento (NRC, 2007) fue: suministro de 0,9 kg/animal/d de fardo de alfalfa a las 6:00 h y suministro de 0,8 kg/animal/d de concentrado comercial (90 % MS; 16% PC) a las 15:00 h, los animales contaron con agua ad libitum.

Previo a iniciar el experimento, a todos los carneros se les realizó la limpieza de las puntas quemadas de la región abdominal y periferia del pene, utilizando una máquina de esquila (Heiniger, modelo BS84S). Este procedimiento tuvo la finalidad reducir la potencial contaminación de las muestras de semen, con materiales adheridos a la lana en la zona considerada, durante las colectas. Además, a todos los carneros se les realizó una colecta inicial de semen, cuya evaluación no se incluyó en este trabajo, con la finalidad de detectar posibles situaciones de impotencia coeundi, retomar el adiestramiento y, renovar las reservas espermáticas antes del experimento.

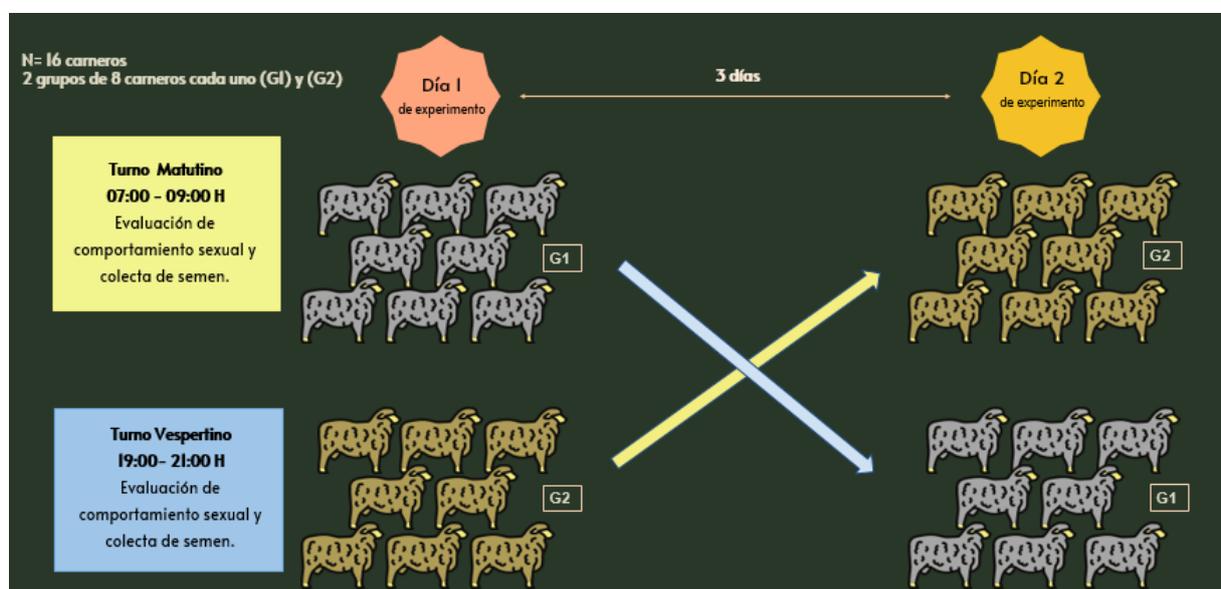
Para garantizar que, para los días y momentos de colecta de semen de los carneros, hubiera dos ovejas en celo, se sincronizó el celo de ocho hembras. El protocolo de sincronización fue corto (6 días) y consistió en la aplicación de un dispositivo intravaginal de progesterona (medroxiprogesterona, Sincrovin, Santa Elena, Montevideo, Uruguay) durante 6 días y la administración de 1 mL de estradiol y luego 0,5 mL de estradiol intramuscular (cipionato de estradiol, Cipiosyn, Zoetis, Argentina; utilizado con autorización del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca para trabajos experimentales) (24 h y 12 h antes de la colecta, respectivamente) (Figura 2).



