

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA AMBIENTE EN EL EMPAQUETADO DE
PAJUELAS SOBRE LA CALIDAD DE SEMEN OVINO**

“por”

**Ignacio José BERIAU MILICH
Emiliano Ricardo CALVO PANIZZA
María Inés PÉREZ MACHIAVELLO**

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

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2016**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa: _____
nombre completo y firma

Segundo miembro (Tutor): _____
nombre completo y firma

Tercer miembro: _____
nombre completo y firma

Cuarto miembro: _____
nombre completo y firma

Fecha: _____

Autores: _____
nombre completo y firma

nombre completo y firma

nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

A nuestro tutor Lic. Oscar Irabuena por el apoyo, dedicación y comprensión.

A nuestra co-tutora Q.F. Silvia Sterla por su colaboración y tiempo dedicado en este trabajo.

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

A la Ing. Agr. Celmira Saravia por sus aportes.

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

A Oscar Bertancur por su colaboración.

Al personal de la EEFAS por su contribución y amabilidad.

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

TABLA DE CONTENIDO	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	8
SUMMARY.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
➤ Aparato reproductor del carnero.....	13
• Recordatorio anatómico.....	13
➤ Espermatogénesis.....	14
• Endocrinología de la espermatogénesis.....	14
• Espermatozoide.....	15
• Factores que afectan la espermatogénesis.....	15
• Semen.....	18
➤ Metodología de la inseminación artificial.....	18
• Colecta de semen.....	18
• Excitación previa del carnero.....	19
• Manipulación del semen.....	19
• Evaluación del semen.....	19
• Diluyentes.....	25
• Congelación del semen.....	27
• Descongelación del semen.....	28
• Evaluación del semen post descongelado.....	28
• Métodos de inseminación artificial.....	28
➤ Características estacionales del clima en Uruguay.....	30
HIPÓTESIS.....	35
OBJETIVOS.....	35
➤ Objetivo general.....	35
➤ Objetivos específicos.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
➤ Localización del ensayo.....	36
➤ Ensayo de campo.....	37

➤ Manipulación y análisis de semen.....	38
➤ Análisis de estadístico.....	39
RESULTADOS	40
➤ Concentración.....	40
➤ Motilidad.....	40
• Análisis del tipo de movimiento de los espermatozoides.....	41
• Análisis de la velocidad de movimiento de los espermatozoides...44	
• Análisis de los parámetros de velocidad.....	47
➤ Análisis de motilidad en el tiempo.....	54
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES.....	57
BIBLIOGRAFÍA.....	58
ANEXOS.....	64

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1. Número de espermatozoides por eyaculado (E/E) antes y después de 6 días de apareamiento consecutivo.....	17
Tabla 2. Determinación de la concentración espermática a través del color del eyaculado.....	20
Tabla 3. Clasificación de la motilidad espermática.....	21
Tabla 4. Grados de movimiento en masa e individual.....	21
Tabla 5. Registros climáticos de la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía de Salto en 2015.....	34
Tabla 6. Media y desvío estándar de la concentración de espermatozoides por tratamiento.....	40
Tabla 7. Porcentaje de espermatozoides estáticos.....	41
Tabla 8. Porcentaje de espermatozoides progresivos.....	42
Tabla 9. Porcentaje de espermatozoides progresivos.....	42
Tabla 10. Porcentaje de espermatozoides no progresivos.....	43
Tabla 11. Porcentaje de espermatozoides lentos.....	44
Tabla 12. Porcentaje de espermatozoides medios.....	45
Tabla 13. Porcentaje de espermatozoides rápidos.....	46
Tabla 14. Porcentaje de STR rápido en espermatozoides tratados a 4°C, 20°C y 35°C.....	52

Figuras:

Figura 1. Parámetros de motilidad obtenidos por el CASA.....	24
Figura 2. Temperatura media en primavera en Uruguay, 1971-2013.....	31
Figura 3. Temperatura media en verano en Uruguay, 1971-2013.....	32
Figura 4. Temperatura media en otoño en Uruguay, 1971-2014.....	33
Figura 5. Temperatura media en invierno en Uruguay, 1971-2014.....	33

Figura 6. Ubicación geográfica de Salto.....	36
Figura 7. Ubicación geográfica de la Estación Experimental de Facultad de Agronomía en Salto.....	36
Figura 8. Disposición geográfica del establecimiento de estudio.....	37
Figura 9. Millones de espermatozoides/pajuelas en los diferentes tratamientos.....	40
Figura 10. Porcentaje de espermatozoides estáticos según temperatura de empaquetado.....	41
Figura 11. Porcentaje de espermatozoides progresivos según temperatura de empaquetado.....	42
Figura 12. Porcentaje de espermatozoides progresivos según temperatura de empaquetado	43
Figura 13. Porcentaje de espermatozoides no progresivos según temperatura de empaquetado	44
Figura 14. Porcentaje de espermatozoides lentos según temperatura de empaquetado	45
Figura 15. Porcentaje de espermatozoides medios según temperatura de empaquetado	46
Figura 16. Porcentaje de espermatozoides rápidos según temperatura de empaquetado.....	47
Figura 17. Tendencia cuadrática de la VCL total de los espermatozoides de pajuelas tratadas a 4°C, 20°C y 35°C	48
Figura 18. Tendencia cuadrática de la VCL rápida de los espermatozoides de pajuelas tratadas a 4°C, 20°C y 35°C	48
Figura 19. Tendencia cuadrática de la VSL total de los espermatozoides de pajuelas tratadas a 4°C, 20°C y 35°C	49
Figura 20. Tendencia cuadrática de la VSL rápida de los espermatozoides de pajuelas tratadas a 4°C, 20°C y 35°C	50
Figura 21. Tendencia cuadrática de la VAP total de los espermatozoides de pajuelas tratadas a 4°C, 20°C y 35°C	51
Figura 22. Tendencia cuadrática de la STR total de los espermatozoides de pajuelas tratadas a 4°C, 20°C y 35°C	52
Figura 23. Porcentaje de espermatozoides STR según temperatura de empaquetado.....	53
Figura 24. Tendencia cuadrática de la STR rápido de los espermatozoides de pajuelas tratadas a 4°C, 20°C y 35°C	53

RESUMEN:

Se evaluó el efecto de la temperatura ambiente sobre la calidad del semen ovino al momento del empaquetado en pajuelas en la región norte del Uruguay. Para ello se utilizaron tres carneros de la raza Merino Australiano a los cuales se les extrajo semen mediante electroeyaculador para criopreservar y proceder a su análisis post descongelado. Con las muestras de semen obtenidas se realizó un pool para eliminar el factor individual. Las diferentes temperaturas utilizadas fueron 4, 20 y 35°C respectivamente. Las características seminales, concentración y motilidad, fueron evaluadas por el método CASA. Se trabajó a dos niveles de significancia 5 y 10 %. Con respecto a la concentración no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los tres tratamientos estudiados. En lo que refiere al tipo de motilidad, los resultados indican que la condición más desfavorable resultó ser 35°C, en la cual el porcentaje de espermatozoides estático es mayor ($p < 0,10$). En cuanto al movimiento progresivo el grupo tratado a 20°C obtuvo diferencia significativa ($p < 0,10$) frente al de 4°C y 35°C. En los espermatozoides no progresivos no se observó diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,10$). En la velocidad de movimiento, no se observó diferencia significativa ($p > 0,10$) en los espermatozoides lentos. Los espermatozoides medios presentaron diferencia significativa ($p < 0,10$) en el tratamiento de 4°C, mientras que el porcentaje de espermatozoides rápidos fue significativamente mayor en el tratamiento de 20°C frente a los de 35°C, sin diferencia significativa con el tratamiento de 4°C. En los parámetros de velocidad, el análisis de las medias de VCL, VSL, VAP y STR, en el total de los espermatozoides no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$), pero si se encontró en el contraste de tendencias en el modelo cuadrático ($p < 0,05$). Mientras que en las variables de LIN y WOB no se encontró diferencias ni en las medias ni en el contraste de tendencias ($p > 0,05$). En el grupo de espermatozoides rápidos VCL, VSL y STR no hubo diferencia significativa en las medias ($p > 0,05$) pero si se encontró en el contraste de tendencias ($p < 0,05$). En el grupo de espermatozoides lentos y medios no se encontraron en ninguna de las variables analizadas diferencias significativas ($p > 0,05$) en medias ni en contraste de tendencias. Cuando se estudió la motilidad de los espermatozoides versus el tiempo transcurrido pos descongelado no se observó diferencias significativas ($p > 0,05$), entre los tratamientos.

SUMMARY

The effect of ambient temperature on the quality of sheep semen at the time of packaging in straws in the northern region of Uruguay was evaluated. We selected, three Australian Merino rams, and extracted the semen by electroejaculator for cryopreserving and proceed to post thawed analysis. With semen samples obtained we created a pool to eliminate the individual factor. Different temperatures were used 4, 20 and 35°C respectively. The seminal characteristics, concentration and motility were assessed by CASA method. We worked at two significance levels 5 and 10%. Regarding the concentration, no significant differences ($p>0.05$) in none of the three treatments studied were found. Regarding the type of motility, the results indicate that the most unfavorable condition turned out to be 35 ° C, in which the percentage of static spermatozoa is higher ($p<0.10$). As for the progressive movement the group treated at 20°C obtained significant difference ($p <0.10$) compared to 4°C and 35°C. In non-progressive sperm no significant differences between treatments ($p>0.10$) was observed. In the movement speed, no significant difference ($p>0.10$) was observed in slow sperm. Mean sperms showed significant difference ($p<0.10$) in treatment at 4°C, while the percentage of fast sperm was significantly greater in the treatment at 20°C compared to the ones at 35°C, no significant difference treatment at 4°C. In speed parameters, the analysis of the means of VCL, VSL, VAP and STR, in total sperm showed no significant difference ($p>0.05$), but it was found in contrasting trends in the quadratic model ($p<0.05$). While in LIN and WOB variables no differences were found, either in the middle or in contrasting trends ($p>0.05$).VCL, VSL and STR rapid sperm group, no significant difference in mean ($p>0.05$) was found, but it was found in contrasting trends ($p<0.05$). In the group of slow and medium sperm they were not found in any of the variables analyzed significant differences ($p>0.05$) in medium or contrasting trends. When sperm motility was studied versus elapsed time after thawing was no significant difference ($p>0.05$) between treatments was observed.

Revisión Lingüística



Prof. Adj. Carmen Silvia Gallo Muniz TT EPE MDL
Encargada del Área de Inglés
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

INTRODUCCIÓN

La economía del Uruguay depende en gran parte del sector agroindustrial. La producción ovina representa uno de los rubros de mayor importancia dentro del sector agropecuario.

En la década del '90 se alcanzaron números superiores a 25 millones de ovinos en el país, viéndose reducido a 7.427.000 en el año 2014 (MGAP-DIEA, 2015). Esta disminución en el stock ovino se debe a distintos factores como: variaciones del mercado lanero y carnicero, intensificación de otros rubros como la agricultura y forestación, problemas con la mano de obra, depredadores, robos, otros.

En el año 2007 la población total de carneros era de 209.000, en el año 2014 la misma se redujo a 153.000, indicando esto una disminución del 27% (MGAP-DIEA, 2015). Éste descenso no está dado solamente por la reducción del rubro en general, sino también por la mayor difusión y utilización de técnicas reproductivas que nos permiten la manipulación exclusiva del semen, inseminación artificial (IA) fundamentalmente.

En Uruguay, la reproducción de ovinos se realizaba tradicionalmente utilizando los carneros en servicio directo, siendo necesario para obtener un porcentaje de preñez aceptable con este método utilizar 3% de carneros en la majada (Duran Del Campo, 1980). Este manejo hace que los mismos estén más propensos a contraer lesiones y reducir su vida útil, además requiere de un número mayor de carneros para preñar la majada en comparación con la IA. En la misma, se necesita un porcentaje de carneros del 0,2% de las hembras, teniendo mayor disponibilidad de forraje para mayor número de ovejas de cría (Fernández Abella, 2015).

La técnica de IA en ovinos fue introducida a partir de la década del 30. Es un procedimiento en el cual no se produce la monta directa, sino que el semen es introducido en el tracto genital femenino por medios artificiales. La metodología completa de trabajo consta de recolección y manipulación del semen, análisis, dilución, inseminación y/o conservación del semen si no se insemina en el mismo día. En dicha técnica se puede por lo tanto utilizar semen fresco, conservado, refrigerado o semen criopreservado (Fernández Abella, 2015).

La IA trajo grandes ventajas tales como la manipulación de características productivas deseables de reproductores con alto valor genético, la obtención de gran cantidad de crías de un mismo padre (Gibbons y Cueto, 1995). Es una herramienta muy adecuada para mejorar características de la majada, es ejemplo de ello la obtención de lanas más finas en las majadas Merino fino. (Fernández Abella, 2006)

En la mayoría de los casos en Uruguay se realiza IA intracervical con semen entero (fresco) sin diluir, aunque también se puede diluir para su utilización (Gibbons y Cueto, 1995). A través de esta técnica se alcanzan porcentajes de 70 a 85% de preñez. Luego de obtenido el semen, el mismo debe ser utilizado lo antes posible, y no debe haber menos de 60 millones de espermatozoides por dosis inseminante (Fernández Abella, 2015).

