

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DEL AGREGADO DE PLASMA SEMINAL EN
DILUYENTES CON TRIS-YEMA DE HUEVO PARA SEMEN OVINO
REFRIGERADO

por

Hernán José BUENO LARROQUE

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO
URUGUAY
2015

Tesis aprobada por:

Director:

Dr. M. V. Germán A. López

Dra. M. V. Raquel Pérez Clariget

Ing. Agr. Raúl W. Ponzoni

Fecha: 26 de marzo de 2015.

Autor:

Hernán José Bueno Larroque

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. M. V. Germán A. López, Dra. M. V. Raquel Pérez Clariget, Ing. Agr. Raúl W. Ponzoni, por la dirección de este trabajo.
- Al personal tanto de campo como de laboratorio de la Estación Experimental Prof. Bernardo Rosengurtt por ayudarnos a lo largo de todo el trabajo de campo de la tesis.
- Al personal de biblioteca por facilitarnos el acceso a varios artículos que permitieron el desarrollo del presente trabajo.
- A la Lic. Sully Toledo por la corrección de la tesis
- A todos aquellos tanto familiares como amigos que de una forma u otra colaboraron en la realización del presente trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1. SEMEN Y ESPERMATOZOIDES.....	3
2.2. PLASMA SEMINAL (PS).....	3
2.3. ESPERMATOGÉNESIS Y CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.....	5
2.4. ESTÍMULO SEXUAL Y APAREAMIENTO.....	6
2.5. FACTORES QUE INFLUYEN LA PRODUCCIÓN DEL SEMEN.....	6
2.6. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CONSERVACIÓN ESPERMÁTICA.....	7
2.6.1. <u>Temperatura</u>	8
2.6.2. <u>Presión osmótica</u>	8
2.6.3. <u>pH</u>	9
2.6.4. <u>Luz</u>	9
2.6.5. <u>Impurezas y bacterias</u>	9
2.6.6. <u>Exposición al aire</u>	9
2.6.7. <u>Contacto con metal</u>	10
2.7. COLECCIÓN DE SEMEN.....	10
2.8. VALORACIÓN DEL SEMEN.....	11
2.8.1. <u>Evaluación <i>in vitro</i></u>	12
2.8.1.1. Volumen.....	12
2.8.1.2. Concentración espermática.....	12
2.8.1.3. Motilidad.....	13
2.8.1.4. Morfología.....	14
2.8.1.5. HOST y ORT.....	14
2.8.2. <u>Evaluación <i>in vivo</i></u>	15
2.9. CONSERVACIÓN DEL SEMEN.....	15
2.9.1. <u>Refrigerado</u>	16
2.9.2. <u>Diluyentes</u>	16

2.9.3. <u>Adición de plasma seminal (PS)</u>	17
2.9.4. <u>Biología funcional de las proteínas del plasma seminal o RSPs</u>	19
2.10. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL (IA).....	19
2.11. HIPÓTESIS.....	20
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	21
3.1. LOCALIZACIÓN Y ANIMALES.....	21
3.2. COLECCIÓN Y EVALUACIÓN DE SEMEN.....	21
3.3. DILUYENTES, OBTENCIÓN DEL PLASMA Y PROCESAMIENTO DEL SEMEN.....	22
3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL, TRATAMIENTOS Y MEDIDAS.....	23
3.4.1. <u>Experimento No.1 (Exp.1)</u>	23
3.4.2. <u>Experimento No.2 (Exp.2)</u>	23
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	24
4. <u>RESULTADOS</u>	28
4.1. EXPERIMENTO 1.....	28
4.1.1. <u>Estadísticas descriptivas</u>	28
4.1.2. <u>Efecto tratamiento y carnero</u>	29
4.2. EXPERIMENTO 2.....	30
4.2.1. <u>Estadísticas descriptivas</u>	30
4.2.2. <u>Efecto tratamiento y carnero</u>	32
4.2.2.1. Endósmosis.....	32
4.2.2.2. Tasa de preñez.....	34
5. <u>DISCUSIÓN</u>	35
5.1. TAMAÑO MÍNIMO DE MUESTRA.....	37
6. <u>CONCLUSIONES</u>	39
7. <u>RESUMEN</u>	40
8. <u>SUMMARY</u>	41
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	42

LISTA DE CUADROS

Cuadro No.	Página
1. Número de eyaculados (n), concentración espermática (espermatozoides/ml) y desvío estándar (DE) de los carneros utilizados en el experimento 1.....	28
2. Número de observaciones (n), media (\bar{x}), mínimo (m), máximo (M), desvío estándar (DE), coeficiente de variación (CV) de motilidad progresiva (%) y endósmosis (%) del experimento 1.....	28
3. Resultados del análisis de varianza del experimento 1..	29
4. Medias de mínimos cuadrados (error standard) de motilidad (%) y endósmosis (%) del experimento 1.....	30
5. Número de eyaculados (n), concentración espermática (espermatozoides/ml) y desvío estándar (DE) de los carneros utilizados en el experimento 2.....	31
6. Número de observaciones (n), media (\bar{x}), mínimo (m), máximo (M), desvío estándar (DE), coeficiente de variación (CV) de la tasa de preñez (%) y endósmosis (%) del experimento 2.....	31
7. Resultados del análisis de varianza de endósmosis del experimento 2.....	32
8. Medias de mínimos cuadrados (error standard) de endósmosis (%) del experimento 2.....	33
9. Medias de mínimos cuadrados (error standard) de tasa de preñez del experimento 2.....	34

1. INTRODUCCIÓN

La Inseminación Artificial (IA) es una de las biotecnologías reproductivas de mayor impacto a nivel nacional e internacional. Permite realizar un uso más intensivo del semen, siendo más eficiente la utilización de sementales de alto mérito genético. En la especie ovina, Uruguay utiliza la IA desde la década del 40 (Durán del Campo, 1993), siendo uno de los países pioneros por su temprana aplicación a gran escala. La técnica que permitió la difusión de la IA a nivel nacional fue la pericervical utilizada con semen fresco. La IA en ovinos tiene como limitante los bajos resultados de fertilidad obtenidos cuando se utiliza semen congelado e IA pericervical (Maxwell y Salamon, 1993). Esta limitación, dificulta los programas de mejoramiento genético en la especie, pero la aparición de la técnica de IA por laparoscopia permitió tener resultados satisfactorios utilizando semen congelado (Evans y Maxwell, 1989). Sin embargo, la laparoscopia, es una técnica relativamente costosa, compleja y no siempre disponible para todos los productores (Maxwell et al., 2006) por lo que su difusión no ha alcanzado los elevados niveles de aplicación que se habían logrado en los programas de IA con semen fresco aplicado por vía pericervical.

En el Grupo Disciplinario de Fisiología y Reproducción de la UdelaR. Facultad de Agronomía, se lleva adelante una línea de investigación sobre conservación de semen ovino que ha estudiado alternativas a esta problemática centrandose el interés en el semen refrigerado. La utilización de semen refrigerado y almacenado por 24 horas puede ser en algunos casos una opción al uso de semen congelado, ya que permite obtener mejores resultados de fertilidad, aunque sin alcanzar los del semen fresco utilizando la IA pericervical (Maxwell y Salamon 1993, Fernández Abella et al. 2006, Gundogan et al. 2010). Por otro lado, la utilización de semen refrigerado puede ser en Uruguay una buena opción, considerando las distancias relativamente cortas y la red de carreteras lo que permitiría trasladar el semen refrigerado dentro de 24 horas a prácticamente cualquier lugar del país.

El semen de carnero es sensible a la refrigeración y sufre daños estructurales que pueden afectar la motilidad y morfología espermáticas (López et al. 1999, Barrios et al. 2000). Durante el procesamiento del semen refrigerado se puede provocar desestabilización de las membranas espermáticas induciendo capacitación y reacción acrosómica prematuras en el

espermatozoide, de esa manera reduciendo su vida fértil (Watson 1995, Salamon y Maxwell 2000). Estos efectos son acompañados por una caída en la sobrevivencia espermática en el tracto de la oveja con la consiguiente reducción de la fertilidad y un incremento en la mortalidad embrionaria. De todas formas, estos efectos son menos pronunciados con el semen refrigerado que con el congelado (Maxwell y Salamon, 1993). Por otra parte, la refrigeración del semen es una etapa previa a la congelación, es decir que reducir el daño ocurrido durante el enfriamiento del semen también provocaría un menor daño en el semen congelado. Se han utilizado diferentes ingredientes incorporados a los diluyentes para disminuir el daño que produce el descenso de temperatura en el semen refrigerado, tales como el glicerol (Gil et al., 2011), GSH antioxidantes (Mata-Campuzano et al., 2014), lecitina de soja (Khalifa et al., 2013). Desde hace algunos años se ha prestado atención a los efectos que ejerce el plasma seminal (PS) sobre la viabilidad espermática y las tasa de preñez cuando es añadido a los diluyentes para semen refrigerado o congelado. En la literatura se presentan efectos tanto benéficos como adversos del PS sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides preservados de varias especies (Maxwell et al., 2006). Sin embargo, nuestro equipo ha encontrado mejoras en la tasa de preñez utilizando semen ovino refrigerado por vía pericervical (López Pérez y Pérez-Clariget, 2012).

La información disponible sobre los efectos de diferentes porcentajes de PS en el diluyente es escasa, a pesar de que esta información sería de importancia cuando se formulan diluyentes para semen. Por otra parte, el PS, su composición y sus posibles interacciones con las membranas espermáticas que podrían explicar, al menos en parte, sus efectos, es tema de investigación actual (Maxwell et al. 2006, Muiño-Blanco et al. 2008, Leahy y de Graaf 2012).

El objetivo de la tesis es evaluar el efecto de distintos niveles (0, 30 y 50%) de PS homólogo a un diluyente en base a Tris-yema de huevo, sobre la viabilidad espermática, estimada por la prueba de endósmosis (HOST) y el porcentaje de preñez del semen de carnero refrigerado a 5°C durante 24 horas, utilizado en IA pericervical.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. SEMEN Y ESPERMATOZOIDES

El semen es un fluido generado en el aparato reproductor del macho, compuesto por los gametos masculinos o espermatozoides y el plasma seminal (Evans y Maxwell, 1989). Los espermatozoides son células altamente especializadas, producidas en los túbulos seminíferos de los testículos. Cada célula espermática se encuentra formada por cabeza, cuello y cola. La cabeza es plana y en casi su totalidad está ocupada por el núcleo; su forma y tamaño varía según la especie (Salisbury et al., 1978). La parte anterior de la cabeza está cubierta por una caperuza, denominada acrosoma, la misma contiene las enzimas necesarias para el proceso de fertilización (Evans y Maxwell, 1989). El cuello o zona de implantación conecta la cabeza con la pieza media de la cola. En situaciones estresantes esta región puede sufrir lesiones, produciéndose una ruptura y determinando la separación de la cabeza y cola (Salisbury et al., 1978). La cola es similar a un flagelo, siendo responsable de proporcionar movimiento de propulsión en medios líquidos. Se puede dividir en tres piezas fundamentales: la pieza media, la principal y la terminal. La cola está constituida por 9 pares de fibras contráctiles periféricas y un par central, estas dan lugar al movimiento de la cola. La pieza media es la región más gruesa de la cola, está provista de una hélice de mitocondrias rodeando las fibras contráctiles y aporta la energía para el movimiento. La pieza principal está revestida por una vaina fibrosa y constituye la fracción más larga de la cola. Finalmente, la pieza terminal es relativamente corta y carece de vaina fibrosa (Salisbury et al., 1978). La energía requerida para mantener la motilidad y viabilidad de los espermatozoides procede de los azúcares, en mayor proporción de la fructosa, presente en el PS.

2.2. PLASMA SEMINAL (PS)

En el momento de la eyaculación, los espermatozoides almacenados en la cola del epidídimo alcanzan la uretra peneana pasando a través del conducto deferente, el ámpula y la uretra pélvica. En este recorrido se agrega a los espermatozoides la secreción de las glándulas anexas del aparato reproductor: ámpula, glándulas vesiculares, próstata y glándulas bulbouretrales. El conjunto de estas secreciones constituye el PS (Leahy y de Graaf, 2012). Por lo que,

entonces, el PS es una mezcla de las secreciones de la rete testis, el epidídimo y las glándulas anexas del tracto reproductivo del macho, componentes que intervienen en la regulación de la función espermática.