**Figura 2.** Diagrama del protocolo de sincronización de celo empleado en el experimento

## 7.2 Diseño experimental y tratamientos

Bajo un diseño de cuadrado latino, se evaluó el comportamiento sexual de los carneros, previo a la colecta, y se obtuvieron las muestras de semen en dos días distintos. Los carneros que fueron evaluados el primer día de colecta en la mañana, posteriormente fueron evaluados el segundo día de colecta al anochecer y viceversa (Figura 3). Entre cada colecta hubo 3 días de separación. Los tratamientos fueron los turnos de colecta: a) matutino: entre las 07:00 y las 09:00 h (mañana) y, b) vespertino: entre las 19:00 – 21:00 h (anocheecer).



**Figura 3.** Diagrama del diseño experimental utilizado en el experimento.

### **7.3 Comportamiento sexual**

El comportamiento sexual de los carneros frente a las hembras en celo se determinó mediante inspección visual inmediatamente previo a la colecta. Para ello una oveja en celo era introducida en el corral de colecta (2 m x 3 m) antes del ingreso del carnero. Al ingresar el carnero, un observador entrenado registró los siguientes comportamientos: número de olfateos ano-genitales, flehmen, acercamientos laterales, intentos de monta y montas sin eyaculación. Se registró el tiempo desde que el carnero ingresaba al corral de colecta hasta que efectuaba una monta completa. El estudio de estas variables se ajustó al tiempo que duro la colecta, por lo cual se expresan como frecuencias, las cuales se obtuvieron dividiendo el número de observaciones de cada comportamiento entre el tiempo de colecta de cada carnero en forma individual. En este caso, la unidad de comparación es equivalente a 1 s es decir, los resultados se expresan como número de veces que el carnero es observado efectuando el comportamiento en cada segundo.

### **7.4 Calidad seminal**

La calidad seminal del semen fresco se determinó inmediatamente después de cada colecta, asegurando que, durante el transporte de la muestra desde el sitio de colecta al laboratorio, se conservara la temperatura y condiciones de oscuridad adecuadas, para la misma.

La calidad seminal fue determinada en el Laboratorio de Fisiología. Se evaluó, subjetivamente, la motilidad espermática masal (escala de 0 a 5) inmediatamente luego de la colecta (Evans & Maxwell, 1987). Para ello se utilizó un microscopio óptico de contraste de fase 40X (Nikon Eclipse E200, China) con platina térmica acoplada. Seguidamente, se determinó el volumen del eyaculado con micropipetas y la concentración espermática (espectrofotómetro; SDM1, Minitube, Francia).

Luego de esto se diluyó la muestra de semen con diluyente comercial (Andromed, Minitube, Alemania) y se determinó con el uso de un sistema de análisis de semen computarizado (ISAS, España), las siguientes variables de motilidad espermática: porcentaje de espermatozoides motiles, porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, porcentaje de espermatozoides estáticos. También se determinó: velocidad curvilínea, velocidad lineal y velocidad promedio y además cada una de estas se determinó para espermatozoides rápidos, medios y lentos.

Por otro lado, se fijaron alícuotas de semen en formol citrato para la determinación subjetiva del porcentaje de espermatozoides con morfología normal, se hizo énfasis en la medición de espermatozoides con colas dobladas simples, la misma es una anomalía morfológica secundaria inherente al proceso de eyaculación (Jeyendran et al., 1984). Además, se determinó el porcentaje de espermatozoides con funcionalidad de membrana mediante el test de hipo-osmosis (HOST) Con la información anterior se calculó el total de espermatozoides en el eyaculado (volumen x concentración), así como el número total de espermatozoides motiles (porcentaje de espermatozoides móviles x número de espermatozoides eyaculados), y el número de espermatozoides con motilidad progresiva eyaculados (porcentaje de

espermatozoides con motilidad progresiva x cantidad total de espermatozoides eyaculados).

### **7.5 Análisis estadístico**

Todos los datos se analizaron utilizando modelos mixtos (SAS On Demand for Academics). Se incluyó como efecto fijo la hora de colecta de semen: mañana y anochecer (tratamientos), y como efecto aleatorio el día de colecta y el carnero. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P \leq 0,05$  y como tendencias cuando  $0,05 < P \leq 0,1$ .