Para conservar el semen es necesario diluirlo y refrigerar entre 10 y 15°C, pudiendo así mantener fertilidad por 12 horas. Las bajas temperaturas reducen las tasas metabólicas prolongando la vida útil del semen. Es posible refrigerar y mantener el

semen viable hasta 48 horas. Para ello se debe agregar yema de huevo al diluyente a razón de 5 a 10% del volumen total y realizar reducción paulatina de la temperatura, hasta llegar a 4 a 6°C en heladera o cámara de frío (Fernández Abella, 2015).

El congelamiento de semen brinda ventajas tales como permitir el transporte internacional y la conservación por períodos de tiempos ilimitados, lo cual facilita la obtención de características deseadas en la majada (Gibbons y Cueto, 1995).

Para llevar a cabo la inseminación con semen congelado, se pueden utilizar diferentes técnicas como laparotomía, intracervical y por laparoscopia, dando las dos primeras altos porcentajes de concepción, pero asociados a altos porcentajes de muertes embrionarias, lo que determina bajos porcentajes de parición. Además, la técnica cervical lleva a la manipulación excesiva del cuello uterino, predisponiendo a afecciones futuras en la fertilidad. En Uruguay con dosis inseminante de 80 millones de espermatozoides se ha logrado un 40% de preñez, depositando el semen congelado a más de un centímetro de profundidad cervical estimulando la dilatación del mismo (Fernández Abella, 2015).

La técnica más utilizada para realizar la IA con semen congelado es la laparoscopia, con dosis inseminante de 50 a 100 millones de espermatozoides. En Uruguay los porcentajes logrados son muy variables (10-75%), dependiendo de la condición corporal de la oveja al momento de la inseminación, el semen utilizado, el método, las hormonas empleadas y la práctica del operador (Fernández Abella, 2015).

Esta técnica presenta entonces dos grandes desventajas que son la necesidad de personal capacitado y el alto costo del equipo (Fernández Abella, 2015).

Las alteraciones bioquímicas y anatómicas de las células espermáticas producidas durante el proceso de congelación y descongelación provocan disminución de la capacidad fecundante de los espermatozoides. Las tasas de concepción deben ser superiores al 50%, para alcanzarlas son fundamentales los protocolos de conservación espermática para lograr una supervivencia en calidad y cantidad (Fernández Abella, 2015).

Es de gran importancia la velocidad de enfriamiento en la congelación y descongelación del semen en cuanto a la magnitud de los daños. Al realizar la congelación lenta, el período de acción de las altas concentraciones de sales intracelulares es mayor, favoreciendo la deshidratación. Por otro lado, al ser muy rápida la congelación, lleva a la pérdida de permeabilidad de la membrana celular en breve lapso, aumentando la cristalización intracelular (Alberio, 1979; Gil, 2003).

En búsqueda de reducir las pérdidas que se producen en este proceso, se utiliza el glicerol como sustancia crioprotectora para disminuir los daños. El mismo actúa uniéndose a la molécula de agua, provocando un descenso del punto de congelación y aumentando la viscosidad. Como resultado de esto se retarda la formación de hielo intracelular, producida por la pérdida de permeabilidad celular en congelación muy rápida, y la rápida concentración de soluto intracelular, favoreciendo la deshidratación, producida en congelaciones muy lentas (Fernández Abella, 2015).

La calidad espermática, tradicionalmente es evaluada “in vitro” según sus características macro y microscópicas (Fernández Abella, 2015). Estos parámetros no son indicadores directos de fertilidad, aun así, nos brindan información sobre la calidad seminal de una muestra (Buzón Cuevas, 2013).

La aparición de sistemas automatizados de análisis de semen, Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), ha permitido el estudio de características seminales tales como motilidad, concentración espermática, morfología, viabilidad, fragmentación de ADN en forma objetiva (Gil y cols., 2009).

El congelamiento de semen se realiza según las siguientes etapas:

- Colecta de la muestra de semen
- Dilución de la muestra de semen en diluyente previamente termostatzado a una temperatura entre 30 y 32 °C
- Empaquetado
- Tiempo de equilibrio durante 2 a 3 horas a temperatura entre 4 y 5°C
- Congelamiento propiamente dicho y almacenamiento (Fernández Abella, 2015).

Se reportan mejores resultados con semen ovino cuando se empaqueta en pajuelas a temperaturas entre 4 y 6°C (Maxwell y col., 1996). En condiciones “a campo”, si no se cuenta con una cámara de frío, es recomendable realizar el llenado de pajuelas a 20-25°C para luego ser llevado a una nevera o refrigerador durante 2 o más horas (período de equilibrio) (Fernández Abella, 2015).

En nuestro país, la estación de cría en la raza Merino comienza a fines de noviembre y se extiende hasta junio del año siguiente (Fernández Abella y col., 1994). Las temperaturas medias registradas en Uruguay en primavera de 2013 fueron de 17.6°C, en verano 23.2°C y en otoño 17.2°C (INUMET). En la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía de Salto, se registró durante el año 2015 en primavera una media de 17.5°C, en verano 24.5°C, mientras que en otoño e invierno fueron de 20.3°C y 14.6°C respectivamente. (Comunicación personal Ing. Agr. Celmira Saravia, 08/09/2016)

Estos registros de temperaturas muestran que una de las dificultades que enfrenta el congelamiento de semen ovino “a campo” son las variaciones de la misma en el momento de empaquetarlo en pajuelas. Puede que esto ocurra durante períodos breves, pero podría afectar la calidad seminal resultante post descongelamiento y por lo tanto la fertilidad. El tiempo transcurrido entre el descongelamiento y la IA no debe superar los 15 minutos, por lo que el entrenamiento del operador es un factor determinante en los resultados alcanzados (Comunicación personal Ing. Agr. Fernández Abella, 03/08/2016).

Por lo expuesto anteriormente en este trabajo se propone evaluar el impacto de diferentes temperaturas sobre la calidad seminal de carneros Merino Australiano al momento del empaquetado del mismo en las pajuelas, y la evaluación de motilidad a diferentes tiempos pos descongelado, utilizando para ello un equipo computarizado de análisis de semen.

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

Aparato reproductor del carnero

Recordatorio anatómico

Los genitales del macho son los responsables tanto de la producción de gametos masculinos como de su conducción y deposición de los mismos en los genitales de la hembra. Fundamentalmente, se encuentran constituidos por testículos, ductos excretores y glándulas anexas (Duran Del Campo, 1980).

Los testículos comprenden dos funciones fundamentales, la producción de espermatozoides y de la hormona testosterona. Estos se encuentran suspendidos en una derivación de la piel, proporcionándoles un ambiente adecuado de 2 a 3 grados inferiores a la temperatura abdominal. En el centro de los mismos se encuentra el mediastino testicular, compuesto por tejido fibroso. Éste irradia tabiques, provocando la división del parénquima en lóbulos. El interior de ellos se encuentra compuesto por tubos seminíferos, integrados por un epitelio germinal. En los espacios existentes entre los lobulillos se encuentra el tejido intersticial, con predominancia de las células de Leydig, encargadas de la producción de la hormona testosterona, fundamental para el comportamiento masculino. Los tubos seminíferos desembocan en la rete testis, los cuales serán comunicados con el epidídimo a través de los conductos eferentes (Duran Del Campo, 1980).

El desarrollo testicular se encuentra directamente relacionado con la producción espermática. Se considera que por cada gramo testicular se produce un promedio de 23 millones de espermatozoides por día (Fernández Abella, 2003).

El epidídimo se divide en cabeza, situada arriba del testículo, cuerpo, situado sobre el borde interno, y cola, en el polo inferior. Ésta última tiene la función de almacenamiento de espermatozoides (Fernández Abella, 2003).

El epidídimo aporta un medio adecuado para que los espermatozoides se concentren, maduren y adquieran la capacidad de fecundación (Cunningham y Klein, 2009).

A continuación de la cola del epidídimo se encuentra el conducto deferente que se introduce al cordón testicular junto a un paquete de elementos integrado por vena, arteria, nervios y fibras musculares del músculo cremaster. En el interior de la cavidad abdominal se ensancha formando las ampollas de Hanle, que se encuentran sobre el cuello de la vejiga. Luego, se les denomina conductos eyaculadores a los canales que se encargan de conectar los tubos seminíferos con el exterior (Duran Del Campo, 1980).

Las glándulas anexas son otros componentes importantes del aparato reproductor. Además de las ampollas, se encuentran las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales. Ellas le dan fluidez, volumen y movilidad al eyaculado (Duran Del Campo, 1980).

La uretra se encuentra atravesando el pene, el mismo finaliza con una estructura llamada apéndice vermiforme, la misma es fundamental al momento del servicio natural (Duran Del Campo, 1980).

Espermatogénesis

Este procedimiento indica la génesis de los espermatozoides. El proceso se inicia con la célula gonocito que, al llegar la pubertad, comienzan a dividirse, formando las células denominadas espermatogonias. Existen diferentes tipos dentro de estas por el aspecto de su núcleo. Las tipo A presentan un núcleo liso, que luego de varias divisiones adquieren un núcleo costroso y se las denominará tipo B. Luego estas espermatogonias sufrirán otra mitosis que dará lugar a los espermatocitos primarios, siendo estas las células en las que ocurrirá la división meiótica. Luego volverán a dividirse y tomar el nombre de espermatocito secundario durante apenas unas horas, para luego dar lugar a partir de dos divisiones a los espermátidas. Estas últimas sin volver a dividirse, pero sufriendo modificaciones y transformaciones morfológicas, son las que darán lugar a los espermatozoides. Una vez formados ingresan a la luz del tubo seminífero (Duran Del Campo, 1980).

La meiosis es una división en la que se produce la reducción del material genético, conservando solo la mitad de los cromosomas de la célula madre, a partir de dos divisiones celulares sucesivas. A los espermatocitos se les denomina primarios si están en la primera división y secundarios si están en la segunda (Ungerfeld, 2002a).

Se pudo lograr determinar la duración de la espermatogénesis con la utilización de sustancias rastreadoras; estas contienen elementos radiactivos capaces de pegarse y así etiquetar los espermatozoides. Se ha determinado un lapso de 49 días aproximadamente desde la inyección de la sustancia rastreadora que se fijan a las espermatogonias, hasta la aparición del primer espermatozoide en la luz del tubo seminífero (Duran Del Campo, 1980).

El índice diario de producción espermática medido a través de la contabilización de espermatozoides por gramo testicular (método histológico Ortavant), ha determinado una cantidad de 27.000.000 de espermatozoides por gramo diarios (Duran Del Campo, 1980).

Endocrinología de la espermatogénesis

El hipotálamo es el responsable de liberar la hormona GnRH, encargada de regular la actividad reproductiva al ser liberada a los vasos porta hipofisarios de manera pulsátil, estimulando a la hipófisis para que secrete hormonas (Ungerfeld, 2002a).

Las hormonas hipofisarias actúan sobre los testículos con el fin de iniciar y mantener la espermatogénesis (Duran Del Campo, 1980).

Desde el punto de vista morfológico se clasifica la hipófisis en lóbulo anterior, medio y posterior. En cuanto a las hormonas que actúan en la esfera de la reproducción se encuentran: Prolactina, FSH y LH. La del lóbulo posterior es la oxitocina (Duran Del Campo, 1980).

Las hormonas sexuales, al llegar la pubertad, comienzan a ser segregadas por la hipófisis y, mediante el torrente circulatorio, llegan a su órgano blanco, el testículo. Allí, la FSH incita a la capa celular más excéntrica del epitelio germinal a dar inicio a la serie de divisiones que llevarán a la formación de nuevos espermatozoides (Duran Del Campo, 1980).

La principal función de las células de Leydig es la producción de testosterona. La producción de esta hormona por parte de la célula intersticial está controlada por la LH (Ungerfeld, 2002a).

Es de suma importancia la presencia de la LH, no solamente por su función en cuanto a las células de Leydig, sino también para permitir una adecuada función de la FSH (Duran Del Campo, 1980).

La testosterona además de ser la hormona masculina encargada de inducir las características sexuales del macho, también es importante para posibilitar una apropiada actuación de la FSH (Duran Del Campo, 1980).

Las células de Sertoli presentes en el túbulo se encuentran reguladas por las hormonas FSH y testosterona. Pruebas existentes indican que la FSH estimula a las células de Sertoli a aromatizar la testosterona y producir estrógenos. Por otra parte, la FSH estimula la producción de ABP, la cual es secretada en los espacios intercelulares del epitelio seminífero y en la luz de los túbulos seminíferos. Dicha proteína tiene la función de mantener las altas concentraciones de andrógeno presente en los túbulos seminíferos (Ungerfeld, 2002a).

Las células de Sertoli producen una hormona proteica denominada inhibina. El efecto de dicha proteína es suprimir la secreción de FSH, probablemente actuando directamente sobre la hipófisis (Ungerfeld, 2002a).