El PS es un líquido neutro e isotónico, cuya composición es compleja e interviene en la regulación de las funciones espermáticas. Sus funciones incluyen ser vehículo y activador de los espermatozoides, proporcionar un medio rico en nutrientes y un sistema amortiguador de pH, el que se mantiene muy cercano a 7, de esta forma colabora en mantener la supervivencia de los espermatozoides después de que son depositados en el aparato genital de la hembra (Maxwell et al., 2006). El PS es también un medio que no permite la capacitación espermática hasta el momento de contacto del espermatozoide con el tracto de la hembra (Maxwell et al., 2006). El PS inhibe o estimula la función espermática a través de sus constituyentes inorgánicos y orgánicos, sin embargo, se cree que su acción principal está mediado por sus proteínas y la interacción de estas con la membranas del espermatozoide (Cardozo et al. 2009, Leahy y de Graaf 2012).

La composición del PS varía según las especies debido a la diferente contribución relativa de las glándulas anexas (Mann, 1964). En el carnero las glándulas vesiculares son grandes al igual que en el toro, pero la próstata, el ámpula y las glándulas bulbouretrales son relativamente pequeñas, aportando un volumen menor al PS respecto a otras especies, por ejemplo el cerdo, determinando un eyaculado más concentrado (Maxwell et al., 2006). Esto determina que en el PS del carnero el aporte de las glándulas vesiculares sea un componente constitutivo relativamente mayor que en otras especies (Leahy y de Graaf, 2012). La secreción de las glándulas vesiculares es la secreción más abundante de las glándulas anexas. Está constituida por componentes orgánicos e inorgánicos, estos últimos se encuentran en menor proporción, aunque existen cantidades considerables de sodio, potasio y cloro. Como componentes orgánicos se destacan las proteínas, fructosa y ácido cítrico (Salisbury et al., 1978). La próstata secreta un líquido viscoso que limpia y lubrica la uretra, a la vez que aumenta ligeramente el volumen del semen. Finalmente, los espermatozoides llegan al pene, siendo expulsados durante la eyaculación por la uretra peneana (Sorensen 1982, Hafez y Hafez 2004).

Las principales moléculas orgánicas presentes en el semen ovino son fructosa, sorbitol, inositol, ácido cítrico, glicerilfosforilcolina, fosfolípidos, prostaglandinas y diversas proteínas. La fructosa, derivada de la glucosa de la sangre, es el azúcar más fácilmente metabolizable y constituye la principal fuente de energía para los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1989). El estudio de las proteínas del PS ha tenido un gran desarrollo en los últimos tiempos. Soleilhavoup et al. (2014) identificaron más de 700 proteínas en el PS de carnero. Si bien estos autores han identificado algunas de estas proteínas como asociadas a mayor o menor fertilidad, el conocimiento que hoy se tiene sobre las funciones de estas proteínas es escaso, las propiedades bioquímicas y biofísicas aún no están precisamente descritas.

2.3. ESPERMATOGÉNESIS Y CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

La espermatogénesis es el proceso de formación de los espermatozoides e integra dos partes: la espermatocitogénesis y la espermiogénesis. La primera comienza con la espermatogonia, en donde a través de sucesivas mitosis y un proceso de reducción cromosómica, la meiosis, termina en una célula haploide llamada espermátida. El segundo proceso no involucra división celular alguna, sino la transformación de una célula redonda a una célula altamente especializada y flagelada que es el espermatozoide. Este proceso se lleva a cabo en los tubos seminíferos dentro de los testículos, una vez finalizado pasan hacia la rete testis y posteriormente a los conductos eferentes, desembocando en la cabeza del epidídimo. En la cabeza y el cuerpo del epidídimo el espermatozoide sufre transformaciones conocidas como proceso de maduración espermática, en la que los espermatozoides adquieren motilidad y poder fecundante perdiendo la gota citoplasmática para luego ser almacenados en la cola de epidídimo (Salisbury et al., 1978).

Sin embargo, en los mamíferos, el semen fresco recién eyaculado es incapaz de fertilizar al óvulo. Los espermatozoides adquieren esta capacidad durante su recorrido dentro del aparato genital femenino. Este proceso se le llama Capacitación Espermática (Hafez, 1989) y consiste en una serie de transformaciones de las membranas celulares que preparan a los espermatozoides para la reacción acrosómica, proceso por el cual el acrosoma libera las enzimas que contiene dando inicio a la fertilización.

La conservación del semen (enfriado o congelado) puede determinar una capacitación prematura de los espermatozoides que provoca que al momento de alcanzar el lugar de la fertilización, los espermatozoides ya no mantengan su capacidad fertilizante. Este es un proceso relativamente frecuente en los espermatozoides de carnero y explicaría al menos parcialmente la dificultad para obtener buenos resultados de preñez con semen ovino conservado (Watson, 1995).

2.4. ESTÍMULO SEXUAL Y APAREAMIENTO

La presencia de una hembra en celo aumenta la actividad sexual del macho, quien procura montar a la hembra. Antes de la monta se observan escurrimientos de líquidos, provenientes de las glándulas anexas, a través de la vaina prepucial. Una vez que el pene penetró la vagina, sobreviene rápidamente en el carnero, un movimiento de propulsión, llamado “golpe de riñón”, acompañado por la eyaculación y luego la desmonta (Hintz et al. 1987, Hafez y Hafez 2004). La eyaculación puede ser inhibida por factores externos (presencia de personas extrañas, fallos en la preparación de la vagina artificial dados por la temperatura y presión) o patológicos (adherencias en el pene, enfermedades) (Melling y Alder, 2000).

2.5. FACTORES QUE INFLUYEN LA PRODUCCIÓN DEL SEMEN

La producción y la calidad del semen de carnero son influenciadas por factores ambientales como el fotoperiodo, la nutrición y la temperatura, factores genéticos como la raza y el individuo, y por factores fisiológicos como la edad (Fiser y Fairfull, 1983).

Los cambios estacionales del fotoperiodo son los principales determinantes de la actividad reproductiva en los ovinos (Lincoln y Short, 1980), aunque sus efectos varían de acuerdo a la raza y a la latitud donde se encuentra el carnero. Sin embargo, la sensibilidad del macho ovino a la variación de las horas luz no es tan marcada como en las hembras. En Uruguay, las células sexuales se producen todo el año (Pérez-Clariget et al., 1997), aunque los carneros Corriedale y Merino presentan un ciclo estacional caracterizado por lograr la máxima circunferencia escrotal al final del verano, una reducción en otoño, alcanzando el mínimo al inicio del invierno. La

circunferencia escrotal permanece en sus valores más bajos hasta el inicio de la primavera cuando comienza nuevamente a crecer (Pérez-Clariget et al., 1997). También la morfología espermática es influida por la época del año. En nuestras condiciones los carneros Corriedale presentan la menor incidencia de anomalías en otoño tardío e invierno (Pérez-Clariget et al. 1997, López Pérez y Pérez-Clariget, 2012). Este tipo de comportamiento estacional de la reproducción del macho ovino ha sido demostrado también por investigadores a distintas latitudes y utilizando carneros de diferentes razas (Aller et al. 2012, Sarlós et al. 2013).

La nutrición también tiene un efecto marcado sobre la producción de semen en los carneros, en forma especial sobre la cantidad de espermatozoides por eyaculado (Kheradmand et al., 2006). Según Martin y Walkden-Brown (1995) la nutrición influye sobre el tamaño testicular y por ende en la tasa de producción de semen. Los efectos de la nutrición son más o menos importantes dependiendo de las razas y de la latitud en que se encuentren los carneros. En los carneros Corriedale un mayor plano nutricional modula pero no revierte el efecto del fotoperiodo (Pérez Clariget et al., 1997).

La temperatura ambiente también puede afectar la espermatogénesis en los carneros. Las altas temperaturas afectan los distintos estadios de la espermatogénesis, así como la maduración en el epidídimo. La degeneración espermática puede observarse a tan solo quince días de la exposición y reflejarse en el eyaculado durante dos meses. Cuanta más alta es la temperatura y la duración del periodo del estrés térmico, mayor será el daño en la espermatogénesis producido (Fernández Abella, 1987).

2.6. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CONSERVACIÓN ESPERMÁTICA

El semen es muy sensible a los cambios ambientales por lo que una vez fuera del tracto reproductivo masculino es imprescindible tomar medidas preventivas para conservarlo en buenas condiciones. A continuación se mencionan los factores ambientales que más comprometen la supervivencia del espermatozoide.

2.6.1. Temperatura

La temperatura del semen del carnero al momento de la eyaculación es de aproximadamente 37°C (Hafez, 1989). El metabolismo de los espermatozoides es fuertemente alterado por los cambios de temperatura. La exposición del semen a temperaturas superiores aumenta el ritmo metabólico de la célula. En estas condiciones las reservas de energía se agotan rápidamente y aumenta la concentración en el medio de los productos finales del metabolismo pudiendo comprometer la capacidad amortiguadora del PS. Temperaturas superiores a 40°C provocan la muerte de los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1989). Por otro lado, un descenso de temperatura reduce el metabolismo y produce alteraciones en la morfología espermática, fundamentalmente en la cola. Descensos de temperaturas bruscos con temperaturas ambientales por debajo de los 10°C, afectan drásticamente la viabilidad de los espermatozoides. Este fenómeno es conocido como “choque o shock” de frío (Salisbury et al., 1978). Por lo que es imprescindible cuando se pretende enfriar a 2-5°C y congelar el semen, dotar al medio de sustancias protectoras (Evans y Maxwell, 1989). Por lo tanto, durante todos los procesos de manipulación en el que el semen no está protegido por el diluyente, se debe tener especial cuidado en no exponer al semen a cambios bruscos de temperatura.

2.6.2. Presión osmótica

La presión osmótica del PS es aproximadamente de 300mOsm/kg aunque se observan ligeras variaciones entre especies (Salisbury et al., 1978). Cambios en la osmolaridad del medio tienen impacto sobre la viabilidad espermática. Se debe evitar el contacto con medios cuya osmolaridad esté por encima o por debajo de la del PS. Los diluyentes deben ser isotónicos aunque se han estudiado diluyentes hipertónicos para la congelación de semen (López Pérez, 1987). Particularmente, cuando se manipula el semen se debe tener cuidado de no ponerlo en contacto con el agua. El agua es hipotónica con respecto al PS por lo que el contacto con la misma produce la lisis del espermatozoide, por lo que el agua se comporta como un agente espermicida. Los diluyentes para conservación de semen incorporan carbohidratos, no solo como fuente de energía, sino también por su rol en la osmolaridad de los medios.

2.6.3. pH

Cualquier sustancia externa o interna que supere la capacidad amortiguadora propia del semen tendrá un impacto negativo sobre la viabilidad del semen (Evans y Maxwell, 1989).

El pH del PS se mantiene muy próximo a 7,0 por un complejo sistema amortiguador. El PS tamponado protege a los espermatozoides de los cambios bruscos de pH que deteriorarían la supervivencia de las células espermáticas (Salisbury et al., 1978).

2.6.4. Luz

La luz solar directa es perjudicial para el semen. Una exposición corta a la misma puede reducir la viabilidad de los espermatozoides y si esa exposición se prolonga por 30-40 minutos, puede determinar la muerte celular (Evans y Maxwell, 1989). Por lo que durante la colección y traslado de semen, se debe tomar precauciones para no exponer el semen a la luz solar directa.

2.6.5. Impurezas y bacterias

Los contaminantes, dependiendo de su naturaleza (polvo, pelos, bacterias, orina), pueden ser más o menos nocivos para la viabilidad de los espermatozoides. Los microorganismos contaminantes compiten con los espermatozoides por las fuentes de energía y además producen catabolitos que afectan la sobrevivencia espermática, constituyéndose un riesgo a la hora de inseminar (Durán del Campo, 1993). Es imprescindible que el semen utilizado en la IA conserve su inocuidad, por lo que se recomienda el agregado de sustancias antibacterianas a los diluyentes para evitar la contaminación.