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Comportamiento sexual

En el Cuadro 3 se presentan los resultados de la duración de la colecta y las frecuencias en las que los carneros expresaron cada comportamiento de monta evaluado. Al anochecer, los carneros tendieron a efectuar más acercamientos laterales en comparación con la mañana (P= 0,06). El resto de las variables evaluadas no fueron afectadas por el momento de la colecta.

**Cuadro 3.** Frecuencias de los comportamientos de monta de los carneros cuando se colecta semen con vagina artificial en dos momentos del día: en la mañana (07:00 - 09:00 h) y al anochecer (19:00 – 21:00 h).

	Mañana	Anochecer	EE	P
Duración de colecta con vagina artificial (s)	61,0	60,0	10,3	ns
Número de olfateos ano-genitales	0,1	0,1	0,01	ns
Número de Flehmen	0,001	0,008	0,004	ns
Número de Acercamientos laterales	0,06	0,08	0,02	0,06
Intentos de monta	0,01	0,01	0,003	ns
Montas sin eyaculación	0,05	0,06	0,01	ns

### 8.2 Semen fresco

En el Cuadro 4 se presentan los resultados de la evaluación de las características del semen fresco. El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva tendió a ser mayor al anochecer (P=0,07). El resto de las variables estudiadas no fueron modificadas por la hora de la colecta. En el Cuadro 5 se presentan las velocidades de los espermatozoides del semen fresco. La velocidad rectilínea lenta tiende a ser mayor al anochecer (P= 0,09), en tanto no se observaron diferencias significativas entre ambos horarios para el resto de las velocidades evaluadas.

**Cuadro 4.** Características del semen fresco de carneros recolectado con vagina artificial en dos momentos del día: en la mañana (07:00 – 09:00 h) y al anochecer (19:00-21:00 h).

	Mañana	Anochecer	EE	P
Motilidad masal (0-5)	3,2	3,0	0,3	ns
Volumen del eyaculado (ml)	1,3	1,3	0,1	ns
Concentración del semen ( $\times 10^6$ )	7904,3	8020,4	655,0	ns
Espermatozoides motiles (%)	75,2	78,3	3,1	ns
Espermatozoides con motilidad progresiva (%)	53,1	60,0	2,6	0,07
Espermatozoides con integridad de membrana (%)	74,1	70,1	6,1	ns
Espermatozoides de morfología normal (%)	80,3	78,5	3,0	ns
Espermatozoides con colas dobladas simples (%)	12,1	15,0	2,8	ns
Número total de espermatozoides eyaculados ( $\times 10^6$ )	10828	11103	1401,4	ns
Número total de espermatozoides motiles ( $\times 10^6$ )	7902,0	8501,2	1034,2	ns
Número total de espermatozoides con motilidad progresiva ( $\times 10^6$ )	5585,3	6484,0	788,0	ns
Número total de espermatozoides con integridad de membrana ( $\times 10^6$ )	7396,3	7070,0	909,0	ns
Número total de espermatozoides morfológicamente normales ( $\times 10^6$ )	8822,0	8801,4	1283,2	ns
Número total de espermatozoides con colas dobladas simples ( $\times 10^6$ )	1301,0	1407,0	280	ns

**Cuadro 5.** Velocidades registradas con sistema ISAS de semen fresco de carneros recolectado con vagina artificial en la mañana (07:00-09:00 h) y al anochecer (19:00 a 21:00 h).

	Mañana	Anochecer	EE	P
Velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ )	129,7	126,8	6,0	ns
Velocidad lineal ( $\mu\text{m/s}$ )	97,0	94,0	6,3	ns
Velocidad media de trayectoria ( $\mu\text{m/s}$ )	107,3	102,5	7,8	ns
Velocidad curvilínea lentos ( $\mu\text{m/s}$ )	15,0	16,1	4,5	ns
Velocidad curvilínea medios ( $\mu\text{m/s}$ )	36,3	37,0	5,0	ns
Velocidad curvilínea rápidos ( $\mu\text{m/s}$ )	137,0	134,0	3,5	ns
Velocidad rectilínea lentos ( $\mu\text{m/s}$ )	7,0	9,2	2,0	0,09
Velocidad rectilínea medios ( $\mu\text{m/s}$ )	23,3	24,0	3,4	ns
Velocidad rectilínea rápidos ( $\mu\text{m/s}$ )	103,1	100,0	5,0	ns
Velocidad promedio lentos ( $\mu\text{m/s}$ )	8,4	11,0	2,4	ns
Velocidad promedio medios ( $\mu\text{m/s}$ )	26,0	26,2	4,0	ns
Velocidad promedio rápidos ( $\mu\text{m/s}$ )	114,0	109,0	6	ns