Espermatozoide

El espermatozoide es una célula haploide compuesta por dos estructuras, la cabeza y la cola (Senger, 2003).

El espermatozoide se lo divide morfológicamente en cabeza y cuerpo. La cabeza está compuesta por el núcleo, en el que se disponen los cromosomas, siendo estos los responsables de transportar el material genético paterno. Las dos terceras partes de la cabeza se encuentran cubiertas por el acrosoma o capuchón cefálico, éste contiene enzimas necesarias para la penetración de las membranas del óvulo (Duran Del Campo, 1980).

El elemento locomotor por excelencia es la cola del espermatozoide. El cuello contiene el centriolo proximal. La estructura y forma del esqueleto de la cola se la dan unión con la cabeza donde se originan 20 minúsculas fibras (filamento axial) que se agrupan formando dos anillos concéntricos de 9 fibras cada uno, estas envuelven a su vez otras dos fibras centrales, y se prolongan hasta la pieza final. El relajamiento y contracción de las fibras son las que producen el característico movimiento del espermatozoide, el cual permite el avance de la célula. El movimiento del espermatozoide se originaría en el centriolo proximal y es transmitido a las fibras de filamento axial (Duran Del Campo, 1980).

Factores que afectan la espermatogénesis

En cuanto a los factores que afectan la producción de espermatozoides no encontramos con diferentes causas como la raza, edad, fotoperíodo, alimentación, temperatura, frecuencia de eyaculación, entre otras, siendo de menor o mayor importancia.

En cuanto a la raza, se encuentran importantes variaciones en la concentración espermática, encontrándose eyaculados más concentrados en razas carniceras que en razas laneras (Fernández Abella, 2015). En el Uruguay, trabajos realizados demostraron un descenso del 10% de la producción espermática en la raza Corriedale en comparación con Ideal, Merino y Merilín, constatada por una menor producción por volumen testicular, lo que reduce la espermatogénesis (Fernández Abella y col., 1993).

Se puede determinar que el factor de la edad influye en la producción espermática, ya que ésta se encuentra directamente relacionada al desarrollo testicular (Fernández Abella, 2015). Aunque, estudios afirman que la correlación del crecimiento testicular con el peso vivo es mayor que con la edad (Courot, 1962; Sanford y Dickinson, 2008), por esto al producir una mejora en el peso corporal de los borregos, podemos mejorar su producción espermática (Fernández Abella y col., 1992). Por otro lado, en el macho joven se observan anomalías primarias, las cuales son producidas durante la espermatogénesis, determinando un descenso del 10% de fertilidad en el semen de borrego (Colas, 1983) con respecto al macho adulto al realizar inseminación artificial, incrementándose el porcentaje en servicios a campo por tener menor libido y capacidad de servicio (Fernández Abella, 2015).

El fotoperiodo es otro de los factores que se encuentra involucrado en el descenso de la espermatogénesis. El peso testicular en el carnero evoluciona en sentido inverso a la duración de las horas luz (Ortavant, 1958; Alberio y Colas, 1976; Lindsay y col., 1984). La cantidad de espermatozoides liberados dentro de los tubos seminíferos se ve influenciada por la eficiencia del proceso de espermatogénesis, la que determina los cambios en el peso testicular (Hochereau de Reviere y col., 1976). La producción espermática existente en otoño, se encuentra relacionada con el tamaño testicular y los niveles hormonales de testosterona y FSH presentes en primavera (Fernández Abella y col., 1999).

Por otro lado, la alimentación es fundamental para determinar la talla testicular, ya que acompaña los cambios en el crecimiento de las pasturas. Los cambios en la alimentación llegan a enmascarar los efectos del fotoperiodo (Fernández Abella y col., 1993).

Los alimentos que contienen alto porcentaje de proteínas logran incrementar aproximadamente un 40% la producción espermática (Oldham y col., 1978; Cameron y col. 1988). En cambio, los que son ricos en energía provocan procesos degenerativos en la maduración espermática (Gunn, 1942; Galloway, 1966).

Los niveles de testosterona descienden en la subnutrición, debido a la reducción de pulsos de LH. Por esto, no solo se ve influenciada la producción espermática, sino también la disminución de la libido (Lindsay y col., 1984; Louvandini y col., 2008).

En carneros que son alimentados con pasturas secas, presentando deficiencias en vitaminas y minerales, producen alteraciones morfológicas y reducción en la concentración espermática al verse afectada la espermatogénesis (Sapsforf, 1951).

Actuales estudios demuestran que la administración de selenio tres semanas previas al servicio o inseminación mejora la fertilidad del semen (Fernández Abella y col., 2013).

En lo que refiere a la temperatura, está determinado que al estar aumentada la misma, actúa directamente sobre el testículo reduciendo así la síntesis de testosterona y alterando la espermatogénesis (Moule y Waites, 1963; Waites y Ortavant, 1968; Gomes y col., 1971). También se ven afectados en el periodo de maduración mientras se encuentran en el epidídimo, por esto se pueden apreciar alteraciones a tan solo dos semanas de la exposición a temperaturas elevadas (Dutt, 1954; Dutt y Hamm, 1957; Braden y Mattner, 1970). En cuanto al volumen del eyaculado y la libido de los carneros no se observan alteraciones, por lo que habrá normalidad en los servicios habiendo repercusiones por bajos porcentajes en la parición (Ortavant, 1958).

La frecuencia de eyaculación durante la época reproductiva hace que el peso testicular decaiga a una tasa de 40 gramos por semana, sin estar influenciado por el peso testicular inicial, ni la relación carnero/oveja, ni el estado nutricional de los carneros. Debido a esto, en el eyaculado de los reproductores a los pocos días de comenzados los servicios se encuentra disminuida la concentración de espermatozoides (Fernández Abella, 2015).

Tabla 1. Número de espermatozoides por eyaculado (E/E) antes y después de 6 días de apareamiento continuo.

Carnero	E/E (en millones)		N° de eyaculados/ día	
	Día 1	Día 6	Día 1	Día 6
1	2546	9	28	13
2	1885	13	16	12
3	1721	12	18	10
4	3797	80	24	18
5	3671	65	8	16
6	2244	16	8	11
7	10949	11	21	6
8	8570	14	24	6

Fuente: Synnott y col., 1981.

Ensayos realizados en la Estación Experimental de Agronomía Salto demostraron que carneros de razas laneras recurren a sus reservas extra gonadales luego de 3 o más eyaculados por día. Debido a esto es importante que los reproductores al comenzar los servicios lleguen con un volumen testicular adecuado e importantes reservas a nivel epididimario (Fernández Abella, 2015).

El funcionamiento de la espermatogénesis se pone en peligro con cualquier causa que aumente por encima de los valores normales la temperatura corporal, como pueden ser estados febriles producidos por enfermedades infecciosas, defectos anatómicos, procesos inflamatorios o defectos congénitos reduciendo o anulando la fertilidad del reproductor (Burgess, 1982; Grajales y Tovío, 2008).

En Uruguay las principales causas por las cuales los reproductores machos no están aptos para entrar en servicio son: el aparato locomotor (24.99%), problemas testiculares (16.67%) y epididimarios (6.67%), existiendo un total de 8% de carneros que presentan alguna de estas patologías (Fernández Abella, 2015).

La consanguinidad lleva a defectos de origen genéticos produciendo diferentes patologías como “testículos reloj de arena” causante de disminuir la producción de espermatozoides. Otra alteración que puede producir la consanguinidad es el escroto hendido, siendo este problema muy heredable. Por otra parte, el criptorquidismo uni o bilateral es determinado por un gen recesivo pudiendo producir esterilidad en aquellos que presentan el segundo (Bomssel-Helmreich y Thiabault, 1967; Bruere y Chapman, 1974). Los otros son fértiles pero este problema tiene gran descendencia a la progenie produciendo hipoplasia y criptorquidismo en los machos y alteraciones en el aparato genital de la hembra, como ausencia de una o ambas trompas (Fernández Abella, 2015).

Semen

El semen es el producto de la mezcla del material fluido y morfológico. El primero es producido por los conductos excretores y glándulas anexas del aparato genital, siendo estas las vesículas seminales, próstata, glándulas de Cowper, uretrales o Littre y uretra. En cuanto a la parte morfológica, esta es producida por los testículos, espermatozoides (Duran Del Campo, 1980).

El carnero emite un promedio de volumen de semen de 0.8 a 1.5 mL. Del mismo el 74% corresponde a líquido seminal y 26% a los espermatozoides. El fluido seminal presenta un pH ácido de 6.5 a 6.8. Contiene un 86% de agua y el 14% restante es materia seca, siendo la misma diversas sales inorgánicas y trazas minerales. Las sales de yodo, calcio y potasio son las más importantes, también encontramos magnesio, hierro, ácido láctico y cítrico, aminoácidos, proteínas, vitaminas, enzimas, entre otros. En cuanto a los carbohidratos la fructosa es la más importante y abundante, la misma es la causante de proporcionar energía al espermatozoide mediante su desdoblamiento químico (Duran Del Campo, 1980).

Metodología de inseminación artificial

Ésta es una herramienta de reproducción, en la cual el hombre interviene aplicando técnicas que consisten en colectar y luego depositar el semen en el tracto reproductivo de la hembra. Esto se realiza en base a diferentes objetivos como aumentar las características productivas deseables de reproductores de alto valor genético, y así mismo obtener un alto número de crías de determinado padre, debido al adecuado fraccionamiento del semen, que nos permitirá obtener un número importante de dosis inseminante por eyaculado (Gibbons y Cueto, 1995).

Colecta de semen

Al momento de colectar, las alternativas que se utilizan son la vagina artificial y el electroeyaculador.

La primera es una imitación de la vagina de la oveja, la cual estimula térmicamente, a través de la temperatura, así como mecánicamente, a través de la presión para lograr la eyaculación. Luego de verificar la higienización del lugar y la del animal, se procede a asegurar la oveja en el cepo. Al momento de la monta, el colector que se encuentra del lado derecho del carnero, debe desviar el pene lateralmente para así enfrentarlo a la vagina artificial (Gibbons y col., 1993).

En cuanto a la electroeyaculación, se trata de un electrodo bipolar. Al introducirlo en el recto del animal, libera corriente alterna de 6 a 12 voltios. El volumen obtenido de semen es mayor a la colecta con vagina debido a una mayor estimulación de las glándulas anexas (Fernández Abella, 2003).

El método mayormente recomendado es la vagina artificial, ya que ésta no presenta contaminación por orina, ni mayores volúmenes, pero con concentración espermática menores como lo presenta la electroeyaculación. Además, la vagina artificial permite obtener eyaculados con alta motilidad y concentración espermática. Para poder utilizar esta técnica, los animales seleccionados deben ser entrenados para saltar con la presencia del operador (Gibbonsy col., 1993)

Excitación previa del carnero

Para obtener un buen eyaculado es recomendable excitar previamente al carnero. Existen diferentes tipos de libido en los reproductores, fuerte, vivo, quieta y débil. En carneros de libido fuerte la eyaculación es de mayor facilidad, llevándose a cabo en poco tiempo. A medida que la escala disminuye, no solo tardan más, sino que a veces la estimulación es necesaria. Para obtener un buen eyaculado es conveniente seleccionar una oveja en celo, incitar al carnero a su cortejo y en caso de que el reproductor presente libido débil ponerlo junto al lote de ovejas en celo durante algunas horas. Carneros con libido débil se acostumbran rápidamente a la misma oveja y pierden interés, por esto si debe extraerse semen más de una vez es posible que sea necesario cambiar la oveja en celo (Duran Del Campo, 1980).

Cuando el carnero haya completado el periodo de excitación es necesario no producir en el ningún tipo de sensaciones desagradables como podrían ser movimientos bruscos, gritos, ladridos de perro, exceso de calor en la vagina, etc. En buenas condiciones serán capaces de trabajar en vagina artificial por largo tiempo (Duran Del Campo, 1980).

Investigaciones realizadas en otras especies como la bovina, han demostrado un notorio mejoramiento del material seminal cuando se realiza la excitación previa de los reproductores. Aunque no existan estudios referentes a los carneros, es muy probable que se obtenga para ellos el mismo resultado que en los bovinos (Duran Del Campo, 1980).

Manipulación del semen

Luego de la obtención del eyaculado, es importante que este no sea expuesto a cambios bruscos de temperatura, así como a contacto con agua metales radiación solar directa e impurezas. Debido a eso, es importante la manipulación del mismo el menor tiempo posible, con objetos de vidrio o plástico, estériles, secos y con la misma temperatura del semen (Gibbons y col., 1993)

El color y motilidad en masa del eyaculado son los que indican si el mismo es óptimo para su utilización o no. Luego se debe estimar el volumen y la concentración espermática para realizar la correcta dilución. Esta se lleva a cabo para incrementar las dosis inseminante del carnero, como para brindar nutrición y protección contra enfriamiento y congelamiento a los espermatozoides (Gibbons y col., 1993)

Evaluación del semen

En un eyaculado fecundante, las cualidades que deberían tener los espermatozoides son motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcional de la membrana, integridad de las enzimas asociadas a la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético (Graham, 1996).