2.6.6. Exposición al aire

El oxígeno del aire incrementa la actividad metabólica de los espermatozoides, por lo que se acumula ácido láctico y disminuye el pH, lo que tiene un impacto negativo sobre la viabilidad espermática. Por otra parte, la

formación de sustancias reactivas al oxígeno (ROS), provoca alteraciones de los espermatozoides y sus membranas que finalmente ocasionan la muerte de muchos de ellos (Marti et al., 2007). Este aspecto se debe tener en cuenta en los procesos de manipulación del semen y la diseminación de enfermedades a través de semen.

2.6.7. Contacto con metal

El contacto con metales de cualquier tipo es peligroso para los espermatozoides. Por esta razón, se debe utilizar material de vidrio o sintéticos inertes para la colección y conservación de semen (Salisbury et al., 1978).

2.7. COLECCIÓN DE SEMEN

La colección de semen es el primer paso para la IA, permite evaluar y conservar el eyaculado obtenido. Para obtener eyaculados de óptima calidad biológica, es necesario que los sementales de los cuales se obtiene el semen, se encuentren en buenas condiciones sanitarias y nutricionales, además que el método empleado para la obtención sea aplicado correctamente (Pérez García 1958, Hafez 1989).

Los métodos de colección de semen se pueden dividir en dos grandes grupos: indirectos y directos (Fernández Abella, 1987). En la actualidad los métodos de mayor difusión y utilización son los directos: vagina artificial (VA) y electroeyaculador. Quedando en desuso los indirectos (por ejemplo obtención de semen de la vagina de una hembra recién copulada) debido a que no garantizaban una buena asepsia y cantidades adecuadas de semen (Salisbury et al. 1978, López Pérez 1987, Azzarini 1991).

El uso de la VA es de preferencia dada su rapidez y limpieza, logrando obtener un semen de mejor calidad que con electroeyaculación. Además no es estresante para el semental, permitiendo repetidas colecciones en el día (Evans y Maxwell, 1989). Es el método más fisiológico que se conoce y no presenta reparos desde el punto de vista del bienestar animal. Vera (2009), comparó diferentes métodos de colección de semen en carneros y llegó a la conclusión que la VA es el mejor método para la obtención de semen en el ganado ovino. La VA es una imitación de la vagina de la oveja, simula y proporciona los

estímulos que provocan la eyaculación: estímulo térmico, dado por la temperatura del agua en el interior de la cámara que posee la VA, y presión por los niveles de aire que se insuflan (López Pérez, 1987).

El volumen, concentración y consecuentemente el número de espermatozoides por eyaculado disminuyen con las sucesivas colectas. Sin embargo un régimen de 3-5 colecciones diarias, durante un período de 4-5 días, separados por períodos de 2-3 días de descanso no reducirá sensiblemente la cantidad y calidad del semen (Evans y Maxwell, 1989).

El otro método directo utilizado, aunque actualmente en controversia por consideraciones de bienestar animal, es el de estímulo eléctrico. Dicha metodología se basa en la estimulación eléctrica de los centros lumbares de la erección y eyaculación para obtener el semen. Existen diferentes tipos de estimuladores eléctricos, el más corriente que se conoce es el electroeyaculador que consiste en un electrodo bipolar de aplicación rectal (Evans y Maxwell, 1989). La electroeyaculación permite obtener semen de animales no entrenados a la vagina artificial, por lo cual es ampliamente utilizada para obtener muestras para la evaluación de sementales de campo y en especies no domésticas. Para evitar el sufrimiento de los animales se utilizan anestésicos.

2.8. VALORACIÓN DEL SEMEN

La evaluación de semen permite que sólo se procesen y almacenen aquellos eyaculados con alta probabilidad de fecundar (Elliot, 1978). Existen diversos análisis *in vitro* que se llevan a cabo en laboratorio y pruebas *in vivo*, en las que se prueba el semen a través de la IA. Las características de calidad que se valoran en el semen inmediatamente después de su obtención son: color, volumen, concentración, motilidad y morfología de los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1989). En la actualidad se cuenta con diversas técnicas que estiman la viabilidad espermática y que se utilizan para evaluar los espermatozoides después de los procesos de conservación. Luego de la colección, el primer elemento a observar es el color, que permite descartar eyaculados contaminados (como por ejemplo con orina y sangre) y sirve además como elemento que ayuda al diagnóstico.

2.8.1. Evaluación *in vitro*

2.8.1.1. Volumen

El volumen se determina inmediatamente después de colectado, se expresa en mililitros y se puede obtener directamente de la copa o tubo graduado que se utiliza en la colección. Se encuentra relacionado directamente con el número de dosis por eyaculado. El volumen normal de eyaculado por carnero adulto es de 0,5ml a 2ml y en carneros jóvenes de 0,5 a 0,7ml (López Pérez 1987, Hafez y Hafez 2004). Vázquez, citado por López Pérez (1987) encontró que el volumen del eyaculado está correlacionado positivamente ($r=0,68$, $P<0,0001$) con el número de dosis procesables.

2.8.1.2. Concentración espermática

El número de espermatozoides por mililitro de eyaculado define el número de hembras que pueden ser inseminadas. La concentración espermática está altamente correlacionada con el número de dosis ($r=0,75$; $P<0,01$; Vázquez, citado por López Pérez, 1987). El semen de carnero es altamente concentrado, la cantidad de espermatozoides/ml varía entre uno y seis millones de espermatozoides por mm^3 (López Pérez, 1987). Por debajo de un millón se considera de baja fertilidad (Fernández Abella, 1987). La concentración espermática de carneros sanos varía de acuerdo a la edad, la época del año y el plano nutricional. También se observan variaciones individuales y entre colecciones del mismo macho (Evans y Maxwell, 1989). Existen diversos métodos para evaluar la concentración espermática, entre los cuales se destaca el Método de Recuento Celular Directo. El mismo consiste en contar directamente el número de espermatozoides mediante un hemocitómetro o contador de células sanguíneas. La cámara de conteo es un porta objeto de vidrio grueso, provisto de dos retículas de conteo que varían en el diseño (Evans y Maxwell, 1989). El semen es diluido generalmente en una proporción 1:200 utilizándose un diluyente tal que permita inmovilizar a los espermatozoides para el conteo y dispersarlos uniformemente a fin de evitar la aglutinación de los mismos (Salisbury et al. 1978, Durán del Campo 1980). Otro método de estimar la concentración espermática es utilizando un espectrofotómetro calibrado para semen ovino (Rodríguez et al., 2008). Los

laboratorios que cuentan con el CASA, también estiman la concentración espermática por medio del software (Tsakmakidis, 2010).

2.8.1.3. Motilidad

El movimiento espermático es un atributo de la calidad porque determina la eficacia de la migración a través del tracto genital de la hembra. Una estimación visual de la motilidad debe ser realizada en todas las muestras de semen, porque permite identificar las muestras que probablemente presenten baja fertilidad (Graham, 2001). La motilidad puede ser estudiada a través de la evaluación del movimiento en masa e individual. La motilidad masal está dada por la velocidad con la que se hacen y deshacen las ondas (Cueto et al., 1993). Se observan las ondas de movimiento colocando una gota de semen sobre un porta objeto limpio, seco y templado (37°C) y en poco aumento (10x), aunque se puede realizar una evaluación primaria de la motilidad masal en la propia copa o tubo de colección. Se utiliza una escala desde 0, cuando no se observan movimientos, a 5, cuando el movimiento es muy intenso (Evans y Maxwell, 1989). La observación de la motilidad masal puede estar influida por la concentración de espermatozoides. La motilidad espermática progresiva, es decir, el movimiento con dirección de avance, se observa en espermatozoides que presentan una serie de atributos estructurales y fisiológicos altamente relacionados con la fertilidad (Gil y Olivera, 2004). Este método, según citan Salisbury et al. (1978), fue desarrollado en la Universidad de Illinois, donde se determinó que la validez del mismo dependía del grado de dilución, control de temperatura y de la habilidad del técnico. Para evaluar la motilidad progresiva es imprescindible diluir el semen y se debe tener especial cuidado que el diluyente no afecte la motilidad espermática. El movimiento progresivo y normal es el que determina que el espermatozoide avance y pueda fecundar. La motilidad progresiva se expresa en porcentaje, los rangos observados por diferentes autores varían entre 60 y 90% (Sorensen, 1982), para semen con motilidades de aceptables a muy buena.

Considerando los efectos de la temperatura sobre la motilidad del espermatozoide, cuando se realizan estas técnicas es recomendable que se utilice una platina caliente en el microscopio. Actualmente existen equipos que permiten evaluar automatizadamente la motilidad espermática, analizando

imágenes tomadas con una cámara sobre el microscopio con un software adecuado (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA, Tsakmakidis, 2010).

2.8.1.4. Morfología

Las anomalías morfológicas espermáticas están relacionadas con la fertilidad del macho y las condiciones medioambientales que ocasionan estados de estrés, principalmente calor y humedad (Hafez y Hafez, 2004). En el carnero también las variaciones del fotoperiodo inciden en la presencia de alteraciones morfológicas de los espermatozoides (López Pérez y Pérez-Clariget, 2012). El examen morfológico es una prueba de control de calidad del semen. Una muestra seminal será calificada de baja calidad y por lo tanto con baja probabilidad de fecundar, cuando la proporción de espermatozoides anormales supere el 20%, estas alteraciones sean fundamentalmente primarias, es decir, asociadas a la espermatogénesis o a la maduración del espermatozoide (Evans y Maxwell, 1989). En carneros, los eyaculados con 15% o más de espermatozoides anormales no se utilizan en los programas de IA (Hafez y Hafez, 2004) y para conservar semen solo se utilizan espermatozoides con menos del 10% de anomalías espermáticas (Evans y Maxwell, 1989). Las formas anormales se clasifican de acuerdo al lugar donde se observan como anomalías de cabeza (defectos de acrosoma, cabezas sueltas anormales, piriformes, estrechos en la base, contorno anormal, tamaño diferente), pieza media (anormal o abaxial), cola (doblada simple, doblada terminal), gotas citoplasmáticas proximales o distales y cabezas sueltas normales (López et al., 2011).

2.8.1.5. HOST y ORT

En los procesos de conservación es particularmente importante evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática y el acrosoma. Se han desarrollado varias técnicas entre las que se destacan el test o prueba de endósmosis (HOST, hypoosmotic swelling test) Test de resistencia osmótica (ORT, Osmotic Resistance Test) (Rubio y Quintero, 2008). Ambos test son sencillos, de bajo costo y de fácil entrenamiento para técnicos. Se basan en desafiar a los espermatozoides a un medio hipotónico y evaluar su resistencia.

La prueba de Endósmosis (endósmosis) consiste en una evaluación después de incubar a 37°C durante 30 min al semen en el medio hipotónico (100-150 mOsm/kg). Los espermatozoides que conservan la integridad funcional de sus membranas, al perder líquido desde su interior, se curvan dando una imagen característica de sus colas. Los espermatozoides con membranas dañadas, permiten el libre movimiento de los líquidos y permanecen con su forma incambiada (Correa y Zavos, 1994). Es una técnica especialmente utilizada para predecir la resistencia osmótica de las membranas celulares, a los cambios osmóticos que sucederán en los procesos de conservación de semen, tales como: refrigeración, congelación y descongelación.

El ORT está basado en el porcentaje de espermatozoides que presentan una alteración estructural evidente en el acrosoma tras su incubación en un medio hiposmótico (Rubio y Quintero, 2008).

2.8.2. Evaluación *in vivo*

Si bien hay técnicas *in vitro* cuya relación con la fertilidad es más estrecha que otras, se considera necesario utilizar una batería de técnicas para estimar la capacidad fecundante del espermatozoide. Aun así, la variación entre machos, eyaculados y espermatozoides interfieren en las estimaciones del poder fecundante de los sementales (Rodríguez-Martínez, 2013). Por lo que, las pruebas *in vitro* son el desafío final al que deberían someterse las técnicas de conservación de semen. La tasa de preñez es por su importancia biológica y económica el test *in vivo* por excelencia. Por ello la tasa preñez es la evaluación biológica que caracteriza con mayor exactitud la fertilidad de un carnero y su semen. Es una evaluación indirecta del semen, midiéndose la calidad del mismo a través del porcentaje de hembras preñadas, ya sea por monta natural o IA. Requiere en ambos casos que las hembras sean fértiles y posean un adecuado estado nutricional, higiénico y sanitario. En el caso de los ovinos es fundamental tener en cuenta el periodo reproductivo en que se encuentran las hembras.