## **9. DISCUSIÓN**

La hora de la colecta de semen con vagina artificial no modificó la conducta sexual ni la calidad del semen de los carneros. De acuerdo al patrón de variación diario en la concentración de testosterona, hormona relacionada tanto con la conducta como con la calidad del semen de los carneros, se esperaba que los resultados fueran superiores al anochecer, sin embargo, esta hipótesis no pudo ser comprobada. No obstante, hubo una tendencia a un mayor número de acercamientos laterales del carnero hacia la hembra y un mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y velocidad rectilínea de espermatozoides lentos cuando la colecta se efectuó al anochecer.

La habituación de los carneros a las colectas en la mañana, práctica común en la mayoría de establecimientos y en estos carneros en particular, pudo influir en las respuestas obtenidas. En humanos, por ejemplo, la acrofase de testosterona se presenta en la mañana, pero no se asocia con el momento de mayor actividad sexual, la cual ocurre mayoritariamente a la hora de dormir. Diversos estímulos ambientales y la habituación a los horarios de las actividades cotidianas (trabajo, tiempos de ocio, momentos para socializar) muchas veces no se corresponden con los ciclos endógenos (Refinetti, 2005). En este sentido, es posible que el manejo al que estaban acostumbrados estos carneros haya producido un efecto de habituación en los mismos, que pudo haber enmascarado los efectos que los patrones endógenos, en este caso el patrón de variación diario de testosterona, presumiblemente tengan sobre las variables estudiadas.

El patrón de variación diario de la concentración de testosterona de los carneros, independientemente de la estación del año, se presenta ~9 h después del amanecer (entre las 15:00-16:00 h) (Pinto-Santini et al., 2022). En el presente trabajo la colecta se efectuó al anochecer, es decir, después de la hora en que se reporta la acrofase de la testosterona en la especie. Probablemente, colectas vespertinas, más cercanas al atardecer, permitirían evidenciar el posible efecto de la testosterona en las variables evaluadas. No obstante, independientemente del patrón de variación diario de la concentración de testosterona, la estacionalidad reproductiva puede también ser parte de la explicación de los resultados obtenidos. En ese sentido, la concentración de testosterona, independientemente de la hora del día, es superior en la estación reproductiva que en la estación no reproductiva (Pérez-Clariget, Forsberg, López, & Castrillejo, 1998). Lo anterior podría significar que, durante la estación reproductiva, los patrones de variación diarios, aunque existentes, revisten menor importancia en la modulación de la actividad reproductiva de los carneros que en otros momentos del año.

Por último, es importante destacar que los resultados de calidad seminal, aunque solo fueron una tendencia, van en la misma dirección de lo reportado previamente por Orihuela et al. (2023). En dicho trabajo, se reporta un ligero aumento tanto en motilidad progresiva de los espermatozoides como en velocidad rectilínea de espermatozoides lentos en colectas efectuadas en el horario vespertino mediante EE.