Espermiograma clásico

Debe determinarse la calidad seminal a través de la evaluación del semen para reducir las posibles pérdidas por utilización de semen de baja calidad.

La evaluación consiste en una prueba macroscópica, microscópica y bioquímica. La primera consiste en evaluar volumen, color, olor, motilidad masal (Fernández Abella, 2015).

En cuanto al volumen, normalmente se encuentra entre 0,5 y 2,0 mL, esto depende de la excitación previa del animal, de la época del año en que se realiza la colecta, la edad del mismo, número de eyaculados por día y el método de colecta (Fernández Abella, 2003).

El color varía según la concentración de espermatozoides en el eyaculado, pudiendo ser desde claro hasta crema oscuro.

Tabla 2. Determinación de la concentración espermática a través del color del eyaculado.

Tonalidad	Millones/ml
Crema muy oscuro	4000
Crema oscuro	2800
Crema	2000
Crema claro	1600
Lechoso	1000
Lechoso claro	500
Nublado	100
Claro	Insignificante

Fuente: Fernández Abella y Villegas 1992, modificado Fernández Abella 2002.

Debe ser desechado el eyaculado que tenga color rojizo, ya que éste indica la presencia de sangre. Asimismo, los colores grises o marrones en el semen indican contaminación o infección (Gibbons y col., 1993).

Debe de ser inodoro, cualquier olor percibido debido a una infección o contaminación con orina (Fernández Abella, 2015).

La motilidad masal se observa en el propio tubo de colecta. Se pueden observar ondas que son producto de la concentración espermática, movilidad de espermatozoides y porcentaje de células espermáticas vivas (Fernández Abella, 2003).

Las pruebas microscópicas comprenden la evaluación del semen a microscopio. Estas incluyen el movimiento masal, motilidad individual, concentración, morfología y vitalidad.

Luego de agitar y homogeneizar el eyaculado, se procede a sacar una gota con una pipeta Pasteur templada y colocarla en un portaobjeto limpio, seco y entibiado a 37°C, se realiza la observación microscópica con 100 aumentos (Gibbons y col., 1993).

En la evaluación de la motilidad individual se verifica el porcentaje de espermatozoides que presenten un movimiento progresivo o normal, ya que esto determina que el espermatozoide avance y pueda fecundar (Fernández Abella, 2015).

Tabla 3. Clasificación de la motilidad espermática.

Escore	Clase	Espermatozoides vivos	Clasificación
0	-	Sin actividad	-
1	-(+)	10%	Mala
2	+	20-40%	Mediocre
3	++	50-65%	Aceptable
4	++(+)	75-80%	Buena
5	+++	90%	Muy buena

Fuente: Evans y Maxwell, 1987.

Tabla 4. Grados de movilidad en masa e individual.

Grado	Movilidad masal (Macroscópica)	Movilidad individual (Microscópica)
0	Sin corrientes	Sin movimiento progresivo
1	Pocas corrientes	20% de movimiento progresivo
2	Muchas corrientes moderadas	40% de movimiento progresivo
3	Muchas corrientes	60% de movimiento progresivo
4	Muchas corrientes rápidas	80% de movimiento progresivo
5	Numerosas ondas de tipo tumultuoso rápidas y vigorosas	Casi 100% de movimiento progresivo

Fuente: Moule, 1961.

En cuanto a la concentración, existen distintos métodos que nos permiten cuantificar los espermatozoides en el eyaculado. Ésta es fundamental para realizar la dilución (Fernández Abella, 2015). Entre ellos se encuentran la cámara de Neubauer y el

espectrofotómetro. Ambos métodos son precisos, siendo el espectrofotómetro más rápido y la cámara de Neubauer menos costosa (Gibbons y col., 1993). La concentración normal en un carnero es de 2000 a 3000 millones/ml.

Para realizar el recuento en cámara de Neubauer, se debe aspirar semen en una pipeta que contiene suero fisiológico igual a 1:200. Luego de aspirarlo, se debe limpiar el extremo de la pipeta para que no altere los resultados. Se coloca al borde del cubreobjetos y se dejan caer las gotas de semen de manera que por capilaridad se cargue la cámara. Ésta cuenta con dos retículos, con cinco cuadrados grandes, y dentro de cada uno de estos hay 16 cuadrados chicos, separados por líneas dobles o triples. La superficie total de la cámara es de $1/2,5 \text{ mm}^2$, la altura es de $1/10 \text{ mm}$ y la dilución 1:200, por lo que la concentración se obtiene (millones por mm^3) multiplicando el número de cuadrados grandes por el factor 5000. En el recuento de cada cuadrado se tienen en cuenta todos los espermatozoides que se encuentran, siempre manteniendo el criterio de las cabezas, considerándolos dentro o fuera dependiendo de la ubicación de la misma (Fernández Abella, 2015).

Es de gran importancia la evaluación de la morfología, ya que existe una alta correlación negativa entre el porcentaje de formas anormales y el poder fecundante del semen (Fernández Abella, 2003). Esta se lleva a cabo colocando una gota de semen en un portaobjeto, para luego apreciar tanto las formas normales como las anormales de los espermatozoides presentes en el eyaculado.

La vitalidad de los espermatozoides se evalúa a través de la tinción con eosina-nigrosina. Se procede a la deposición de una gota de semen en portaobjeto, para luego depositar la solución, tiñendo de rosado los espermatozoides muertos. (Fernández Abella, 2003).

El pH es fundamental para descartar sémenes que no se encuentren en el rango adecuado. Esto se realiza midiéndolo a través de papel indicador.

Sistemas computarizados de análisis espermático (CASA)

Para predecir la capacidad fecundante de espermatozoides, se desarrollaron nuevas tecnologías in vitro como el Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), que posibilita el estudio de múltiples características funcionales y morfológicas (Quintero-Moreno y col., 2011).

Las técnicas tradicionales de análisis espermático, a pesar de ser rápidas y prácticas, tienen una variación entre los laboratorios que oscila de 30 a 60%, debido a que el método manual lo realizan operadores con diferentes interpretaciones, las que varían según la formación y experiencia del mismo, es pues subjetivo y pasible de error humano. Lo cual es muy importante al momento de la selección de los reproductores (Rodríguez-Martínez, 2003).

En las últimas dos décadas, a través del uso del CASA se han unificado los criterios, ya que este método permite conocer la calidad seminal de manera apropiada y objetiva. Además, permite la clasificación y pronóstico de fertilidad o comparación por procesamientos de análisis, ya que el registro de los datos cuantitativos es más fácil, simplificando la comparación de los resultados. El costo del equipo, la necesidad de extrema validación y la normalización de las medidas realizadas son

las desventajas que presenta el método CASA frente al tradicional (Rodríguez-Martínez, 2003).

El CASA permite la evaluación automatizada y clasificada de la concentración espermática y la motilidad (Osorio, 2013).

El software que contiene el CASA, identifica y mide automáticamente los parámetros de los movimientos de los espermatozoides en campos microscópicos capturados con objetivo 10X y contraste de fase negativa. También calcula porcentaje y concentración espermática de la muestra seminal. Los resultados del análisis incluyen los parámetros de: Velocidad curvilínea (VCL), Velocidad media (VAP), Velocidad rectilínea (VSL), Índice de rectitud (STR), Índice de linealidad (LIN), Índice de oscilación (WOB), Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH) y Frecuencia de batido de la cabeza (BCF). El tiempo de análisis es de 1 segundo por campo (Bernardi y col., 2011).

VCL - Velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$): velocidad media medida punto a punto sobre el recorrido de la cabeza espermática. Es la distancia total que la cabeza del espermatozoide cubre en el período de observación y es siempre el mayor de los tres parámetros de velocidad.

VSL - Velocidad rectilínea ($\mu\text{m/s}$): velocidad media medida en una línea recta desde el principio hasta el final de la trayectoria recorrida. Se determina como la distancia en línea recta entre el primero y el último punto de la trayectoria y da el espacio recorrido en el período de observación. Es siempre el menor de los tres parámetros de velocidad en cualquier espermatozoide.

VAP - Velocidad media ($\mu\text{m/s}$): velocidad media del recorrido del espermatozoide. Se determina como la distancia que el espermatozoide ha seguido en su trayectoria durante el período de observación. Puede parecer similar a la VSL.

LIN - Índice de linealidad (%): estima la proximidad de las trayectorias de las células espermáticas a una línea recta. Se calcula como el cociente entre la velocidad media medida en una línea recta (VSL) y la velocidad media medida punto a punto a lo largo del recorrido (VCL) $\rightarrow (VSL / VCL) \times 100$.

STR - Índice de rectitud (%): estima la proximidad del recorrido seguido por las células espermáticas a una línea recta y se calcula como cociente entre la velocidad media medida en una línea recta desde el primer punto hasta el último de la trayectoria recorrida (VSL) y la velocidad media del recorrido del espermatozoide (VAP) $\rightarrow (VSL / VAP) \times 100$.

WOB - Índice de oscilación (%): estima la relación entre la trayectoria recorrida por el espermatozoide y la oscilación de la cabeza espermática y se calcula como cociente entre la velocidad media del recorrido del espermatozoide (VAP) y la velocidad media medida punto a punto sobre el recorrido de la cabeza espermática (VCL) $\rightarrow (VAP / VCL) \times 100$ (Quintero-Moreno y col., 2003).

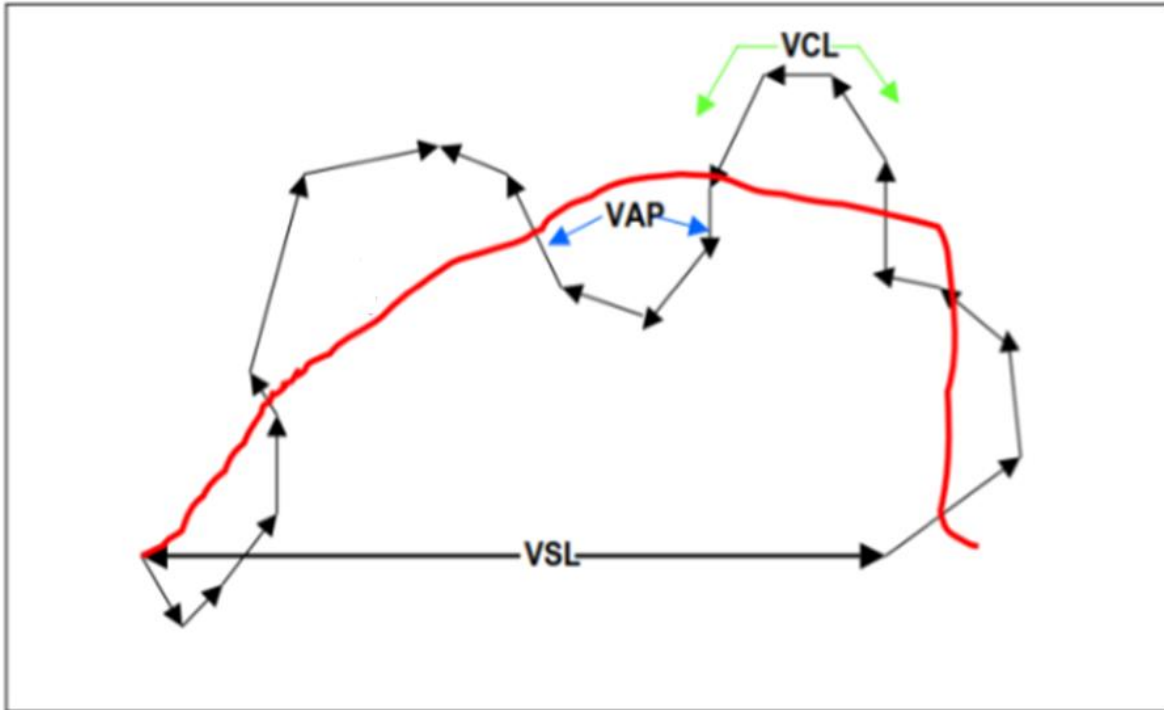


Figura 1. Parámetros de motilidad obtenidos por el C.A.S.A.

VCL – Velocidad Curvilínea

VSL – Velocidad Rectilínea

VAP – Velocidad Media

Fuente: Quintero-Moreno y col., 2003.

Para llevar a cabo el análisis de movilidad, debe tenerse en cuenta que el tiempo que pasa desde la obtención o descongelación del semen hasta el análisis no sea largo, ya que se producen cambios en los espermatozoides que afectan la movilidad. También es extremadamente importante no exponer la muestra a repentinos cambios de luz y/o temperatura. Antes de pipetear la muestra debe ser homogeneizada, ya que los espermatozoides muertos tienden a sedimentar, mientras que los vivos se mantienen en movimiento suspendidos en el medio, y esto llevaría a un error en los resultados. Luego de depositar la muestra en un portaobjetos se procede a capturar y analizar los campos microscópicos, los espermatozoides son clasificados según su movimiento y marcados con diferentes colores. A partir de las imágenes obtenidas se realizan las determinaciones porcentuales y absolutas de los diferentes parámetros y se elaboran los informes correspondientes. Es de gran importancia analizar un mínimo de 200 células por campo (ISASv1®).