2.9. CONSERVACIÓN DEL SEMEN

Las tecnologías disponibles permiten la preservación del semen por largos períodos (semen congelado) o períodos breves (semen refrigerado y enfriado). Conservar y luego utilizar el semen de un carnero genéticamente superior, permite: acelerar el mejoramiento de las características productivas de las majadas, al aumentar el número de crías logradas con respecto a las que se

obtendrían en servicio natural. Además, permite el flujo de material genético superior hacia sectores poblacionales de menores recursos y posibilidades y facilita el transporte de semen a nivel internacional.

2.9.1. Refrigerado

Refrigerar semen, permite conservarlo por 24 horas, sin reducción considerable de la capacidad fertilizante y por lo tanto es posible su utilización en establecimientos relativamente distantes al lugar de su colección. De este modo posibilita organizar programas regionales de IA, utilizando un semental en varios establecimientos (Durán del Campo, 1993). El semen de carnero es sensible a la refrigeración, produciéndose daños estructurales que pueden afectar la motilidad y morfología espermáticas (López et al. 1999, Barrios et al. 2000) y provocar la desestabilización de las membranas espermáticas induciendo la capacitación y reacción acrosómica prematura en el espermatozoide, reduciendo su vida fértil (Watson 1995, Salamon y Maxwell 2000). Estos efectos son causantes de una caída en la sobrevivencia espermática en el tracto de la oveja con la consiguiente reducción de la fertilidad y un incremento en la mortalidad embrionaria. Sin embargo, dichos daños son menores que los producidos por la congelación del semen de carnero (Cabrera et al., 2010).

La refrigeración de semen consiste en enfriar el semen diluido a una temperatura de 5°C. El enfriamiento debe realizarse en forma gradual, debido a que en este margen los espermatozoides son sensibles al choque de frío, por lo que se procura evitar descensos bruscos de temperatura. Usualmente se sugiere un tiempo 2 - 3 horas para enfriarlo a 5 °C (Evans y Maxwell, 1989) y proveerlos de un medio que los proteja contra el choque frío.

2.9.2. Diluyentes

Los diluyentes para semen deben proveer una fuente de energía para el metabolismo espermático. Los diluyentes para carneros incluyen azúcares simples siendo los más comúnmente utilizados: glucosa, fructosa, lactosa y rafinosa (López Pérez 1987, Fernández Abella 1987). Estos carbohidratos, además, de proveer una fuente de energía, colaboran en el control de la presión osmótica. El diluyente debe incluir, además, un sistema amortiguador para el

control de pH. El pH óptimo varía con la temperatura de conservación y con los otros componentes del diluyente, de forma tal que el óptimo para un tampón fosfato es 7,5 y para los diluyentes en base a Tris y citrato es de 6,5-7,0 (Salisbury et al., 1978). El citrato de Na, el Tris y la leche han sido utilizados en diluyentes para preservar el semen ovino (López et al., 1999). Para controlar la proliferación de microorganismos se utilizan distintos antibióticos, la asociación de penicilina y estreptomicina es uno de los más utilizados en ovinos (Evans y Maxwell, 1989). Existen dos grandes grupos de diluyentes ovinos según el componente que utilizan para proveer protección contra el frío, los que son a base a yema de huevo y los que utilizan leche, que a grandes rasgos corresponden a las escuelas australianas y francesas respectivamente (Azzarini, 1991). No obstante López Pérez (1987), sugirió que se podrían considerar dos grupos adicionales, los que no contienen ninguno de los ingredientes anteriormente mencionados y los que contienen ambos. La yema de huevo proporciona mayor protección a los espermatozoides frente a lesiones por enfriamiento, dado que contiene lecitina, proteínas, lipoproteínas y complejos similares (Salisbury et al., 1978). Por otro, los componentes responsables en la leche son las proteínas (caseína) y lipoproteínas (Salisbury et al., 1978). Estos diluyentes tienen la enorme ventaja de ser muy fáciles de obtener y de un costo reducido (López Pérez, 1987). Por tratarse de componentes biológicos, pueden ser vehículo de enfermedades por lo cual existe una tendencia creciente a evitar su uso sustituyéndolos por diluyentes sintéticos.

Cuando se congela semen, es imprescindible agregar al diluyente un crioprotector. Se han utilizado varios crioprotectores pero el más ampliamente difundido es el glicerol (Salamon y Maxwell, 1994). Cuando se somete al espermatozoide a procesos de crioconservación sufre daños estructurales y bioquímicos, donde factores como el shock térmico, velocidad de enfriamiento, composición de los diluyentes y estrés osmótico influyen sobre los resultados pos-descongelación, siendo responsables de la disminución de la fertilidad (Cabrera et al., 2010).

2.9.3. Adición de plasma seminal (PS)

Hay abundantes evidencias experimentales de que procesos como la refrigeración del semen alteran la funcionalidad de los espermatozoides

(Maxwell et al., 1999a). Se ha observado que el agregado de PS a diluyentes para semen ovino reduce los efectos negativos de la dilución (Maxwell y Johnson, 1999b). Además, existen evidencias de que el PS puede prevenir (Pérez Pé et al., 2001) o aún revertir (Barrios et al., 2000) los daños provocados por el enfriamiento o choque frío. El agregado de PS a los diluyentes incrementa la capacidad de los espermatozoides ovinos para penetrar el moco cervical *in vitro* (El-Hajj Ghaoui et al., 2007), así como la fertilidad del semen congelado-descongelado (Maxwell et al., 1999a). También se ha observado que aumenta la motilidad, la viabilidad, la integridad acrosómica y la actividad respiratoria de las mitocondrias de espermatozoides de carnero (Ollero et al. 1997, Maxwell et al. 2006). Pérez- Pe et al. (2002), han reportado que el PS reduce la fosforilación de la tirosina, asociado al proceso de capacitación, es decir actuaría como un factor decapacitante. Se ha reportado que el agregado de un 30% de PS al semen de carnero refrigerado durante 24 horas en una dilución en base a Tris-yema de huevo, aumentó casi un 20% la tasa de preñez en ovejas inseminadas pericervicalmente (López Pérez y Pérez-Clariget, 2012).

La incubación de espermatozoides de carnero con proteínas del PS, permite que células dañadas por el choque frío recuperen su funcionalidad evaluada con marcadores fluorescentes y daños morfológicos evaluados con microscopio electrónico. Las proteínas suministradas durante la incubación del semen, serían adsorbidas por la membrana reponiendo a las que se habían perdido durante choque frío y de esa forma permitirían la recuperación funcional de los espermatozoides (Barrios et al., 2000).

Sin embargo, estos resultados benéficos no siempre son encontrados, por el contrario, existen trabajos en que el agregado de PS al diluyente de carneros produjo efectos perjudiciales (Maxwell et al., 2006). La discusión de estos efectos converge en la influencia de distintas proteínas que se encuentran en el PS del rumiante (Leahy y de Graaf, 2012). Además, el PS de carnero presenta una variación estacional en su efecto protector de las membranas espermáticas frente a la congelación, el estímulo a la motilidad del espermatozoide, la actividad de las enzimas anti-oxidantes, así como en el contenido y composición de las proteínas (Pérez-Pé et al. 2001, Marti et al. 2007, Domínguez et al. 2008, Leahy et al. 2010).

2.9.4. Biología funcional de las proteínas del plasma seminal o RSPs

Los efectos de la suplementación del PS en diluyentes para semen ovino, han sido atribuidos a proteínas que se encuentran en el PS de esta especie (Leahy et al., 2010). Estas son pequeñas proteínas ácidas originadas por las vesículas seminales y caracterizadas por la presencia de dos módulos repetidos en tándem del componente fibronectina Tipo 2 (Fn-2). Para el carnero se denominan: proteínas del PS de Carnero o RSPs (“Ram Seminal Proteins”), identificadas a través de su peso molecular en RSP-15 kDa, RSP-16 kDa, RSP-22 kDa, RSP-24 kD y son consideradas moduladoras de la función espermática. Se encuentran en una gran proporción, aproximadamente el 20% del total de proteínas. A pesar de ello las propiedades bioquímicas y biofísicas de estas proteínas no están bien definidas y descriptas (Bergeron et al., 2005).

En este siglo, los avances tecnológicos han permitido un estudio más detallado de la composición del PS de las distintas especies a través de tecnología proteómica. Estos estudios reportan que sólo el 30% de las proteínas secretadas por las glándulas anexas pudieron ser identificadas al presente. Y aún otras proteínas que se encuentran en el citoplasma, membrana plasmática y lisosoma no han sido reconocidas, pudiendo promover la fertilidad mediante la unión a la transferencia de espermatozoides y posiblemente componentes biológicamente activos (Druart et al., 2013). Es indiscutible que este es un campo de interés tanto para la academia como para los aspectos tecnológicos y es de esperarse un caudal importante de nuevo conocimiento en esta área.

2.10. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL (IA)

El uso del semen está asociado a la técnica de IA. Esta técnica, una de las primeras biotecnologías en desarrollarse y difundirse, permite eliminar la monta directa. La IA es una herramienta fundamental en los programas selección y de cruzamientos, además de participar en el control de enfermedades venéreas (Durán del Campo, 1993).

En la oveja es difícil atravesar el cérvix con una cánula de inseminación, debido a la anatomía del mismo y al tamaño corporal de la especie. El cérvix de la oveja presenta de 4 a 7 anillos y varios pliegues que obstaculizan el pasaje,

actuando como barrera entre la vagina y el útero. Si bien el carnero eyacula en el fondo de saco de la vagina (Setchell y Breed, 2006), cuando se utiliza IA, existe una alta correlación entre la profundidad del cérvix donde es depositado el semen y el índice de concepción obtenido (Salamon y Lightfoot, 1970).

La técnica más sencilla y difundida y de la que Uruguay fue pionero es la técnica pericervical, que consiste en depositar el semen en la entrada del cérvix utilizando un vaginoscopio o espéculo y un dispositivo para aplicar el semen. Con esta técnica y semen fresco se obtienen tasas de preñez cercanas a las que se logran con monta natural (Durán del Campo, 1993). Sin embargo, cuando se utiliza con semen congelado, los resultados disminuyen drásticamente (Hafez, 1989). Esta limitación dificulta los programas de mejoramiento genético en la especie y fue parcialmente resuelta con la utilización de la IA por laparoscopia. Aunque por tratarse de una técnica relativamente costosa y compleja, su difusión no ha alcanzado los elevados niveles de aplicación que se habían logrado en los programas de IA con semen fresco aplicado por vía pericervical (Maxwell et al., 2006).

La utilización de semen refrigerado y almacenado por 24 horas puede ser una alternativa al uso de semen congelado, ya que permite obtener mejores resultados de fertilidad, aunque sin alcanzar los del semen fresco utilizando la inseminación pericervical (Maxwell y Salamon 1993, Fernández Abella et al. 2006, Gundogan et al. 2010). Los antecedentes del agregado de PS al diluyente para refrigerar semen de carnero a 5° C durante 24 h y utilizado en IA pericervical son alentadores (López Pérez y Pérez-Clariget, 2012).

2.11. HIPÓTESIS

La hipótesis que motivó este trabajo fue que el agregado de porcentajes crecientes de plasma seminal (PS) en el diluyente a base de Tris-yema de huevo para semen ovino refrigerado, determina incrementos en la viabilidad espermática y la tasa de preñez (utilizando IA pericervical).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LOCALIZACIÓN Y ANIMALES

Para desafiar las hipótesis y llevar adelante el objetivo propuesto, se realizaron dos experimentos en la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt (EEBR) ubicada en la latitud 32°35'S y longitud 54°15'O, durante el mes de abril en los años 2012 (Experimento 1, Exp.1) y 2013 (Experimento 2, Exp.2).