## **10. CONCLUSIÓN**

Durante la estación reproductiva, la hora de la colecta de semen con vagina artificial no modificó el comportamiento sexual ni la calidad seminal de los carneros. Sin embargo, se observó una tendencia a un mayor despliegue de la conducta sexual (acercamientos laterales) y sobre la cinética de los espermatozoides (motilidad progresiva y velocidad rectilínea lenta de los mismos) al anochecer. Los cambios no permiten sugerir modificar la hora de colecta en la especie.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Abecia J. A., Palacios C., Plaza J., & Canto F. (2023 mayo). Actigraphy reveals higher circadian activity in light-induced sexually active rams in spring than in rams subjected to the natural photoperiod. En *US Precision Livestock Conference*, Knoxville.
- Abril-Sánchez, S., Freitas-de-Melo, A., Giriboni, J., Santiago-Moreno, J., & Ungerfeld, R. (2019). Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: a review on welfare problems and alternative techniques. *Animal Reproduction Science*, 205, 1-9.
- Aquila, S., Middea, E., Catalano, S., Marsico, S., Lanzino, M., Casaburi, I., ...Andò, S. (2007). Human sperm express a functional androgen receptor: effects on PI3K/AKT pathway. *Human Reproduction*, 22(10), 2594-2605.
- Austin, J., Hupp, E., & Murphree, R. (1961). Comparison of quality of bull semen collected in the artificial vagina and by electroejaculation. *Journal Dairy Science*. 44(12), 2292-2297.
- Austin, J.W., Leidy, R.B., Krise, G.M., & Hupp, E.W. (1968). Normal values for semen collected from Spanish goats by two methods. *Journal of Applied Physiology*, 24, 369-372.
- Banks, E.M. (1964). Some aspects of sexual behavior in domestic sheep, *Ovis aries*. *Behavior*, 23, 249-279.
- Barth, A.D., & Oko, R.J. (1989). *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa: Iowa State University Press.
- Bloom, E. (1977). Sperm morphology with reference to bull infertility. En *First India Symposium of Animal of Reproduction* (pp. 61-81). Ludhiana.
- Bonadonna, T. (1986). *Reproducción Animal e Inseminación Artificial* (T. 1). Buenos Aires: Hemisferio Sur.
- Breedlove, S. M., & Arnold, A. P. (1980). Hormone accumulation in a sexually dimorphic motor nucleus of the rat spinal cord. *Science (New York, N.Y.)*, 210(4469), 564-566.
- Bribiescas, R.G., & Hill, K.R., 2010. Circadian variation in salivary testosterone across age classes in ache amerindian males of Paraguay. *American Journal of Human Biology*, 22, 216-220.
- Brown, B. W. (1994). A review of nutritional influences on reproduction in boars, bulls and rams. *Reproduction Nutrition, Development*, 34(2), 89-114.
- Carcangiu, V., Luridiana, S., Mura, M. C., Parmeggiani, A., Giannetto, C., Congiu, F., & Piccione, G. (2014). Melatonin circadian rhythm in three livestock species maintained in the same housed conditions. *Biological Rhythm Research*, 45(6), 909-914.
- Cueto, M., Gibbons, A., Bruno-Galarraga, M.M., & Fernández, J. (2016). *Manual de obtención. Procesamiento y conservación del semen ovino* (2ª ed.). San Carlos de Bariloche: INTA.
- De Graaf, S., Rickard, J., Pini, T., Maddison, J., Druart, X., & Emerging, L.T. (2014). Roles of Seminal Plasma in Sperm Function. En *9th Biennial Conference of the 50 Association for Applied Animal Andrology* (pp. 93-101). Newcastle.
- De Monserrat Vallvè, J. (s/f). *CASA, análisis de semen automatizado: aplicabilidad y tendencias de futuro*. Seqc.es. Recuperado de <https://www.seqc.es/download/tema/14/4437/6279335/3122415/cms/tema-8-casa-analisis-de-semen-automatizado-aplicabilidad-y-tendencias-de-futuro.pdf/>