Para evaluar la concentración es necesario homogeneizar y fijar la muestra. Los espermatozoides deben ser inmovilizados mediante una fijación química para obtener un recuento correcto. Para ello se utiliza una solución conteniendo 50g de NaHCO₃, 10 mL de formol al 35% (v/v) y agua destilada cantidad suficiente para un volumen de 1000 mL. La muestra se debe agitar vigorosamente y cargar la cámara de Makler con una alícuota de la muestra fijada utilizando una micropipeta. Después

se deja reposar 5 minutos para obtener la sedimentación celular y tener todos los espermatozoides en el mismo plano focal. Luego se capturan y analizan diferentes campos microscópicos, los espermatozoides se visualizan marcados con una cruz amarilla. A partir del análisis de las imágenes se realizan los recuentos y se elabora el informe correspondiente (ISASv1®).

Diluyentes

Se le denomina diluyentes al conjunto de sustancias que resguardan la viabilidad y fertilidad del semen a la vez que permiten el procesamiento de un número de espermatozoides previamente establecido acondicionado en envases adecuados de tamaño conveniente (Cavestany, 1994).

La dilución del semen se elabora por razones técnicas y biológicas. La monta natural lleva al depósito en la vagina de la hembra de gran cantidad seminal con miles de millones de espermatozoides, y de estos solo 100 a 140 millones atraviesan el cérvix. Al realizar la inseminación artificial se logra reducir el volumen como la cantidad de espermatozoides. El número de espermatozoides en dosis inseminante que se considera una cantidad adecuada para un buen índice de fertilización es de 100 millones de espermatozoides, por lo que se puede inseminar una gran cantidad de hembras con un solo eyaculado (Salamon y col., 1990).

Para realizar inseminación artificial cervical, 0.05-0.20 mL se considera un volumen adecuado. Este volumen contendría una cantidad de espermatozoides superior a la deseada si el semen no se encuentra diluido. Para mantener el volumen apropiado, reduciendo el número de espermatozoides, se utiliza la dilución del semen (Cavestany, 1994).

Los diluyentes brindan a los espermatozoides nutrientes, sistema amortiguador a los cambios de pH, un ambiente isotónico, protegen a los gametos del shock de frío cuando son enfriados y conservados, o cuando son congelados. Estas son las razones biológicas por las cuales se realiza la dilución del semen (Cavestany, 1994).

Componentes básicos de un diluyente

El diluyente debe proporcionar una fuente de energía como fructosa o glucosa, capaces de penetrar al espermatozoide, con el fin de proteger las reservas intracelulares. El mismo requiere de energía para mantener su motilidad y su mantenimiento celular, por eso es de fundamental importancia proporcionársela. Cuando no hay energía la célula oxida fosfolípidos intracelulares, siendo nocivo para la misma. La yema de huevo y la leche tienen en sus componentes glucosa entre otros compuestos que son utilizados por los espermatozoides (Cavestany, 1994).

Los diluyentes deben ser isotónicos con el fin de no causar daños morfológicos o funcionales. Influye no solamente por la presión osmótica de una solución sino el punto al cual el solvente se congela. La concentración osmolar se ve reflejada en la disminución del punto de congelación de una solución. Los espermatozoides se comportan como osmómetros y dependiendo de la tonicidad del medio en que se encuentran son capaces de grandes cambios de tamaño. Por esto, si se desvía

considerablemente la tonicidad del medio, los espermatozoides podrán presentar colas dobladas, nadar en círculos y morir. Los di y trisacáridos, contribuyen a mantener el balance osmótico, ya que no pueden ser metabolizados por los espermatozoides (Cavestany, 1994).

Para enlentecer las reacciones químicas y alargar la vida de las células, la disminución de la temperatura es el principal mecanismo para lograrlo. En el semen, esto se debe a que a temperatura de 37°C los espermatozoides consumen 42 veces más oxígeno que a 5°C. A su vez la solubilidad de los gases en el ambiente externo del espermatozoide aumenta, duplicándose el O₂ y triplicándose el CO₂, permitiendo que se realicen mayor cantidad de actividades metabólicas a través del metabolismo oxidativo. Si se llevara a cabo un enfriamiento del eyaculado sin un medio protector, los espermatozoides sufrirían un shock de frío (Cavestany, 1994).

El medio más eficaz para proteger a los espermatozoides de los efectos del enfriamiento son la yema de huevo (concentraciones del 20% son comunes en la mayoría de los diluyentes) o la leche (entera o descremada), ya que estos contienen lecitina, proteínas, lipoproteínas y compuestos similares. En el caso que no haya, al disminuir la temperatura se ve afectada la membrana plasmática por shock de frío, causando la pérdida de enzimas intracelulares, lipoproteínas, potasio, ATP y otros materiales de la célula, además de disminuir la motilidad y posible doblamiento de las colas. En cambio, si el descenso de temperatura es lento el daño es menos severo permitiendo que la célula se ajuste a la caída de temperatura adaptándose a los cambios internos y externos (Cavestany, 1994).

Es necesaria la implementación de sustancias buffer y no iónicas en el medio para mantener la osmolaridad y el pH, ya que los espermatozoides producen productos ácidos (ácido láctico) derivados de su metabolismo, pudiendo provocarles su autointoxicación. Estas sustancias pueden ser citrato de sodio (dihidrato), TRIS, TES, TEST (TRIS+TES), glutamato monosacárido, diferentes buffers con combinaciones de soluciones salinas o carbohidratos y preparaciones a base de leche. La motilidad y fertilidad se preservan bien en yema de huevo y leche con pH neutro (Cavestany, 1994).

En casos de conservación de semen, el diluyente debe brindar protección contra microorganismos que se pueden establecer en el medio, ya que estos proporcionan un buen ambiente para su desarrollo, produciendo productos que pueden ser dañinos para los espermatozoides y que a su vez pueden infectar a las hembras. Para esto se utiliza antibióticos, como la penicilina a razón de 1000 UI o estreptomycin a 1000 µg (Cavestany, 1994).

Es de fundamental importancia que el diluyente no contenga sustancias que puedan ser dañinas para los espermatozoides, como metales pesados, por esto siempre debe emplearse el agua destilada. Esta actúa como solvente para los componentes seminales y del diluyente (Cavestany, 1994).

Diluyentes naturales

Diluyentes a base de leche: las propiedades de la leche que favorecen al semen como diluyentes son actuar como buffer ante cambios de pH, actuar como agente

quelante y proteger los espermatozoides durante la disminución de la temperatura. Es esto posible debido a que la leche contiene una fracción proteica: la caseína.

Diluyentes sintéticos

Los diluyentes que son más utilizados en el semen de carnero contienen como amortiguador TRIS o citrato; como fuente de energía glucosa o fructosa; y para proteger la membrana espermática del frío la yema de huevo (Maxwell y Salamon, 1993).

Los buffers orgánicos (TRIS) tienen como función principal neutralizar el ácido láctico, producto del metabolismo de los espermatozoides. Además, atraviesan la membrana y ayudan con el equilibrio interno (Maxwell y Salamon, 1993). Estos tienen una capacidad de amortiguar los rangos de tolerancia de los espermatozoides (pH 6,5-7,5) superior a los buffers inorgánicos (citrato) (Aisen, 2004). El TRIS fue comparado con la leche y el citrato, demostrando ser superior que éstos (Paulenz y col., 2002).

Diluyentes en base a TRIS (hidroxymetyl amino metano): 10 a 50 Mm presentan bajo o nulo efecto sobre la motilidad y metabolismo del espermatozoide, pero cantidades superiores fueron reportadas como positivas para el almacenaje (Maxwell y Salamon, 1993; Salamon y Maxwell, 2000). Se recomienda en el diluyente en base a TRIS el agregado de ácido cítrico (como antioxidante), fructosa como fuente de energía, yema de huevo como protector ante shock térmico, agua destilada y antibióticos contra microorganismos (Salamon y Maxwell, 1990)

Congelación del semen

Luego de colectar el semen, se le agrega un diluyente precalentado a Baño María a 30-32°C. Existen dos métodos para la congelación del semen, el primer método o método de un paso se le agrega todo el diluyente a 30°C, y cuando el semen alcanza 4 – 6°C se congela. El segundo método o método de dos pasos se agrega una parte del diluyente a 30°C y el resto a 5°C. Una vez agregado el diluyente se realizan periodos de equilibramiento que duran entre 90 y 120 minutos, ya que una velocidad de enfriamiento adecuada debe tener entre 0,15 y 0,25°C por minuto (Fernández Abella, 2015).

Para que una célula alcance el estado de congelación existen dos etapas, la primera es cuando se pasa de la temperatura corporal a temperaturas ligeramente superiores a su congelación. La segunda es cuando se alcanzan temperaturas menores a 0°C. Al comienzo el agua intracelular pasa de un estado líquido a un gel tipo viscoso, lo que se denomina cambio de fase. El mismo interrumpiría la actividad enzimática y el metabolismo, pudiendo provocarse daños reversibles o no. En semen puro este proceso de alteración se inicia de 12 a 13°C, en semen diluido entre 20-25°C (Alberio, 1979).

La formación de hielo intracelular y la deshidratación celular son los dos fenómenos que se producen a 0°C. El primero origina problemas mecánicos, provocando que se expanda el contenido celular dañando estructuras celulares y ocasionando la muerte del espermatozoide. El segundo, producido por la congelación del medio extracelular, ocasiona diferencia de presión y así la salida del agua celular causando

un aumento de electrolitos con descenso de pH, contribuyendo a la precipitación de las proteínas celulares. El desdoblamiento de los puentes disulfuros es una consecuencia de la desnaturalización de las proteínas protoplasmáticas, que al descongelarse el semen son destruidos (Fernández Abella, 2015).

Es de gran importancia la velocidad de enfriamiento en la congelación y descongelación del semen en cuanto a la magnitud de los daños. Al realizar la congelación lenta, el período de acción de las altas concentraciones de sales intracelulares es mayor, favoreciendo la deshidratación. Por otro lado, al ser muy rápida la congelación, lleva a la pérdida de permeabilidad de la membrana celular en breve lapso, aumentando la cristalización intracelular (Alberio, 1979; Gil, 2003).

En búsqueda de reducir las pérdidas que se producen en éste proceso, se utiliza el glicerol como sustancia crioprotectora para disminuir los daños. El mismo actúa uniéndose a la molécula de agua, provocando un descenso del punto de congelación y aumentando la viscosidad. Como resultado de esto se retarda la formación de hielo intracelular producida por la pérdida de permeabilidad celular en congelación muy rápida, la rápida concentración de soluto intracelular, favoreciendo la deshidratación, producida en congelaciones muy lentas (Fernández Abella, 2015).

Existen diferentes formas de empaque de semen congelado, ellas son en pastillas o en pajuelas. Las ventajas que presenta la congelación en pajuelas son varias, tales como ser más homogéneas y proveen mayor superficie de contacto con el frío, presentan mayor higiene y facilitan identificación. Por otro lado, las ventajas que presentan las pastillas son menores costos por dosis congelada para su conservación y menor consumo de nitrógeno líquido por unidad (Fernández Abella, 2015).

Descongelación

Para descongelar el semen en pajuelas se debe colocarlo a baño María a 35 -37°C (temperatura similar a la testicular). Dependiendo del tipo de pajuela utilizada se las sumergen 35 – 40 segundos o 60 segundos las pajuelas de 0.25mL y las de 0.50 mL respectivamente. Luego se extraen del baño y se secan con papel higiénico. La punta sellada (alcohol polivinílico) es cortada y se coloca en el inyector a pistón bovinos o en el aplicador de semen ovino transcap, previa introducción en las vainas correspondientes (Fernández Abella, 2015).

Evaluación del semen post descongelado

La calidad seminal posterior al descongelamiento de las pajuelas es de suma importancia. Es necesario el examen de una por partida, realizando varias observaciones de la misma (Gibbons y col., 1993). El semen se puede evaluar en forma manual o a través de un equipo automatizado (CASA), previamente descritos en evaluación del semen.

Métodos de Inseminación Artificial

Hay tres métodos para realizar I.A.

a) *Método vaginal o “a ciegas”:*

Se deposita el semen en la cavidad vaginal, necesitando gran cantidad de esperma. Con este método se desvirtúa uno de los principales objetivos de la I.A., el uso eficiente del esperma eyaculado.

Es utilizado cuando no se puede introducir la cánula en el cérvix, aumentando la dosis para obtener una mayor probabilidad de fecundación (Fernández Abella, 2015).

b) Método cervical:

Depende de donde se deposita el semen se denomina cervical profunda (segmento más próximo al útero) o cervical superficial (segmento más próximo a la vagina).

Cuanto más adulta es la oveja más aumenta la complejidad de su cérvix, por pliegues que se forman en la membrana de la mucosa de la pared vaginal. Esto hace más dificultoso ubicar el orificio del cuello del útero.

La técnica del método cervical consiste en la introducción del vaginoscopio con la mano localizando el cuello del útero, con la otra mano se introduce dentro del vaginoscopio la pistola dosificadora. El vaginoscopio también cumple la función de retirar el mucus cervical, no debe retirarse la totalidad ya que este facilita el transporte espermático.