Por medio de registros de IA de años anteriores, se seleccionaron los carneros que habían tenido tasa de preñez mayores a 65%. Los carneros fueron sometidos a una evaluación reproductiva dos meses antes de comenzar la estación reproductiva y posteriormente se trasladaron a potreros con una mejor calidad de forraje. En el Exp.1 se utilizaron dos carneros (identificados como 1 y 2) y en el Exp.2 tres diferentes (A, B y C) a los del Exp.1. En el Exp.2 se inseminaron 111 borregas Corriedale, con un peso entre 39,1 a 47,5 kg. Las ovejas se alimentaron en base a campo natural todo el año y la IA se realizó en abril 2013. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en cumplimiento con las recomendaciones de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República (UdelaR).

3.2. COLECCIÓN Y EVALUACIÓN DE SEMEN

En ambos experimentos se colectó en promedio de cada carnero un eyaculado diario durante 5 días, utilizando el método de la VA con una oveja encepada. Luego de la colección, los eyaculados se colocaron en baño María a 35°C y se registró el volumen del eyaculado, la motilidad progresiva y concentración espermática. En ambos experimentos los requerimientos mínimos para la utilización de los eyaculados fueron de un volumen de 0,8 ml, motilidad del 70% y concentración de 2×10^9 espermatozoides/ml. El volumen se midió en ml a partir de la copa graduada utilizada en la colección de semen. La concentración de espermatozoides se determinó utilizando la cámara de Neubauer, empleándose una dilución de 10 μ l en 4 ml de agua destilada y se observó al microscopio con un aumento de 100x. La motilidad progresiva se determinó de acuerdo a Sorensen (1982) por medio de la observación en el microscopio a 400x y estimada en porcentaje. Para ello, el porta y el cubre objeto fueron previamente calentados (35°C), colocándose en el porta objeto

una gota de semen de 3 μ l diluida en 8 μ l de Tris. En ambos experimentos, se realizó la prueba de endósmosis, HOST (Rubio y Quintero, 2008), incubándose muestras de semen de 10 μ l durante 30 minutos en 300 μ l de una solución hipotónica (100mOsm). Cumplido el tiempo, se agregaron 10 μ l de formol a efectos de detener el proceso y fijar las muestras. De dicha solución se tomaron muestras de 4 μ l y observaron a 400x en un portaobjeto. Se contabilizaron los espermatozoides que respondieron a la técnica y fueron expresados como porcentaje del total de observados, 150 espermatozoides. Un técnico entrenado realizó todas las observaciones tanto las de motilidad progresiva como las de endósmosis.

3.3. DILUYENTES, OBTENCIÓN DEL PLASMA Y PROCESAMIENTO DEL SEMEN

En ambos experimentos se utilizó un diluyente a base de Tris-yema de huevo. La composición del diluyente fue: 30,28 gramos (gr) de Tris, 17 gr de ácido cítrico, 12,5 gr de fructosa, 1.000.000 UI de penicilina, estreptomina 1 gr y agua destilada cantidad suficiente para (c.s.p.) 1000 ml, más 20% de yema de huevo. Todos los productos químicos se obtuvieron de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU. A este diluyente se le agregó el PS.

Tres semanas antes del comienzo de cada experimento se obtuvo el PS. Para obtener el PS se colectó semen de los carneros que fueron utilizados en cada experimento (Exp.1, carneros 1 y 2; Exp.2, carneros A, B y C). Cada eyaculado fue centrifugado a 3000 g durante 10 minutos y posteriormente se extrajo el sobrenadante (PS). Se mezclaron volúmenes iguales de PS de cada eyaculado de cada carnero y la mezcla fue almacenada en tubos eppendorf de 1,5 ml en freezer a -20° C. En cada ocasión se confirmó, observando en microscopio (400x), la ausencia de espermatozoides.

Para evitar el posible efecto del día de colección sobre la composición del PS, antes de agregar el PS al diluyente Tris-yema de huevo, se mezclaron alícuotas de PS obtenidos todos los días de colección. El diluyente Tris-yema de huevo con PS se preparó una sola vez, se almacenó en varios tubos eppendorf que se congelaron y se fueron descongelando a medida que fue necesario durante el período evaluación.

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL, TRATAMIENTOS Y MEDIDAS

3.4.1. Experimento No.1 (Exp.1)

Se utilizaron 17 eyaculados en total, 8 del carnero 1 y 9 del 2. Inmediatamente después de la colección, el eyaculado fue colocado en Baño María a 35° C y evaluado (semen fresco). Posteriormente, fue dividido en 2 alícuotas a las que se aplicaron los siguiente tratamientos: a) Tris: esta alícuota fue diluida volumen a volumen con el diluyente Tris-yema de huevo; b) Plasma: Tris + 30% de componente PS: esta alícuota fue diluidas en el diluyente Tris-yema de huevo al que se le había agregado 30% de la mezcla de PS. Posteriormente el semen fue llevado en Baño María a 35°C a un refrigerador a 5°C donde permaneció por 24 horas. Se estimó la motilidad progresiva (motilidad) y la estabilidad de membranas a través de la prueba de endósmosis. Ambas variables es estimaron en semen fresco (hora 0), a las 2 horas (hora 2) y 24 horas (hora 24) de iniciada la refrigeración.

3.4.2. Experimento No.2 (Exp.2)

En este experimento se utilizaron 16 eyaculados de 3 carneros, 6 de “A” y 5 de cada uno de los otros dos carneros (B y C). Cada eyaculado fue colocado en Baño María a 35°C y evaluado (semen fresco). Luego dividido en 3 alícuotas según los tratamientos: a) Tris: esta alícuota fue diluida volumen a volumen con el diluyente Tris-yema de huevo; b) Tris + 30% de componente PS (Plasma30): esta alícuota fue diluidas en el diluyente Tris-yema de huevo al que se le había agregado 30% de la mezcla de PS; c) Tris + 50% de componente PS (Plasma50): esta alícuota fue diluidas en el diluyente Tris-yema de huevo al que se le había agregado 50% de la mezcla de PS. A continuación fue llevado en Baño María a 35°C a un refrigerador a 5°C por 24 horas. Se realizó y estimó la prueba endósmosis en los mismos momentos de observación que en el Exp.1 (hora: 0, 2 y 24). Por otro lado se estudió la variable tasa de preñez, empleando a las 24 horas el semen refrigerado de los 3 tratamientos, los tratamientos fueron asignadas al azar. Además, con el objetivo de comparar los resultados de tasa de preñez, se inseminaron borregas al azar con semen fresco de los carneros (A, B y C), inseminando en total 111 borregas.

El estro se sincronizó con esponjas intravaginales colocadas durante 12 días, conteniendo 50 mg de acetato de medroxiprogesterona (Sincrovin®, Laboratorios Santa Elena, Montevideo, Uruguay). Se trabajó en dos lotes de hembras, cada uno con la mitad de las borregas para una mayor practicidad de manejo, sincronizados con una semana de diferencia. Después de retiradas las esponjas, el estro se detectó cada 12 horas utilizando carneros vasectomizados pintados en el pecho (antes, se evaluaron sus eyaculados para confirmar que no hubiera espermatozoides). Doce horas después de la detección del celo, se realizó la IA pericervical. Para la IA, se utilizó un espéculo equipado con una luz fuente y una pistola de inseminación multidosis (Walmur Veterinaria Instrumentos, Montevideo, Uruguay). A través del dato de la concentración se emplearon dosis de 2×10^8 espermatozoides en 0,2 ml. Se realizó el diagnóstico de preñez por medio de ultrasonografía 60 a 70 días después de la IA, con un ecógrafo AMBISEA (Technology Corp. China).

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las fuentes de variación consideradas para el análisis de motilidad y endósmosis fueron: carnero y tratamiento tomados como efectos fijos y eyaculado como efecto aleatorio. En el Exp.2 se estudió tasa de preñez determinando como efectos fijos: carnero y tratamiento.

En el Exp.1 el modelo estadístico ajustado fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + E(C)_{ij} + T_k + e_{ijkl}$$

Donde:

- Y_{ijkl} = observación del carnero i, eyaculado j y tratamiento k;
- μ = la media general;
- C_i = carnero i (i = 1 o 2);
- $E(C)_{ij}$ = eyaculado j del carnero i
- T_k = tratamiento k (Valor inicial del semen a colectar (semen fresco), Tris + 30% de PS a las 2 (Plasma 2) y 24 horas (Plasma 24), Tris a las 2 (Tris 2) y 24 horas (Tris 24));
- e_{ijkl} = error experimental

En el Exp.2 se ajustaron dos modelos, uno para endósmosis y otro para tasa de preñez. En el caso de endósmosis:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + E(C)_{ij} + T_k + e_{ijkl}$$

Donde:

- Y_{ijkl} = observación del carnero i, eyaculado j y tratamiento k;
- μ = media general;
- C_i = carnero i (i = A, B o C);
- $E(C)_{ij}$ = eyaculado j (j=? para C=A, j=? para C=B y j=? para C=C)
- T_k = tratamiento k (Valor inicial del semen a colectar (semen fresco), Tris + 30% de PS a las 2 (Plasma30 2) y 24 horas (Plasma30 24), Tris + 50% de PS a las 2 (Plasma50 2) y 24 horas (Plasma50 24), Tris a las 2 (Tris 2) y 24 horas (Tris 24));
- e_{ijkl} = error experimental

Para la variable tasa de preñez el modelo ajustado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + T_j + CT_{ij} + e_{ijk}$$

Donde:

- Y_{ijk} = una observación del carnero i y tratamiento j;
- μ = media general;
- C_i = carnero i (i = A, B o C);
- T_j = tratamiento j (semen fresco, Tris + 30% de PS (Plasma30), Tris + 50% de PS (Plasma50), Tris);
- CT_{ij} = interacción entre carnero y tratamiento ij;
- e_{ijk} = error experimental

Luego de definir los modelos estadísticos adecuados, se condujo al análisis estadístico de los datos con el programa SAS Institute (versión 1990). Los datos se organizaron y ajustaron para el procesamiento en el programa. Los modelos se presentaron configurando los efectos en clases: carnero, eyaculado (analizado como aleatorio) y subclase. Las subclases correspondieron a los tratamientos según experimento. El tratamiento es una combinación de diluyente y momento de observación. El PROC MEANS y UNIVARIATE fueron empleados para la exploración de datos y obtención de las estadísticas descriptivas. El PROC MIXED y GLIMMIX fue empleado para estimar los efectos fijos y determinar los componentes de la varianza. Se utilizó PROC GLIMMIX para la tasa de preñez (en el Exp.2) por tratarse de una variable binomial (preñadas y no preñadas), el resto del análisis fue llevado a cabo con el PROC MIXED. Los resultados se presentan con un nivel de significancia de $P < 0,05$.

Las variables endósmosis y motilidad, se ajustaron (según asimetría y curtosis) y presentaron distribución normal. Para determinarlo se realizó una transformación logarítmica y a raíz cuadrada, no mejorando la distribución de los residuos de las variables. Se estudió la correlación ajustada al modelo entre las variables del Exp.1. La variable tasa de preñez fue analizada con endósmosis como covariable, basado en un coeficiente de regresión significativo de 0,1235 ($P=0,02$) y sin esta covariable. Además, se estudiaron y no fueron significativos: el peso de las borregas ajustado como covariable ($p=0,16$) y la interacción carnero*tratamiento ($P=0,82$).

Se realizó un estudio del tamaño mínimo de muestra para las variables empleadas en ambos experimentos. Se utilizó el cálculo de Snedecor y Cochran (1971) para obtener el número de observaciones requerido (n) por tratamiento en variables de distribución normal. La fórmula se describe a continuación:

$$n = 2(Z\alpha + Z\beta)^2 (\sigma/\delta)^2$$

Donde:

- σ = estimación del desvío estándar de la característica;
- δ = magnitud de la diferencia que se quiere detectar;
- $Z\alpha$ = desvío estandarizado correspondiente al error de Tipo I;
- $Z\beta$ = desvío estandarizado correspondiente al error de Tipo II

Se consideró para el cálculo del n de las variables motilidad y endósmosis, los desvíos estandarizados correspondientes al error Tipo I, 1,96 y al Tipo II, 0,85, y se tomó en cuenta una δ de 10%. Por otro lado, para la variable tasa de preñez con distribución binomial, se determinó el tamaño de muestra apropiado para detectar diferencias entre dos proporciones (para ello se empleó el programa Sample size ... , 2015). Se consideró un 95% de nivel de confianza, 80% de probabilidad de detectar diferencias significativas y las proporciones en cuestión. Este calculador utiliza la fórmula:

$$n = (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 * (p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)) / (p_1 - p_2)^2$$

Donde:

$Z_{\alpha/2}$ = valor crítico de la distribución normal en $\alpha/2$;

Z_{β} = valor crítico de la distribución normal en β ;

p_1 y p_2 = proporciones de muestras esperadas de los dos grupos

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTO 1

4.1.1. Estadísticas descriptivas

El Cuadro No. 1 muestra el número de eyaculados y concentración según carnero. En el Exp.1 la concentración media por eyaculado fue de 3003×10^6 con un desvío estándar (DE) de 203×10^6 espermatozoides/ml.