- Delgadillo, J.A., Gelez, H., Ungerfeld, R., Hawken, P.A.R., & Martin, G.B. (2009). The "male effect" in sheep and goats - Revisiting the dogmas. *Behavior Brain Research*, 200(2), 304-314.
- Duran Del Campo, A. (1980). *Anatomía, fisonomía de la reproducción e inseminación artificial en ovinos*. Montevideo: Hemisferio Sur.
- Duran del Campo, A. (1994). *Manual práctico de reproducción e inseminación artificial en ovinos*. Montevideo: Hemisferio Sur.
- Eckert, R., Randall, D., & Auoustitne, O. (1989). *Fisiología animal*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Evans, G., & Maxwell, W. (1987). *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Sydney: Butterworths.
- Evans, G., & Maxwell, W. (1989). *Manejo y valoración del semen; inseminación artificial de ovejas y cabras*. Zaragoza: Acribia.
- Evans, G., & Maxwell, W. (1990). *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. Zaragoza: Acribia.
- Fernández Abella., D.H. (1993). Evaluación de las variaciones estacionales en la producción espermática de cuatro razas. *Boletín Técnico de Ciencias Biológicas*, 3, 23-34.
- Fernández Abella., D.H. (2015). *Tecnologías reproductivas bovinas y ovinas*. Montevideo: Hemisferio sur.
- Fritz, W. F., Jr, Sena, L. S., Becker, S. E., & Katz, L. S. (2019). Differential effects of androgens, estrogens and socio-sexual context on sexual behaviors in the castrated male goat. *Hormones and Behavior*, 109, 10-17.
- Garner, D., & Háfiez, E. (2000). Spermatozoa and Seminal Plasma. En E.S.E. Háfiez and B. Háfiez (Eds.), *Reproduction in farm animals* (7<sup>th</sup> ed., pp. 96-109). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Company.
- Gastel, M.T., Bielli, A., Pérez, R., López, A., Castrillejo, A., Tagle, R., ... Rodriguez-Martinez, H. (1995). Seasonal variations in testicular morphology in Uruguayan Corriedale rams. *Animal Reproduction Science*, 40, 59-75.
- Gibbons, A., Cueto, M., García Vinent, J., Wolff, M., & Arrigo, J. (1993). *Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino*. Bariloche: INTA.
- Giuliano, S., Director, A., Gambarotta, M., Trasorras, V., & Miragaya, M. (2008). Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (lama glama). *Animal Reproduction Science*, 104, 359-369.
- Hafez, E. (1989). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. México: Interamericana.
- Hafez, E. S. (1993). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. México: McGraw-Hill.
- Hafez, B., & Hafez, E.S. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales* (7<sup>a</sup> ed.). México. McGraw-Hill Interamericana.
- Hafez, E., & Hafez, B. (2004). *Reproducción e Inseminación artificial en animales*. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Hochereau de Reviers, M. D., Blanc M. R., Courrot M., Garnier D. H., Pelletier J., & Poirier J. C. (1980). Hormonal profiles and testicular parameters in the lamb. En *Testicular development, structure and function* (pp. 237-247). New York: Raven Press.
- Hulet, C. V., Foote, W. C., & Blackwell, R. L. (1964). Effects of natural and electrical ejaculation on predicting fertility in the ram. *Journal of Animal Science*, 23(2), 418-424.

- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & 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. *Reproduction*, 70(1), 219-228.
- Kasimanickam, V.R., Kasimanickam, R.K., Kastelic, J.P., & Stevenson, J.S. (2013). Associations of adiponectin and fertility estimates in Holstein bulls. *Theriogenology*, 79, 766-777.
- Kennaway, D. J. (2005). The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Human Reproduction Update*, 11(1), 91-101.
- Kishk, W.H. (2008). Interrelationship between ram plasma testosterone level and some semen characteristics. *Slovak Journal of Animal Science*, 41(2), 67-71.
- Lacerda, L.D., Kowarski, A., Johanson, A.J., Athanasiou, R., & Migeon, C.J. (1973). Integrated concentration and circadian variation of plasma testosterone in normal men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 37(3), 366-371.
- Lacuesta, L., Orihuela, A., & Ungerfeld, R. (2015). Reproductive development of male goat kids reared with or without permanent contact with adult females until 10 months of age. *Theriogenology*, 83, 139-143.
- Lee V. W., Cumming I. A., De Kretser D. M., Findlay J. K., Hudson B., & Keogh E. J. (1976). Regulation of gonadotrophin secretion in rams from birth to sexual maturity. *Journal of Reproduction and Fertility*, 46, 1-6.
- Li, T., Bai, Y., Jiang, Y., Jiang, K., Tian, Y., Gu, J., & Sun, F. (2022). The potential impacts of circadian rhythm disturbances on male fertility. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 1001316.
- Liang, X., Cheng, S., Jiang, X., He, X., Wang, Y., Jiang, Z., ... Wang, Z. (2013). The noncircadian function of the circadian *Clock* gene in the regulation of male fertility. *Journal of Biological Rhythms*, 28(3), 208-217.
- Lincoln, G.A. (1976). Seasonal variation in the episodic secretion of luteinizing hormone and testosterone in the ram. *Journal of Endocrinology*, 69, 213-226.
- Lincoln, G. A., & Peet, M. J. (1977). Photoperiodic control of gonadotrophin secretion in the ram: a detailed study of the temporal changes in plasma levels of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone following an abrupt switch from long to short days. *Journal of Endocrinology*, 74(3), 355-367.
- Lincoln, G. A., Peet, M. J., & Cunningham, R. (1977). Seasonal and circadian changes in the episodic release of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in rams exposed to artificial photoperiods. *Journal of Endocrinology*, 72(3), 337-349.
- Malpaux B. (2006). Seasonal regulation of reproduction in mammals. En *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (3<sup>a</sup> ed., pp. 2231-2281) St. Louis: Academic.
- Malpaux, B., Skinner, D.C., & Maurice, F. (1995). The ovine pars tuberalis does not appear to be targeted by melatonin to modulate luteinizing hormone secretion, but may be important for prolactin release. *Journal Neuroendocrinology*, 7, 199-206.
- Malpaux B., Thiéry J.C., & Chemineau P. (1999, noviembre). From the eye to the pituitary: pathways controlling seasonal reproduction. En *Annual ESDAR Conference* (pp. 8-14). Angers.
- Malpaux, B., Vigui, C., Skinner, D.C., Thiéry, J.C., & Chemineau, P. (1997). Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Research Bulletin*, 44, 431-438.