Una vez localizado el orificio se introduce la cánula hasta hacer tope, antes de depositar el semen se retira la cánula unos milímetros para hacer más fácil la salida del esperma.

Se debe prestar especial atención en el momento del depósito del semen, asegurándose que el mismo no fluya hacia la vagina. Esto se logra retirando el vaginoscopio unos centímetros logrando el plegamiento vaginal. Es una maniobra muy importante, al ser olvidada puede causar grandes pérdidas en el volumen de la dosis.

Luego de depositada la dosis de semen la pistola y el vaginoscopio son retiradas simultáneamente, de esta forma evitamos el riesgo de que la cánula sufra una posible ruptura por una patada de la oveja (Fernández Abella, 2015).

Para llevar a cabo esta técnica, se debe colocar a la oveja sobre una baranda, montando sus cuartos traseros, presentándolas inclinadas cabezas abajo. Luego de que se descarga el semen se recomienda dejar a la oveja en la posición de inseminación durante 2 o 3 minutos (Gibbons y Cueto, 1995).

Al utilizar semen fresco la dosis no debe ser menor a 60 millones para no perder fertilidad. El volumen de la dosis no debe ser mayor a 0.06cc (6 rulos). Cuando el semen es conservado se divide la dosis en dos o tres pistolazos (mayor a 60 microlitros). Con semen congelado por vía cervical se debe utilizar dosis superiores a los 120 millones (Fernández Abella, 2015).

c) Método intrauterino:

Se distinguen tres técnicas: Quirúrgica (por laparotomía), intracervical, por endoscopia. En los primeros dos se obtienen altos porcentajes de concepción, así como también grandes pérdidas por muerte embrionaria, determinando bajos porcentajes de parición (Fernández Abella, 2015).

Investigadores australianos crearon a comienzos de la década del 80 una técnica de inseminación intrauterina por laparoscopia, que al descongelar el semen se lo deposita directamente en la luz de los cuernos uterinos, dando porcentajes de preñez superiores al 50% (Gibbons y Cueto, 1995).

El costo del equipo y la especialización del inseminador son las desventajas de éste método. El mismo permite utilizar menor cantidad de espermatozoides (Fernández Abella, 2003).

El número de espermatozoides totales por dosis inseminante varía entre 50 y 100 millones, obteniéndose tasas de preñez del 10 a 75% (Fernández Abella, 2015).

El semen es introducido en el cuerpo del útero para mantener la capacidad fertilizadora por 28-35 horas y utilizar menor cantidad de espermatozoides (Fernández Abella, 2015).

Características estacionales del clima en Uruguay

La estación reproductiva de la oveja inicia a fines de primavera y finaliza con el otoño existiendo una variación según la raza. Las razas de origen británico son muy estacionales sexualmente. Por otro lado, la raza Merino, proveniente de España, posee una estacionalidad menor y un período sexual más extendido (Buratovich, 2010). En nuestro país, la estación de cría en la raza Merino comienza a fines de noviembre y se extiende hasta junio del año siguiente (Fernández Abella y col., 1994).

Durante estos meses en Uruguay se encuentran las estaciones primavera, verano y otoño.

La primavera en Uruguay se da en los meses setiembre, octubre y noviembre. Las temperaturas medias registradas en el año 2012 y 2013 fueron 18.4°C y 17.6°C, respectivamente. A lo largo de la historia, se registraron entre 1961 y 1990 temperaturas medias de 16.9°C. Las máximas medias son del orden de 22.4°C y las mínimas medias de 11.4°C. Las temperaturas extremas durante este período registradas desde 1971 a 2013 fueron la máxima de 41.5°C en Rivera el 16 de noviembre de 1985, mientras que la mínima absoluta se registró en Mercedes el 2 de setiembre de 1966 con -5.6°C (INUMET).

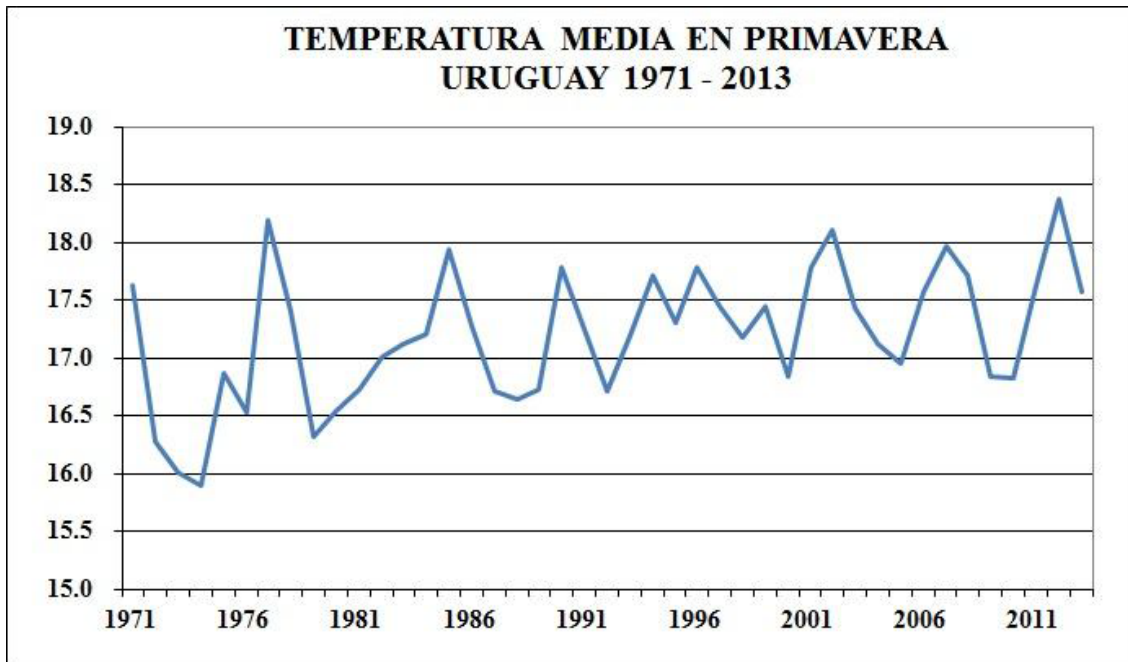


Figura 2. Temperatura media en primavera en Uruguay, 1971-2013.

Fuente: <http://www.meteorologia.com.uy/ServCli/estadisticasClimatologicas>

Se considera a verano los meses de diciembre, enero y febrero. Las temperaturas medias registradas en 2010 fueron de 24°C y en 2013 de 23.1°C. Entre los años 1971 y 2000 las medias fueron de 23.1°C. Las máximas medias oscilan entre 29.0°C con una distribución descendente en sentido norte-sur. Las temperaturas mínimas medias en la estación verano que se han registrado son de 17°C. Los valores extremos de temperatura corresponden a toda la información disponible entre 1971 y 2013 inclusive. Se han tomado valores extremos, siendo en Salto de 42.2°C el 15 de enero de 1986, y la temperatura mínima registrada en verano fue en Melo el día 9 de enero de 1965 con 1°C (INUMET).

TEMPERATURA MEDIA EN VERANO URUGUAY 1971 - 2013

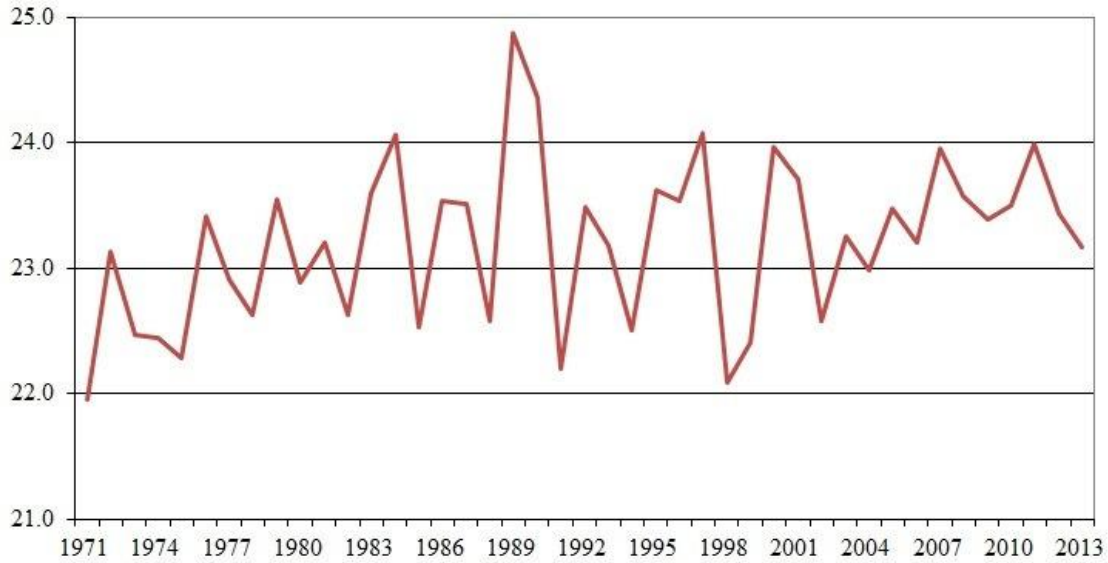


Figura 3. Temperatura media en verano en Uruguay, 1971-2013.

Fuente: <http://www.meteorologia.com.uy/ServCli/estadisticasClimatologicas>

En cuanto al otoño, época considerada desde marzo hasta mayo, presentó una temperatura media de 18.6°C en el año 2013 y de 17.2 en el año 2014. Según registros entre los años 1961-1990, las temperaturas medias fueron de 17.7°C, descendiendo 5°C respecto al valor medio del verano. Las máximas medias registradas son de 23.1°C. Las mínimas medias son del orden de 12.3°C. En otoño la temperatura máxima absoluta que se registró hasta el año 2013 inclusive, fue de 40.8°C en Artigas el 8 de marzo de 1952. La mínima absoluta se registró en Melo el 28 de mayo de 1971 con -5.9°C (INUMET).

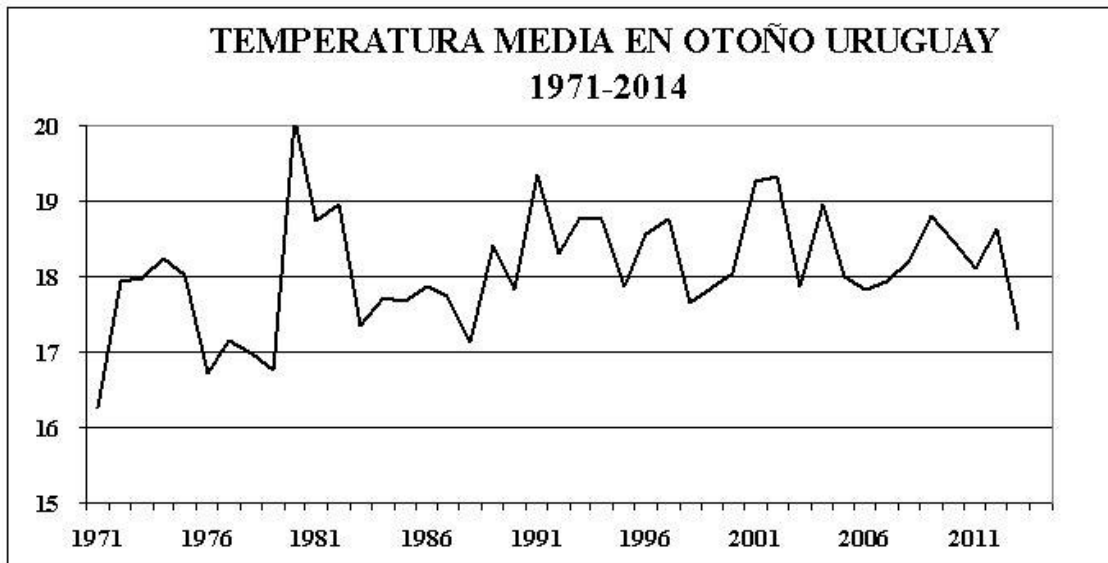


Figura 4. Temperatura media en otoño en Uruguay, 1971-2014.

Fuente: <http://www.meteorologia.com.uy/ServCli/estadisticasClimatologicas>

El invierno abarca los meses de Junio, Julio y Agosto. Desde el año 1971 hasta el año 2014 se han registrado temperaturas medias del orden de los 12.0° C, representando una disminución de casi 6° C respecto al valor medio estacional del otoño. Las mismas oscilan entre los 13.6° C (Artigas) y 11.0° C (Carrasco). Las temperaturas máximas medias son del orden de 16.9° C con una distribución descendente en sentido norte - sur. Oscilando entre un valor superior de 19.2° C en Artigas y presentando su valor mínimo en Colonia con 15.2° C. Las temperaturas mínimas medias son del orden de 7.3° C, presentando su mayor valor en Colonia con 8.6° C y su valor mínimo en Mercedes con 6.0° C (INUMET).