Cuadro No. 1. Número de eyaculados (n), concentración espermática (espermatozoides/ml) y desvío estándar (DE) de los carneros utilizados en el experimento 1

Carnero	n	Concentración ($\times 10^6$)	DE ($\times 10^6$)
1	9	2800,00	471,12
2	8	3205,71	570,28

En el Cuadro No. 2 se presentan las estadísticas descriptivas de las variables motilidad y endósmosis. En el tratamiento con adición de 30% de PS a las 24 horas de refrigerado se observó el valor mínimo de motilidad (30%) y el máximo (80%) en semen fresco. La mayor amplitud del rango de motilidad fue observada en el tratamiento PS, independientemente de la hora en que la observación fue hecha. El menor valor de endósmosis (33,33%) se observó en el tratamiento plasma a las 24 horas y el máximo (96,49%) en semen fresco. La mayor amplitud del rango se observó a las 24 horas de refrigeración independientemente del tratamiento. El semen fresco presentó los valores máximos de ambas variables y la menor amplitud de rango. No se encontró correlación ($P=0,47$) entre motilidad y endósmosis.

Cuadro No. 2. Número de observaciones (n), media (\bar{X}), mínimo (m), máximo (M), desvío estándar (DE), coeficiente de variación (CV) de motilidad progresiva (%) y endósmosis (%) del experimento 1

Variable	n	\bar{X}	m	M	DE	CV
Motilidad	64	57.65	30.00	80.00	13.06	22.65
Endósmosis	71	66.95	33.33	96.49	16.51	24.65

4.1.2. Efecto tratamiento y carnero

En el Cuadro No. 3 se visualizan los resultados del análisis de varianza para las dos variables estudiadas.

Cuadro No. 3. Resultados del análisis de varianza del experimento 1

Efecto	Motilidad				Endósmosis			
	Grados de Libertad		Cuadrados medios	P>F	Grados de Libertad		Cuadrados medios	P>F
	Numerador	Denominador			Numerador	Denominador		
Carnero	1	14	20.07	0.62	1	15	422.12	0.12
Eyaculado (carnero)	14	44	87.13	0.19	15	50	166.73	0.38
Tratamiento	4	44	1511.96	<0.001	4	50	1659.80	<0.001
Error (residual)	44		61.64		50		151.70	

En el Cuadro No. 4 se muestran los resultados de motilidad y endósmosis por tratamiento y carnero.

Cuadro No. 4. Medias de mínimos cuadrados (error standard) de motilidad (%) y endósmosis (%) del experimento 1

Efecto	Motilidad	Endósmosis
Carnero		
1	56.06 (1,69)	69.05 (2.30)
2	56.36 (1,85)	63.23 (2.28)
Tratamiento*		
Semen fresco	72.52 (2,07) ^a	82.83 (3,03) ^a
Tris 2	59.27 (2,29) ^b	69.04 (3,33) ^b
Plasma 2	57.73 (2,29) ^b	62.16 (3,33) ^b
Tris 24	48.96 (2,48) ^c	66.02 (3,46) ^b
Plasma 24	42.59 (2,48) ^c	50.65 (3,46) ^c

*Incluye: semen fresco, combinaciones de diluyentes y momento de observación.

**Medias de mínimos cuadrados sin y con literales iguales no son significativamente diferentes. (P<0,05).

4.2. EXPERIMENTO 2

4.2.1. Estadísticas descriptivas

La concentración espermática media por eyaculado en el Exp.2 fue 2848×10^6 con un DE de $169,02 \times 10^6$ espermatozoides/ml. En el Cuadro No.5 se observan el número de eyaculados utilizados y la concentración espermática por carnero.

Cuadro No. 5. Número de eyaculados (n), concentración espermática (espermatozoides/ml) y desvío estándar (DE) de los carneros utilizados en el experimento 2

Carnero	n	Concentración (x10 ⁶)	DE (x10 ⁶)
A	6	2725,00	475,00
B	5	3086,67	51,50
C	5	2731,67	63,50

El Cuadro No. 6 muestra las estadísticas descriptivas de la tasa de preñez y endósmosis. La endósmosis presentó el valor máximo (94,59%) en el tratamiento de agregado del 50% PS a las 24 h y el mínimo (42,00%) en Tris a las 24 h. El tratamiento con menor amplitud de rango fue con agregado del 30% de PS a las 24 h y el mayor fue el Tris a las 24 h.

Cuadro No. 6. Número de observaciones (n), media (\bar{X}), mínimo (m), máximo (M), desvío estándar (DE), coeficiente de variación (CV) de la tasa de preñez (%) y endósmosis (%) del experimento 2

Variable	N	\bar{X}	m	M	DE	CV
Tasa de Preñez	111	69.00	0.00	100.00	46.00	66.75
Endósmosis	72	73.83	42.00	94.59	12.82	17.37

4.2.2. Efecto tratamiento y carnero

4.2.2.1. Endósmosis

En el Cuadro No. 7 se observan los resultados del análisis de varianzas para la variable endósmosis.

Cuadro No. 7. Resultados del análisis de varianza de endósmosis del experimento 2

Efecto	Grados de Libertad		Cuadrados Medios	P>F
	Numerador	Denominador		
Carnero	2	13	2532.39	0.0033
Eyaculado (carnero)	13	71	290. 57	0.0240
Tratamiento	6	71	520.66	0.0022
Error (residual)	71		137.95	

El Cuadro No. 8 se presenta las medias de mínimos cuadrados y errores estándar para la variable endósmosis por tratamiento.

Cuadro No. 8. Medias de mínimos cuadrados (error standard) de endósmosis (%) del experimento 2

Efecto	Endósmosis
Carnero	
A	62.23 (2.95) ^b
B	79.30 (3.12) ^a
C	66.11 (3.29) ^b
Tratamiento*	
Semen fresco	65.33 (3.30) ^{bd}
Tris 2	65.94 (3.53) ^{bcd}
Plasma30 2	74.25 (3.53) ^{ac}
Plasma50 2	70.66 (3.83) ^{abc}
Tris 24	59.89 (3.53) ^d
Plasma30 24	69.10 (3.30) ^{bc}
Plasma50 24	79.31 (3.54) ^a

*Incluye: semen fresco, combinaciones de diluyentes y momento de observación.

** Medias de mínimos cuadrados que comparten un literal no difieren significativamente entre sí (P<0.05).

Si bien entre las medias de los tratamientos Plasma50 a las 24 horas y Plasma50 a las 2 horas no hubieron diferencias significativas, fueron próximas a P<0,05 (P=0,077). Al igual que las diferencias entre el tratamiento Tris y Plasma30 a las 2 horas (P=0,075).

4.2.2.2. Tasa de preñez

La tasa de preñez de los carneros cuando las borregas fueron inseminadas con semen fresco fue superior a 80%. El promedio general de tasa de preñez no fue diferente entre carneros, cuando se ajustó el modelo con y sin la covariable endósmosis. En el Cuadro No. 9 se observan los resultados de tasa de preñez por tratamiento con el análisis del modelo ajustado sin y con la covariable endósmosis.

Cuadro No. 9. Medias de mínimos cuadrados (error standard) de tasa de preñez del experimento 2

Efecto	s/covariable endósmosis	c/covariable endósmosis
Carnero		
A	0.66 (0.37)	0.75 (0.51)
B	0.73 (0.38)	0.60 (0.66)
C	0.77 (0.45)	0.91 (0.78)
Tratamiento*		
Semen fresco	0.87 (0.62) ^a	-
Tris	0.58 (0.41) ^{bc}	0.92 (1.01) ^a
Plasma30	0.81 (0.46) ^{ab}	0.89 (0.61) ^a
Plasma50	0.54 (0.37) ^c	0.32 (0.59) ^b

*Incluye: semen fresco, combinaciones de diluyentes y momento de observación.

** Medias de mínimos cuadrados sin y con literales iguales no son significativamente diferentes (P<0,05).

Cuando se utilizó el modelo sin la covariable endósmosis si bien no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias del tratamiento Tris y Plasma30, el valor de P obtenido (P=0,069) fue cercano a P<0,05.

5. DISCUSIÓN

En el Exp.1 la refrigeración del semen cuando fue diluido con Tris-yema de huevo afectó la motilidad progresiva (motilidad) y la estabilidad de las membranas de los espermatozoides (estimada a través de la prueba de endósmosis), aunque no se encontró correlación entre ambas variables. En efecto, se observó una disminución de la motilidad progresiva y la endósmosis entre los valores observados en el semen fresco y los observados en el semen después de 24 horas de refrigeración, del orden del 33% y 20% respectivamente. Hace tiempo se conoce sobre los efectos perjudiciales de la refrigeración o el denominado choque frío sobre viabilidad espermática (López et al. 1999, Barrios et al. 2000) y los efectos benéficos de la inclusión de fosfolípidos y lipoproteínas (yema de huevo) en el diluyente (Fiser y Fairfull, 1983). Si bien diluyentes a base de Tris-yema de huevo parecen ser mejores protectores de la motilidad y la estabilidad de membrana del semen de carnero que otros diluyentes como el citrato de Na o la leche, la refrigeración a 5°C durante 24 h disminuye la motilidad y los valores de endósmosis (Paulenz et al., 2002), al igual que sucedió en el Exp.1.

El agregado de 30% de PS al diluyente Tris-yema de huevo en el Exp.1, no previno sino que acentuó la disminución de la motilidad y la endósmosis. Sin embargo, en el Exp.2 no se observó una disminución de los valores de endósmosis en el semen a las 2 ni a las 24 h de almacenado a 5°C. El PS es una mezcla de secreciones de la rete testis, epidídimo y glándulas anexas que contiene numerosas proteínas involucradas en la regulación de la función espermática, variando según especie e individuo (Maxwell et al., 2006). El agregado de PS tiene tanto efectos benéficos como perjudiciales sobre el almacenamiento del semen (Maxwell y Johnson, 1999b). Se ha reportado, la existencia en el PS del toro de una familia de proteínas que se unen a los lípidos que remueven el colesterol y los fosfolípidos de las membranas espermáticas y tienen, como consecuencia, efectos negativos sobre la conservación del semen (Bergeron y Manjunath, 2006). Pudiendo existir en el Exp.1 una interacción negativa de este tipo en la conservación a 5°C, entre el Tris-yema de huevo, PS y el espermatozoide que explicara los resultados. Sin embargo también se han reportado efectos benéficos, por pequeñas proteínas ácidas del PS responsables de conservar la viabilidad del espermatozoide, identificadas por Bergeron et al. (2005) como RSPs y caracterizadas por la

presencia de dos módulos repetidos en tándem del componente fibronectina Tipo 2. Según estudios, las RSPs actuarían como: protección al estrés oxidativo durante el procesamiento (Leahy y de Graaf, 2012), factor decapacitante dado por una reducción en la fosforilación de la tirosina (Pérez- Pe et al., 2002), siendo adsorbidas por la membrana espermática y reponiendo las que se habían perdido durante la refrigeración, recuperando la funcionalidad de los espermatozoides (Barrios et al., 2000). Estas proteínas, varían según carnero (Pérez-Pé et al., 2001) e interactúan con las membranas del espermatozoide (Leahy y de Graaf, 2012), o sea que al utilizar 3 carneros en el Exp.2, hay una mayor probabilidad de encontrar diferente cantidad y tipo de proteínas, por ende de RSPs. Por lo tanto, se podría suponer que hay al menos uno de los 3 carneros que contiene RSPs en mayor proporción, a diferencia de los 2 carneros utilizados en el Exp.1. Se podría concluir e identificar a través de un estudio de proteómica el o los carneros que contienen la mayor proporción de RSPs. En efecto, hay evidencias en investigaciones anteriores (Pérez-Pé et al. 2001, Marti et al. 2007, Domínguez et al. 2008, Leahy et al. 2010) del efecto de la adición de PS y su relación con la presencia en determinados carneros, este efecto ha sido denominado “efecto carnero”, resultado que coincide con este razonamiento. En el Exp.1 para las variables utilizadas no se encontraron diferencias entre carneros, en tanto en la prueba de endósmosis del Exp.2 si hubo un carnero (B) diferente al resto. El carnero B además de que fue significativamente superior, las medias simples se ubicaron por encima de todos los tratamientos, teniendo una respuesta superior a la refrigeración a 5°C. Se podría inferir que este carnero tiene componentes, como RSPs, que conservan la funcionalidad de la membrana espermática.