- Mattner, P.E., & Voglmayr, J.K. (1962). A comparison of ram semen collected by the artificial vagina and by electro-ejaculation. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 2, 78-81.
- Memon, M.A., Bretzlaff, J.K.N., & Ott, R.S. (1986). Comparison of semen collection techniques in goats. *Theriogenology*, 26(6), 823-827.
- Morelli, A., Filippi, S., Mancina, R., Luconi, M., Vignozzi, L., Marini, M., ...Maggi, M. (2004). Androgens regulate phosphodiesterase type 5 expression and functional activity in corpora cavernosa. *Endocrinology*, 145(5), 2253-2263.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., & Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57(6), 1695-1706.
- Neill, DJ. (2006). *Knobil & Neill's Physiology of Reproduction* (3<sup>a</sup> ed.). St Louis: Academic Press.
- Olivera Muzante, J., Gil Laureiro, J., Fierro Fernández, S., & Minteguiaga, M. (2019). *Manual básico para la inseminación artificial en ovinos*. Paysandú: Uruguay.
- Orihuela Trujillo, A. (2014). La conducta sexual del carnero: Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 5(1), 49-89.
- Orihuela, J.C., Pinto-Santini, L., Beracochea, F., Giriboni, J., Viera, MN, Silveira, P. & Ungerfeld, R. (2023). Time of day modified the time required for semen collection with electroejaculation and slightly affected the quality of fresh semen in rams. *Tropical Animal Health and Production*, 55, 144.
- Ortavant, R., Daveau, A., Garnier, D. T., Pelletier, J., De Reviers, M. M. & Terqui, M. (1982). Diurnal variation in release of LH and testosterone in the ram. *Reproduction*, 64(2), 347-353.
- Pacheco, A., & Quirino, C.R (2010). Comportamento sexual em ovinos. *Revista Brasileira de Reproducción Animal*, 34, 87-97.
- Pelletier, J., & Ortavant, R. (1975). Photoperiodic control of LH release in the ram. *Acta Endocrinológica*, 78(3), 442-450.
- Pérez-Clariget, R., Forsberg, M., López, A., & Castrillejo, A. (1998). Effects of nutrition on seasonal changes in scrotal circumference, testosterone and pituitary responsiveness to exogenous GnRH in Corriedale rams. *Small Ruminant Research*, 29, 61-69.
- Perkins, A., & Roselli C.E. (2007). The ram as a model for behavioral neuroendocrinology. *Hormonal Behavior*, 52(1), 70-77.
- Perumal, P., De, A.K., Alyethodi, R.R., Savino, N., Khate, K., Vupru, K. & Khan, M.H. (2021). Daily and seasonal rhythmic secretory pattern of endocrinological profiles in Mithun bull. *Theriogenology*, 166, 46-54.
- Phillips, N.J., McGowan, M.R., Johnston, S.D., & Mayer, D.G. (2004). Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. *Animal Reproduction Science*, 81, 47-46.
- Pinto-Santini, L., Pérez-Clariget, R., & Ungerfeld, R. (2022). Does the metabolic and behavior daily variation pattern on rams differ in summer and winter? *Biological Rhythm Research*, 54(2), 213-231
- Pomerol, J.M., & Arrondo J.L. (1994). *Práctica andrológica*. Barcelona: Masson-Salvat.
- Quintero-Moreno, A., Rubio-Guillén, J., González-Villalobos, D., Gutiérrez, J.C., Madrid-Bury, N., & López-Brea, J.J. (2011). Identification of cryodamage on plasma membrane integrity in bull spermatozoa and its relationship with field fertility. *Revista Científica (Universidad de Zulia)*, 21(5), 403-407.