TEMPERATURA MEDIA EN INVIERNO URUGUAY 1971-2014

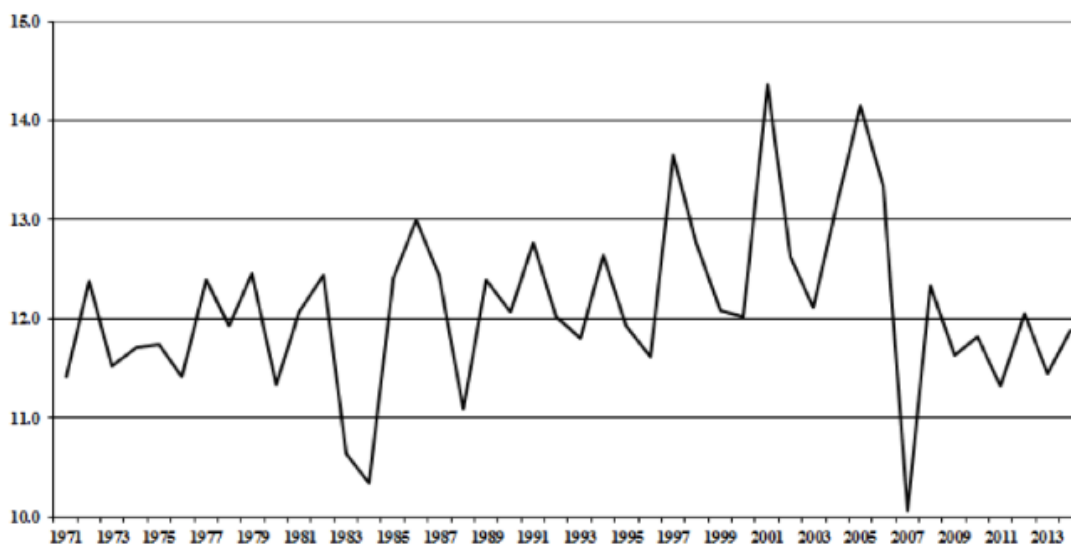


Figura 5. Temperatura media en invierno en Uruguay, 1971-2014.

Fuente: <http://www.meteorologia.com.uy/ServCli/estadisticasClimatologicas>

Tabla 5. Registros climáticos de la Estación Experimental de Facultad de Agronomía de la ciudad de Salto en el año 2015.

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Media	17,5	24,5	20,3	14,6
Máxima	24	30	27,1	20
Mínima	12,3	18,8	13,5	9,3

(Comunicación personal Ing. Agr. Celmira Saravia, estación meteorológica de Estación Experimental San Antonio Facultad de Agronomía, Salto. 08/09/2016)

HIPÓTESIS:

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

OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar el impacto de la temperatura de empaquetado en pajuelas sobre la calidad del semen ovino, en carneros Merino Australiano, previo al período de equilibramiento en el proceso de congelamiento.

Objetivos Específicos:

- Evaluar el impacto de tres temperaturas ambiente: 35°C, 20°C y 4°C, durante el empaquetado de semen ovino de carneros Merino Australiano en pajuelas, previo al período de equilibramiento.
- Determinar si existen diferencias significativas en la calidad del semen ovino, resultante de las tres temperaturas testeadas, utilizando como indicadores variables de motilidad (tipo de movimiento, velocidad de movimiento, velocidades de los espermatozoides) pos descongelamiento y analizados en equipo CASA.
- Evaluar si hay variaciones en la calidad del semen pos descongelamiento a tiempos fijos (1, 3, 5, 7 y 9 minutos), a través de las variables de la motilidad descritas en el objetivo anterior y determinadas en equipo CASA.

MATERIALES Y METODOS

Localización del ensayo:

El ensayo se llevó a cabo en el mes de abril del año 2016 en la Estación Experimentas de Facultad de Agronomía de Salto, ubicado sobre ruta N° 31 a 21,5 Km de la ciudad de Salto, paraje San Antonio. Latitud: 31° 23´ S; Longitud: 57° 57´ W.

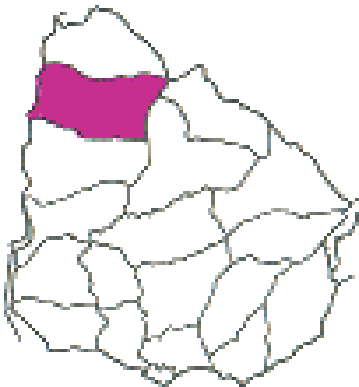


Figura 6. Ubicación geográfica de Salto

Fuente: <http://www.raicesuruguay.com/raices/departamentos.html>



Figura 7. Ubicación geográfica EEFAS en departamento de Salto.

Fuente: Google Earth.



Figura 8. Disposición geográfica del establecimiento de estudio

Fuente: Google Earth.

El predio cuenta con una carga animal de 0,8 U.G. La misma está comprendida por 400 bovinos de las razas Hereford y Holando, y 300 ovinos de la raza Merino.

Ensayo de campo:

De un grupo de 30 carneros que por el examen de aptitud reproductiva eran aptos y homogéneos (Fernández Abella, 2015), se seleccionaron 3, estos animales pastoreaban campo natural en un mismo potrero.

Se realizó extracción de semen mediante electroeyaculador modelo Electrojac 5, utilizándolo de acuerdo a las instrucciones del fabricante, aplicándoles a todos los animales la misma cantidad de ciclos, en forma automática. Los operadores fueron profesionales entrenados en dicha técnica.

En modo automático, el circuito produce una serie de 32 ciclos, y cada ciclo brinda una intensidad ligeramente superior. Cada ciclo dura 2 segundos, con una pausa de 2 segundos. Diseñado para pasar por los 32 ciclos a menos que sea interrumpido por el interruptor de encendido/apagado o el interruptor de intervalo.

Las muestras se mantuvieron en un baño termostático a 32°C durante la evaluación de la calidad seminal.

Se realizó análisis macroscópico: evaluando volumen, color, olor y motilidad masal.

Posteriormente se realizó análisis microscópico: evaluando concentración y motilidad.

Con las muestras de semen obtenidas de cada uno de los carneros se realizó un pool con el objetivo de eliminar factor individual (Paulenz y col., 2002).

Dilución de semen

Diluyente:

- 3 partes de agua destilada
- 1 parte de Triladyl® (trimetilaminometano, antibiótico y glicerol)
- 1 parte de yema de huevo

El pool de semen se diluyó al tercio utilizando dicho diluyente, se determinó la concentración en el mismo y se procedió a realizar la dilución final tal que se obtuvieran 60 millones /pajuela.

El pool en su dilución final fue dividido en 3 partes iguales, cada una de ellas se empaquetó en 50 pajuelas de 0,25 mL en una de las condiciones seleccionadas de la siguiente forma:

- Pajuelas color amarillo a 35°C (calefacción a gas)
- Pajuelas color rojo a 20°C (aire acondicionado)
- Pajuelas color verde a 4°C (cámara de frío)

Las pajuelas se mantuvieron horizontales 15 minutos a la temperatura correspondiente según el grupo antes indicado.

Pasado este período todas las pajuelas fueron llevadas a cámara de frío a 4°C durante 2 horas (tiempo de equilibrio). Una vez cumplido este lapso de tiempo se procedió a la congelación (Fernández Abella, 2015).

Manipulación y análisis del semen

El semen congelado se almacenó en tanques de nitrógeno líquido, se procedió luego a su evaluación en el Laboratorio del PDU de Rumiantes, RN Salto.

Se evaluó en cada pajuela motilidad y concentración respetando este orden. El protocolo de descongelación fue realizado según Fernández Abella (2015).

Para el análisis de motilidad se utilizó un equipo CASA, se realizó dilución 1:10 con suero fisiológico previamente termostatzado a 37°C, para luego proceder según manual ISASv1 del CASA. Las variables analizadas fueron concentración (millones spz/ mL), tipo de movimiento (estático, progresivo y no progresivo), velocidad de movimiento (estáticos, lentos, medios y rápidos) y diferentes variables de velocidad de los espermatozoides lentos, medios y rápidos (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB).

Para el análisis de concentración las muestras fueron diluidas 1:10 en solución de fijación de semen conteniendo 50g de NaHCO₃, 10 mL de formol al 35% (v/v) y agua destilada cantidad suficiente para un volumen de 1000 mL. Luego se procedió según manual ISASv1® del CASA, utilizando cámara de Makler.

En cada análisis de las muestras procesadas se realizaron 6 capturas al azar, analizando siempre un número superior a 200 células, y manteniendo una diferencia

igual o inferior a 10% entre los campos analizados siguiendo las instrucciones del manual ISASv1®.

Para la evaluación de motilidad vs tiempo pos descongelamiento, se procedió a analizar la motilidad del semen en 3 pajuelas de cada grupo. Se mantuvo el semen a baño maría a 37°C, evaluando las muestras al minuto 1, 3, 5, 7, y 9, realizando dilución 1:10 con suero fisiológico, también mantenido a baño maría a la misma temperatura.

Análisis estadístico:

Las variables analizadas fueron sobre concentración (millones spz/ mL), tipo de movimiento (estático, progresivo y no progresivo), velocidad de movimiento (estáticos, lentos, medios y rápidos) y diferentes velocidades y variables de velocidad de los espermatozoides (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB) inmediatamente a descongelar y a tiempos fijos (1, 3, 5, 7 y 9 minutos). Fueron realizados intervalos de confianza del 95 y 90% para la media de concentración y los diferentes parámetros estudiados.

Se compararon 3 tratamientos de temperatura de empaquetado: 4°C, 20°C y 35°C en el análisis inmediato pos descongelamiento de semen. Además, se estudió la interacción entre tratamientos y tiempo post descongelado.

Se realizaron comparaciones de medias entre los tratamientos por el método de Tukey con un nivel de significación del 5% y 10% para discriminar el efecto de los tratamientos. Además, se realizaron contrastes de tendencia aplicando modelo lineal y cuadrático en el caso de los parámetros de velocidad. En aquellos casos donde el contraste de tendencias dio un valor significativo en modelo cuadrático se calculó el valor máximo.

RESULTADOS

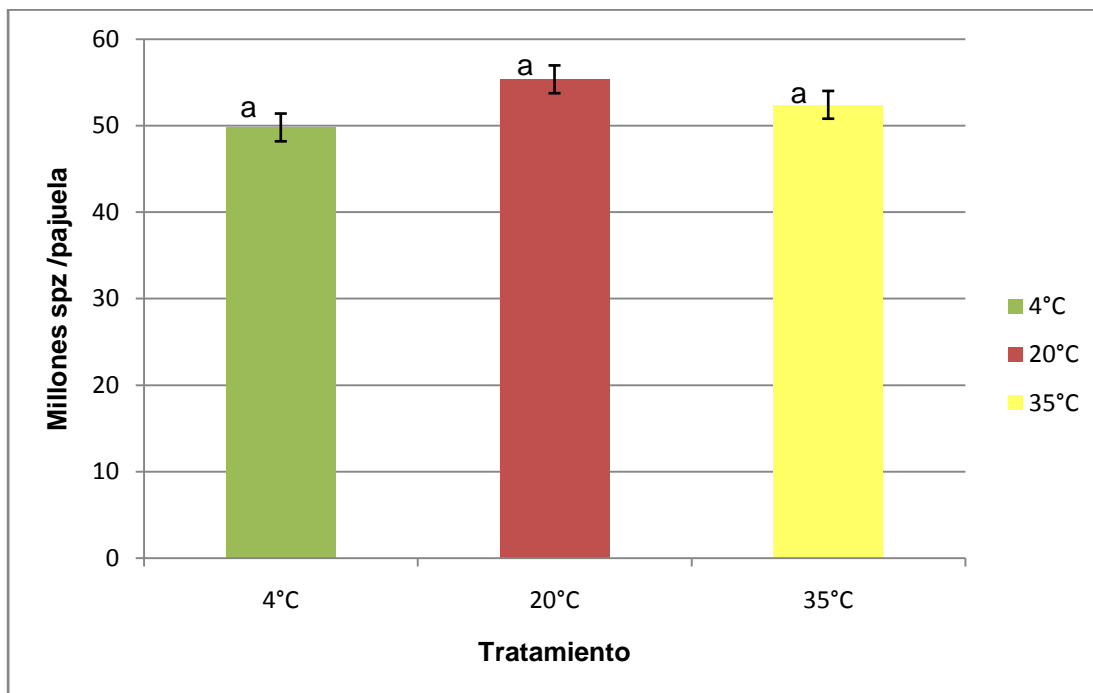
Concentración

Se determinó la concentración de espermatozoides (millones spz/mL) en 6 pajuelas de cada tratamiento, eligiéndolas al azar, utilizando equipo automatizado de análisis de semen como se describió previamente. Además, se calculó la cantidad en millones de spz/pajuela, determinando la media y el desvío estándar en cada grupo. No se observaron diferencias significativas intra o intertratamiento ($p>0.05$).

Tabla 6. Media y desvío estándar de la concentración de spz por tratamiento

Tratamiento	Millones de spz/pajuela		
	Media	Desvío estándar	
4°C	50	5	a
20°C	55	8	a
35°C	52	4	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$)



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$)

Figura 9. Millones de spz/pajuela en los diferentes tratamientos (4°C, 20°C y 35°C).