Por otro lado, la inclusión de un tratamiento con un nivel de 50% de componente PS en el diluyente Tris-yema de huevo en el Exp.2, mejoró la respuesta a la incubación a 5°C de la variable endósmosis a las 24 h, respecto al tratamiento de 30% de componente PS. Además, la respuesta del tratamiento de 50% de PS fue significativamente superior respecto al semen fresco, es decir que se obtuvo no solo un efecto conservador de la integridad de membrana, sino que además un efecto benéfico. Estos efectos benéficos en la viabilidad espermática han sido reportados por Ollero et al. (1997), Maxwell et al. (2006). Continuando con el razonamiento en el Exp.2, al disponer de una mayor proporción de PS (50%) respecto a un 30% en el diluyente, es posible que la reposición de las células dañadas por la colección, procesamiento y el

choque de frío es mayor, e incluso podría adsorber proteínas al punto de superar la respuesta de endósmosis del semen fresco.

El proceso de enfriado, no solo es una forma de preservar el semen por un período de tiempo corto, sino que además es una etapa en el proceso de congelación y de resultados comerciales no exitosos con el empleo de la técnica de IA pericervical (Hafez, 1989). Motivo por el cual, se ha trabajado en el agregado de PS a diluyente en base a Tris-yema de huevo con la IA pericervical. De hecho, en este trabajo cuando se añadió 30% de PS al diluyente, se refrigeró y utilizó a las 24 h para inseminar pericervicalmente borregas, la tasa de preñez no fue diferente a la obtenida con semen fresco, resultados también encontrados por López Pérez y Pérez-Clariget (2012). Además, estos autores reportaron con este tratamiento (30% de PS), 49% de tasa de preñez y en el presente trabajo se obtuvo 81%. Los resultados superiores podrían estar determinados por los distintos carneros utilizados, tanto para la IA como para la elaboración de la mezcla de PS. Si bien se trabajó con carneros de alta fertilidad, no respondieron de la misma forma a los tratamientos, aunque estas diferencias no fueron significativas. Sin embargo, cuando se agregó 50% de PS y opuesto a lo esperado, la tasa de preñez disminuyó significativamente (sin y con la covariable endósmosis). Por lo tanto, pese a que al aumentar a 50% el nivel de PS se conservaría la integridad de las membranas espermáticas durante la refrigeración e incluso resultando benéfico a las 24 horas, hay un efecto que deprime la fertilidad del semen observado en la tasa de preñez. Efecto que podría ser explicado, por una adsorción de componentes proteicos y lipídicos de la membrana o alguna de las estructuras espermáticas del espermatozoide (Barrios et al., 2000), al punto tal, que no permitiría la finalización de la capacitación espermática en el oviducto de la hembra. Para determinar y justificar esta inferencia, se debería estudiar otra técnica vinculada a la funcionalidad del acrosoma y fertilidad con la adición de 50% de PS a las 24 h de incubación.

5.1. TAMAÑO MÍNIMO DE MUESTRA

Se realizó el estudio del tamaño mínimo adecuado de muestra para las variables empleadas de distribución normal según el procedimiento propuesto por Snedecor y Cochran (1971).

Para la variable motilidad progresiva se consideró el desvío estándar (DE) resultante del experimento: 13,06 %, un error Tipo I, 1,96 y Tipo II, 0,85 y la magnitud de diferencia que se estimó detectar fue de 10%. Se aspiró a detectar como significativo un 10 %, ya que es una magnitud tal, que permitiría diferenciar por medio de la apreciación dos tratamientos en eyaculados. El tamaño adecuado de observaciones por tratamiento (n) según el cálculo es 27.

Se procedió al cálculo de la variable endósmosis, considerando el DE superior de endósmosis correspondiente al Exp.1 = 16,51%, y al igual que para la motilidad un error Tipo I, 1,96 y Tipo II, 0,85 y una magnitud de diferencia de 10%. Esta variable al evaluarse a través de la observación se entendió, al igual que para motilidad, que se necesitaría una magnitud de 10% para detectar diferencias. Además, según antecedentes (Rubio y Quintero, 2008), habían encontrado diferencias con esta técnica entre semen de toro fresco y descongelados mínima de 10 %. El número de observaciones adecuado calculado por tratamiento (n) es de 43 observaciones.

Se determinó para la variable binomial tasa de preñez, el tamaño de muestra apropiado para detectar diferencias entre proporciones utilizando el programa Sample size ... (2015). Considerando un 95% de nivel de confianza y 80% de probabilidad de detectar diferencias significativas. Las proporciones utilizadas fueron: 69%, media de fertilidad de los carneros trabajados en el experimento, y 10%, estimado de la variación en tratamientos en base a resultados de preñez de López Pérez y Pérez-Clariget (2012). Se obtuvo que el número de observaciones recomendado para detectar diferencias es de 299 ovejas por tratamiento.

En el diseño experimental la elección del número de observaciones incidió directamente en los resultados entre tratamientos, factor a tener en cuenta en próximas investigaciones. En el trabajo, podría haber dos vías para llegar al número adecuado de observaciones por tratamiento en las variables empleadas. Una es disminuyendo el número de tratamientos y otra aumentando el número de unidades experimentales, aunque como menciona Leahy y de Graaf (2012), en variables como tasa de preñez se dificulta contar con un número elevado de animales.

6. CONCLUSIONES

En conclusión, el agregado de 30% de plasma seminal homólogo ovino en diluyente Tris-yema de huevo, tiene efecto positivo en la conservación de la viabilidad espermática y la tasa de preñez obtenida por IA pericervical durante la estación reproductiva. No obstante, un incremento de 50% de plasma seminal, si bien conserva la integridad de membrana no determina una mayor fertilidad.

7. RESUMEN

El agregado de plasma seminal (PS) en los diluyentes para semen ovino refrigerado, permitió mejorar los resultados de fertilidad obtenidos con semen de carnero refrigerado y almacenado por 24 horas. En la actualidad, no se conocen los porcentajes óptimos de adición de plasma para obtener dicha mejora. Por este motivo, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto de distintos niveles (0, 30 y 50%) de PS homólogo en base al diluyente Tris-yema de huevo (Tris). Para ello, se estimó la viabilidad espermática con la motilidad progresiva y prueba de endósmosis (HOST). Además, se determinó el porcentaje de preñez del semen de carnero refrigerado a 5°C a las 24 horas (h), utilizando inseminación artificial (IA) vía pericervical en un total de 111 borregas. Se realizaron dos experimentos en la Estación Experimental Bernardo Rosengurt de UdelaR. Facultad de Agronomía, en abril durante la estación reproductiva. En el experimento 1, se emplearon dos carneros para la elaboración de la mezcla de PS y se evaluaron 17 eyaculados. La motilidad espermática de los eyaculados disminuyó con el tiempo de almacenamiento a 5° C cuando se utilizó diluyente Tris y también cuando al mismo se agregó 30% de PS, sin tener diferencias entre diluyentes en ningún momento estudiado ($p < 0,05$). Al igual que la motilidad, la estabilidad de las membranas espermáticas estimada con la endósmosis, disminuyó cuando el semen fue refrigerado ($p < 0,05$). Sin embargo, la caída de los valores de endósmosis a las 24 h fue mayor cuando se agregó 30% de PS al diluyente Tris ($p < 0,05$). En el experimento 2, se emplearon tres carneros distintos y 16 eyaculados para la prueba de endósmosis. El diluyente Tris logró mantener valores de endósmosis diferentes al semen fresco durante el período de refrigeración ($p < 0,05$). El agregado de 30% de PS resultó en valores de endósmosis que aumentaron a las 2 h. Este aumento al agregar 50% se mantuvo e hizo máximo a las 24 h ($p < 0,05$). Por su parte, cuando se añadió 30% de PS y se utilizó a las 24 h en la IA, la tasa de preñez no fue diferente a la obtenida con semen fresco ($p < 0,05$). En tanto, con semen diluido en Tris como cuando se agregó 50% PS, las tasas fueron menores. En conclusión, el agregado de 30% de PS homólogo ovino en diluyente Tris, tiene efecto positivo en la conservación de la viabilidad espermática y la tasa de preñez realizada por IA pericervical. No obstante, un incremento de 50% de plasma seminal, si bien conserva la integridad de membrana no determina una mayor fertilidad.

Palabras clave: Semen de carnero; Plasma seminal; Semen refrigerado.

8. SUMMARY

The addition of seminal plasma (SP) in the diluents of ovine semen, allowed for improvements in the fertility results obtained with refrigerated ram semen and stored for 24hs. To this day, the optimal percentage of plasma addition to obtain such improvements remains unknown. For this reason the goal of the research was to evaluate the effect of different levels (0.30 y 50%) of homolog SP based on Tris-egg yolk diluents (Tris). For this purpose spermatic viability was estimated with progressive motility and endosmosis test (HOST). Also, pregnancy rate of ram semen refrigerated at 24 hours was determined, using pericervical artificial insemination (AI) for a total of 111 ewes. Two trials were performed at “Estación Experimental Bernardo Rosengurt”, Faculty of Agronomy, University of the Republic of Uruguay, during the reproductive season in April. For the first trial two rams were used to elaborate a SP mix and 17 ejaculates were evaluated. Spermatic motility of the ejaculates decreased with storage time at 5° C. When Tris diluents were assessed and as well when they were added to 30% of the SP mix, no differences between diluents were found at any time ($p < 0,05$). Like motility, the stability of the spermatic membranes estimated by the endosmosis test, decreased when the semen was refrigerated ($p < 0,05$). Nevertheless, the decrease in the endosmosis values at 24hs were more significant than when 30% of SP was added to the Tris diluents. For the second trial, we included three other rams from the ones used for trial one and 16 ejaculates for the endosmosis test. The Tris diluents maintained different endosmosis values from fresh semen during the refrigeration period ($p < 0,05$). The addition of 30% SP resulted in higher endosmosis values after a 2hs period. The increase when 50%SP was added, was maintained and reached a maximum at 24hs ($p < 0,05$). When 30%SP was used at 24hs for AI, the pregnancy rate did not differ from the fresh semen rate ($p < 0,05$). With Tris diluted semen and 50% SP, pregnancy rates were lower. In conclusion, the addition of ovine homolog 30% SP in Tris diluents has a positive effect on the conservation of the spermatic viability and the pregnancy rate when pericervical AI was performed. Nevertheless, an increase of 50% SP conserves the membrane integrity but does not imply higher fertility.