- Refinetti, R. (2005). Time for sex: nycthemeral distribution of human sexual behavior. *Journal of Circadian Rhythms*, 3(4), <https://doi.org/10.1186/1740-3391-3-4>
- Refinetti, R. (2016). *Circadian Physiology* (3ª ed.). Boca Ratón: CRC.
- Roberts, S.J. (1979). *Obstetricia veterinaria y patología de la reproducción*. Buenos Aires: Hemisferio Sur.
- Rubianes, E. (2000). Avances en el conocimiento de la fisiología ovárica de los pequeños rumiantes y su aplicación para el manejo reproductivo. Fisiología ovárica y manejo reproductivo. *Actas de Fisiología*, 6, 93-103.
- Savoie, S., Forest, M. G., Bourel, B., Saez, J. M., Collu, R., Bertrand, J., & Ducharme, J. R. (1979). Perinatal activity of the hypothalamic-pituitarygonadal axis in the lamb. I. Circulating levels of LH, FSH, prolactin and testosterone and in vivo response to hCG in the first two months of life. *Biology of Reproduction*, 21, 1051-1056.
- Sen, A., & Hoffmann, H. M. (2020). Role of core circadian clock genes in hormone release and target tissue sensitivity in the reproductive axis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 501, 110655.
- Solakidi, S., Psarra, A. G., Nikolaropoulos, S., & Sekeris, C. E. (2005). Estrogen receptors A and B (ERA and ERB) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERB and AR in mitochondria of the midpiece. *Human Reproduction*, 20(12), 3481-3487.
- Sorensen, A.M.J. (1982). Evaluación de la aptitud reproductiva. En *Reproducción animal* (pp. 1-125). Mexico: Graw-Hill.
- Sylla, L., Palombi, C., Stradioli, G., Vagniluca, A., & 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(5), 779-785.
- Troedsson, M., Desvouses, A., Alghamdi, A., Dahms, B., Dow, C., Hayna, J., ... Buhi W. (2005). Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*, 89, 171-186.
- Ungerfeld, R. (2011). *Reproducción en los animales domésticos* (Vol. 1). Montevideo: Melibea.
- Ungerfeld, R. (2012). Seasonal reproductive patterns and effectiveness as teasers (ram effect) of Corriedale and Milchschaaf rams. *Animal Production Science*, 52(11), 1036.
- Vázquez I. (1980). *Nuevos métodos de valoración del semen en reproductores ovinos y porcinos* (Tesis doctoral). Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de León.
- Voglmayr, J. K., Chartier, D. M., & Sawyer, R. F., Jr. (1983). Viability of ram testicular spermatozoa following cryopreservation in rete testis fluid. *Cryobiology*, 20(4), 421-431.
- Xie, M., Utzinger, K. S., Blickenstorfer, K., & Leeners, B. (2018). Diurnal and seasonal changes in semen quality of men in subfertile partnerships. *Chronobiology International*, 35(10), 1375-1384.
- Yarney, T. A., & Sanford, L. M. (1983). The reproductive-endocrine response of adult rams to sexual encounters with estrual ewes is season dependent. *Hormones and Behavior*, 17(2), 169-182.