Keywords: Ram semen; Seminal plasma; Refrigerated semen.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aller, J. F.; Aguilar, D.; Vera, T.; Almeida, G. P.; Alberio, R. H. 2012. Seasonal variation in sexual behavior, plasma testosterone and semen characteristics of Argentine Pampinta and Corriedale rams. Spanish Journal of Agricultural Research. 10 (2): 345-352.
2. Azzarini, M. 1991. Tecnologías disponibles para modificar la reproducción de los ovinos. Selección de Temas Agropecuarios. 7: 87-101.
3. Barrios, B.; Pérez-Pé, R.; Gallego, M.; Tato, A.; Osada, J.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián- Pérez, J. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. Biology of Reproduction. 63 (5): 1531-1537.
4. Bergeron, A.; Villemure, M.; Lazure, C.; Manjunath, P. 2005. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. Molecular Reproduction and Development. 71 (4): 461-470.
5. _____; Manjunath, P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. Molecular Reproduction and Development. 73 (10): 1338-1344.
6. Cabrera, P.; Orellana, J.; Pantoja, C. 2010. Efecto de dos dilutores sobre la motilidad e integridad de la membrana espermática en semen congelado de ovinos. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 21 (2): 154-160.
7. Cardozo, J.; Grasa, P.; Muiño B., M. Cebrián P., J. 2009. Adición de proteínas del plasma seminal ovino durante la congelación del espermatozoide y efectos sobre su motilidad y viabilidad. Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 10 (1): 51-59.
8. Correa, J. R.; Zavos, P. M. 1994. The hipoosmotic swelling test; Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional test and fertility of bulls in an artificial insemination program. Theriogenology. 48: 721-731.
9. Cueto, M.; Gibbons, A.; Wolff, M.; Arrigo, J.; García Vinent, J. 1993. Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino.

Bariloche, INTA. 14 p. (Comunicación Técnica de Producción Animal no. 443)

10. Domínguez, M.; Falcinelli, A.; Hozbor, F.; Sánchez, E.; Cesari, A.; Alberio, R. 2008. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*. 69: 564-573.
11. Druart, X.; Rickard, J.; Mactier, S.; Kohnke, P.; Kershaw-Young, C.; Bathgate, R.; Gibb, Z.; Crossett, B.; Tsikis, G.; Labas, V.; Harichaux, G.; Grupen, C.; de Graaf, S. 2013. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *Journal of Proteomics*. 91: 13-22.
12. Durán del Campo, A. 1980. Anatomía, fisiología de la reproducción e inseminación artificial en ovinos. Buenos Aires, AR, Hemisferio Sur. 264 p.
13. _____. 1993. Técnica de la Inseminación. In: Manual práctico de reproducción e inseminación artificial en ovinos. Montevideo, UY, Hemisferio Sur. cap. 4, pp. 39-117.
14. El-Hajj Ghaoui, R.; Thomson, P.; Leahy, T.; Evans, G.; Maxwell W. 2007. Autologous whole ram seminal plasma and its vesicle-free fraction improve motility characteristics and membrane status but not *in vivo* fertility of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 42 (5): 541-549.
15. Elliott, F. 1978. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. In: Salisbury, G. W.; VanDemark, N. L.; Lodge J. R. eds. Semen evaluation. San Francisco, USA, Freeman. pp. 400-427.
16. Evans, G.; Maxwell, W. 1989. Manejo y valoración del semen; inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza, ES, Acribia. pp. 95-107.
17. Fernández Abella, D. 1987. Temas de reproducción ovina. Montevideo, UdelaR. División de Ediciones y Publicaciones. 254 p.
18. _____.; Guérin, Y.; Sterla, S.; Irabuena, O.; Dacheux, J. 2006. Efecto de dos diluyentes para conservación de semen refrigerado y del momento de inseminación sobre la fecundidad ovina. *Producción Ovina*. no. 18: 41-47.

19. Fiser, P.; Fairfull, R. 1983. Effects of changes in photoperiod on freezability of ram spermatozoa. *Criobiology*. 20: 648-689.
20. Gil, J.; Olivera, J. 2004. Preservación de semen de carnero a 5°C; resultados con diferentes diluyentes para la IA en majadas del Proyecto Merino Fino. In: *Distribución de Carneros Generados en el Núcleo Fundacional de Merino Fino de la Unidad Experimental "Glencoe" (5ª, 2004, Tacuarembó)*. Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 8-10 (Actividades de Difusión no. 392)
21. _____; Fierro, S.; Bentancur, O.; Olivera-Muzante, J. 2011. Chilled storage of ram semen improves with the addition of egg yolk and glycerol to milk-based extenders. *Reproduction in Domestic Animals*. 46 (3): 503-507.
22. Graham, J. 2001. Assessment of sperm quality; a flow cytometric. *Animal Reproduction Science*. 68: 239-247.
23. Gundogan, M.; Yeni, D.; Avdatek, F.; Fidan, A. 2010. Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Animal Reproduction Science*. 122: 200-207.
24. Hafez, E. 1989. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. México, Interamericana. 670 p.
25. _____; Hafez, B. 2004. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. Mexico, McGraw-Hill Inteamericana. pp. 419-427.
26. Hintz, H.; Legates, J.; Loosli, J.; Maynard, L.; Sorenses, A. M.; Warner, R.; Warwick, E. 1987. *Ganadería; guía para la reproducción, nutrición, cría y mejora del ganado*. México, McGraw-Hill Interamericana. 286 p.
27. Khalifa, T.; Lymberopoulos, A.; Theodosiadou, E. 2013. Association of soybean-based extenders with field fertility of stored ram (*Ovis aries*) semen; a randomized double-blind parallel group design. *Theriogenology*. 79: 517-527.
28. Kheradmand, A.; Babaei, H.; Batavani, R. A. 2006. Effect of improved diet on semen quality and scrotal circumference in the ram. *Veterinarski Arhiv*. 76 (4): 333-341.

29. Leahy, T.; Marti, J.; Evans, G.; Maxwell, W. 2010. Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 119: 147-153.
30. _____.; de Graaf, S. 2012. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. *Reproduction in Domestic Animals*. 47 (4): 207-213.
31. Lincoln, G. A.; Short, R.V. 1980. Seasonal breeding; nature's contraceptive. *Recent Progress in Hormone Research*. 36: 1-52.
32. López, A.; Söderquist, L.; Rodriguez-Martinez, H. 1999. Sperm viability in ram semen diluted and stored at 5 °C in three different extenders. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 40: 1-9.
33. _____.; Regueiro, M.; Castrillejos, A.; Pérez, R. 2011. Morfología espermática en carneros: efectos del plano nutricional y de la época del año. (en línea). *Veterinaria*. 47 (182): 15-21. Consultado 2 oct. 2014. Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/produccion_ovina/171-espermatoca_15.pdf
34. López Pérez, A. 1987. Evaluación de diferentes técnicas para la congelación de semen ovino. Tesis M. Sc. Cuautitlán Izcalli, México. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores. 97 p.
35. _____.; Pérez-Clariget, R. 2012. Ram seminal plasma improves pregnancy rates in ewes cervically inseminated with ram semen stored a 5° C for 24 hours. *Theriogenology*. 77: 395-399.
36. Mann, T. 1964. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. London, Methuen and Company. 493 p.
37. Marti, E.; Mara, L.; Marti, J.; Miño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J. 2007. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology*. 67: 1446-1454.
38. Martin, G.; Walkden-Brown, S. W. 1995. Nutritional influences on reproduction in mature male sheep and goats. *Journals of Reproduction and Fertility*. 49: 437-449.

39. Mata-Campuzano, M.; Álvarez-Rodríguez, M.; Tamayo-Canul, J.; López-Urueña, E.; de Paz, P.; Anel, L.; Martínez-Pastor, F.; Álvarez M. 2014. Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants; effect of temperature, extender and storage time. *Animal Reproduction Science*. 151: 137-147.
40. Maxwell, W.; Salamon, S. 1993. Liquid storage of ram semen; a review. *Reproduction, Fertility and Development*. 5 (6): 613-638.
41. _____; Evans, G.; Mortimer, S.; Gillan, L.; Gellatly, E.; McPhie, C. 1999a. Normal fertility after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reproduction Fertility and Development*. 11 (2): 123-126.
42. _____; Johnson, L. A. 1999b. Physiology of spermatozoa at high dilution rates; the influence of seminal plasma. *Theriogenology*. 52: 1353-1362.
43. _____; de Graaf, S. P.; El-Hajj Ghaoui, R.; Evans, G. 2006. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Society for Reproduction and Fertility Supplement*. 64: 13-38.
44. Melling, M.; Alder, M. 2000. *Práctica ovina y caprina*. Buenos Aires, Intermédica. 193 p.
45. Muiño-Blanco, T.; Pérez-Pe, R.; Cebrián-Pérez J. 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in Domestic Animals*. 43 (4): 18-31.
46. Ollero, M.; García-López, N.; Cebrián-Pérez, J.; Muiño-Blanco, T. 1997. Surface changes of ram spermatozoa by adsorption of homologous and heterologous seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. *Reproduction Fertility and Development*. 9 (4): 381- 390.
47. Paulenz, H.; Soderquist, L.; Pérez Pé, R.; Berg, K. 2002. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*. 57: 823-826.

48. Pérez García, T. 1958. Importancia de la tecnología correcta en la obtención del semen bovino. *Revista del Patronato de Biología Animal*. 4: 249-258.
49. Pérez-Clariget, R.; López, A., Castrillejo, A.; Bielli, A.; Laborde, D.; Gastel, T.; Tagle, R.; Queirolo, D.; Franco, J.; Forsberg, M.; Rodríguez-Martínez, H. 1997. Reproductive seasonality of Corriedale rams under extensive rearing conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 38: 109-117.
50. Pérez-Pé, R.; Barrios, B.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián, J. 2001. Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography B*. 760: 113-121.
51. _____; Grasa, P.; Fernández, M.; Peleato, M.; Cebrián-Pérez, J.; Muiño-Blanco, T. 2002. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked rams spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*. 61: 226-233.
52. Rodríguez, P.; Franco, E.; Jiménez, C. 2008. Estandarización de la prueba para espectrofotometría en la medición de concentración de semen bovino, equino, porcino, ovino y canino. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 55: 22-28.
53. Rodríguez-Martínez, H. 2013. Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. *Animal Reproduction*. 10 (3): 148-159.
54. Rubio, J.; Quintero, A. 2008. Uso de las pruebas de resistencia osmótica para valorar la funcionalidad espermática en toros. (en línea). *Desarrollo Sostenible de la Ganadería Doble Propósito*. 5: 617-627. Consultado 16 oct. 2013. Disponible en http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_50.pdf
55. Salamon, S.; Lightfoot, R. J. 1970. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method; III. The effect of insemination. The effect of the insemination technique, oxytocin and relaxin on lambing. *Journal of Reproduction and Fertility*. 22: 409-423.
56. _____; Maxwell, W. M. C. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62: 77-111.

57. Salisbury, G.; Van Demark, N.; Lodge, J. 1978. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial en los bóvidos. Zaragoza, ES, Acriba. 831 p.
58. Sample Size Calculator: comparing two proportions. (en línea). 2015. s.l. Consultado 10 feb. 2015. Disponible en <http://www.select-statistics.co.uk/sample-size-calculator-two-proportions>
59. Sarlós, P.; Egerszegi, I.; Balogh, O.; Molnár, A.; Cseh, S.; Ratky, J. 2013. Seasonal changes of scrotal circumference, blood plasma testosterone concentration and semen characteristics in Racka rams. Small Ruminant Research. 111: 90-95.
60. Setchell, B.; Breed, W. 2006. Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract. In: Neill, J.D. ed. Knobil and Neill's physiology of reproduction. San Diego, USA, Elsevier. pp. 771-825.
61. Snedecor, G. W.; Cochran, W. G. 1971. Statistical methods. Ames, Iowa, The Iowa State University. 114 p.
62. Soleilhavoup, C.; Tsikis, G.; Labas, V.; Harichaux, G.; Kohnke, P.; Dacheux, J.; Guérin, Y.; Gatti, J.; de Graaf, S.; Druart, X. 2014. Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. Journal of Proteomics. 109: 245-260.
63. Sorensen, A. M. 1982. Reproducción animal; principios y prácticas. México, Mc. Graw Hill. 539 p.
64. Tsakmakidis, I. 2010. Ram semen evaluation; development and efficiency of modern techniques. Small Ruminant Research. 92: 126–130.
65. Vera, N. M. 2009. Caracterización de la función sexual de carneros de la raza highlander y Suffolk. (en línea). Tesis Dr. Vet. Chillán, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. 36 p. Consultado 22 oct. 2014. Disponible en http://www.bibliodigital.udec.cl/sdx/UDEC4/tesis/2009/vera_n/doc/vera_n.pdf
66. Watson, P. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing. Reproduction, Fertility and Development. 7 (4): 871-891.