Motilidad

Se analizaron tres grupos de espermatozoides (spz) según el movimiento que presentaban: progresivos, no progresivos y sin movimiento o estáticos. A su vez se analizaron los spz según la velocidad del movimiento, de acuerdo a esto se los clasificó en lentos, medios y rápidos. Se utilizaron diferentes intervalos de confianza, 95% ($p<0.05$) o 90% ($p<0.10$) en el análisis estadístico de los datos.

Análisis del tipo de movimiento de espermatozoides

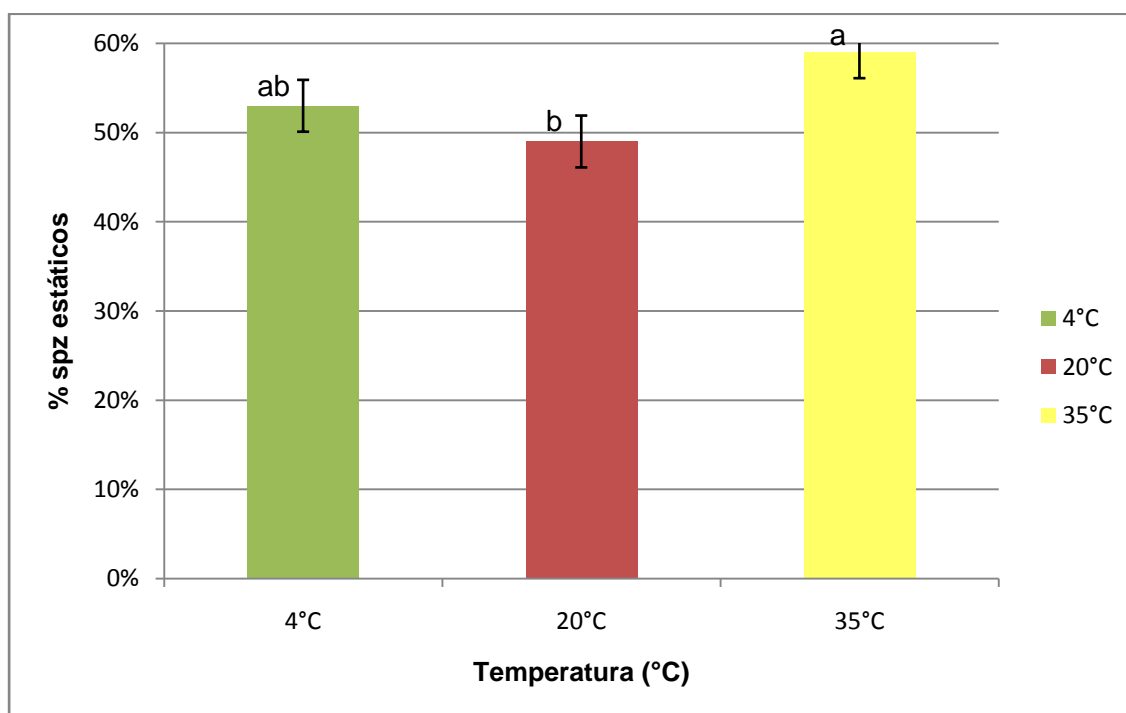
Espermatozoides estáticos

En el grupo de los espermatozoides estáticos se observó diferencia significativa entre los tratamientos de 20°C y 35°C siendo el último el que presentó el mayor porcentaje de estáticos ($p=0.018$).

Tabla 7. Porcentaje de spz estáticos.

Pajuelas	Media	
4°C	53%	ab
20°C	49%	b
35°C	59%	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$)



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$)

Figura 10. Porcentaje de spz estáticos según temperatura de empaquetado.

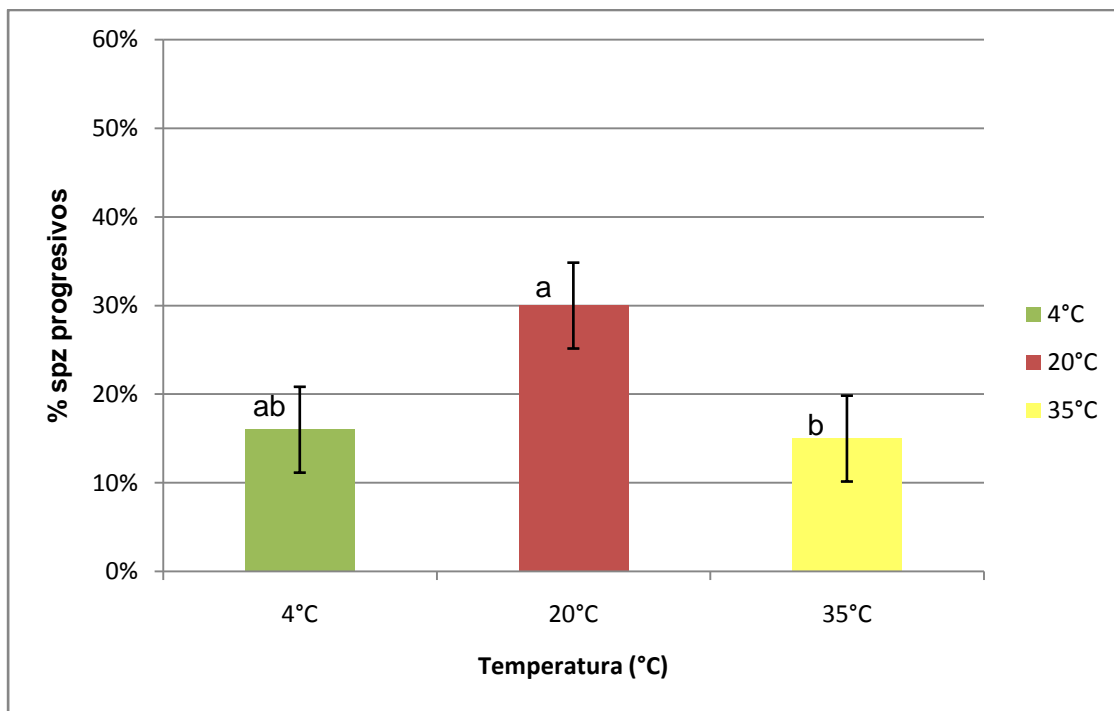
Espermatozoides progresivos

El porcentaje de espermatozoides progresivos fue significativamente mayor en las pajuelas tratadas a 20°C ($p=0.034$) frente a las del tratamiento a 35°C. El porcentaje de espermatozoides progresivos en las pajuelas tratadas a 4°C no presentó diferencia significativa con ninguno de los otros grupos ($p>0.05$).

Tabla 8. Porcentaje de spz progresivos.

Pajuelas	Media	
4°C	16%	ab
20°C	30%	a
35°C	15%	b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

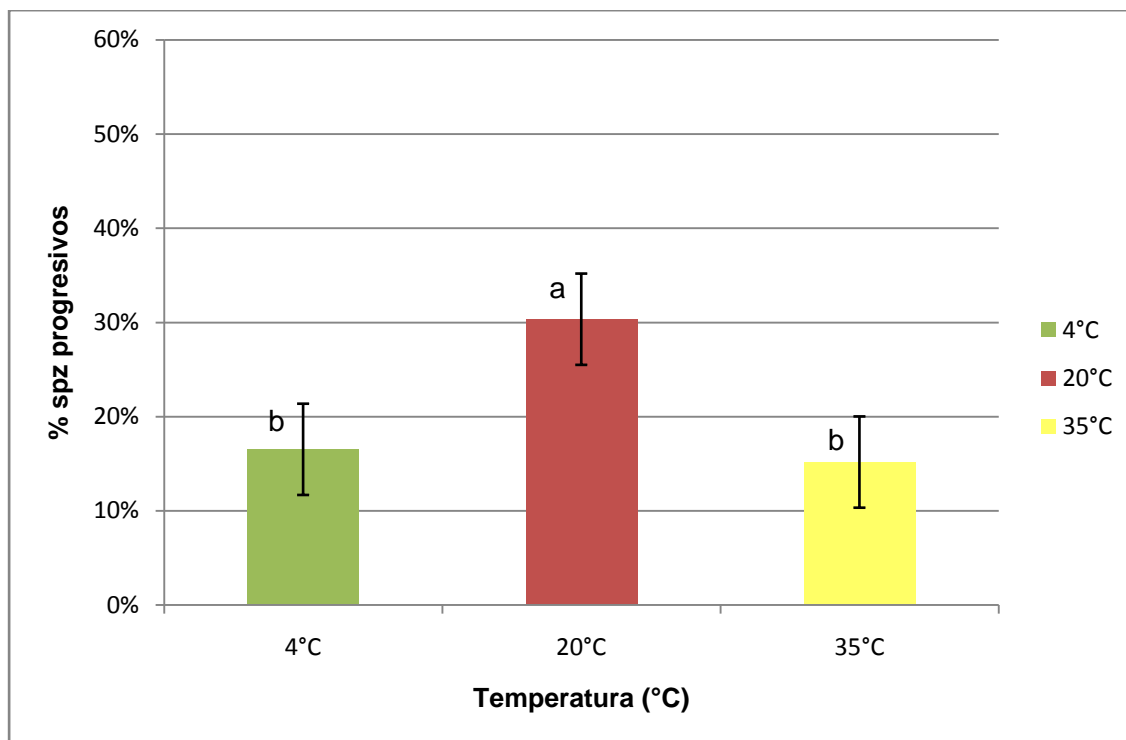
Figura 11. Porcentaje de spz progresivos según temperatura de empaquetado.

Si se considera un intervalo de confianza de 90%, el porcentaje de espermatozoides progresivos empaquetados a 20°C, es significativamente mayor al de los otros dos tratamientos ($p < 0.10$).

Tabla 9. Porcentaje de spz progresivos.

Pajuelas	Media	
4°C	16%	b
20°C	30%	a
35°C	15%	b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.10$)



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.10$)

Figura 12. Porcentaje de spz progresivos según temperatura de empaquetado.

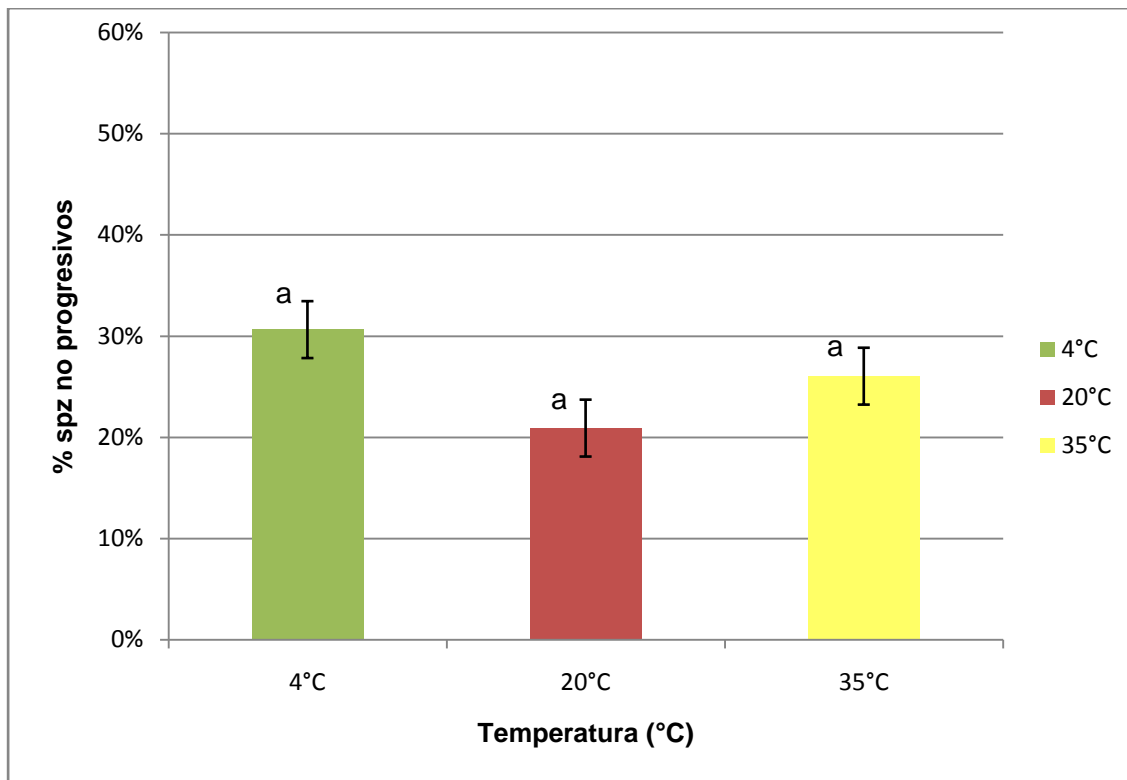
Espermatozoides no progresivos

El porcentaje de espermatozoides no progresivos no mostró diferencias significativas ($p > 0.10$) entre los tres tratamientos.

Tabla 10. Porcentaje de spz no progresivos.

Pajuelas	Media	
4°C	30%	a
20°C	21%	a
35°C	26%	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.10$)



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.10$)

Figura 13. Porcentaje de spz no progresivos según temperatura de empaquetado.

Análisis de la velocidad de movimiento de los espermatozoides

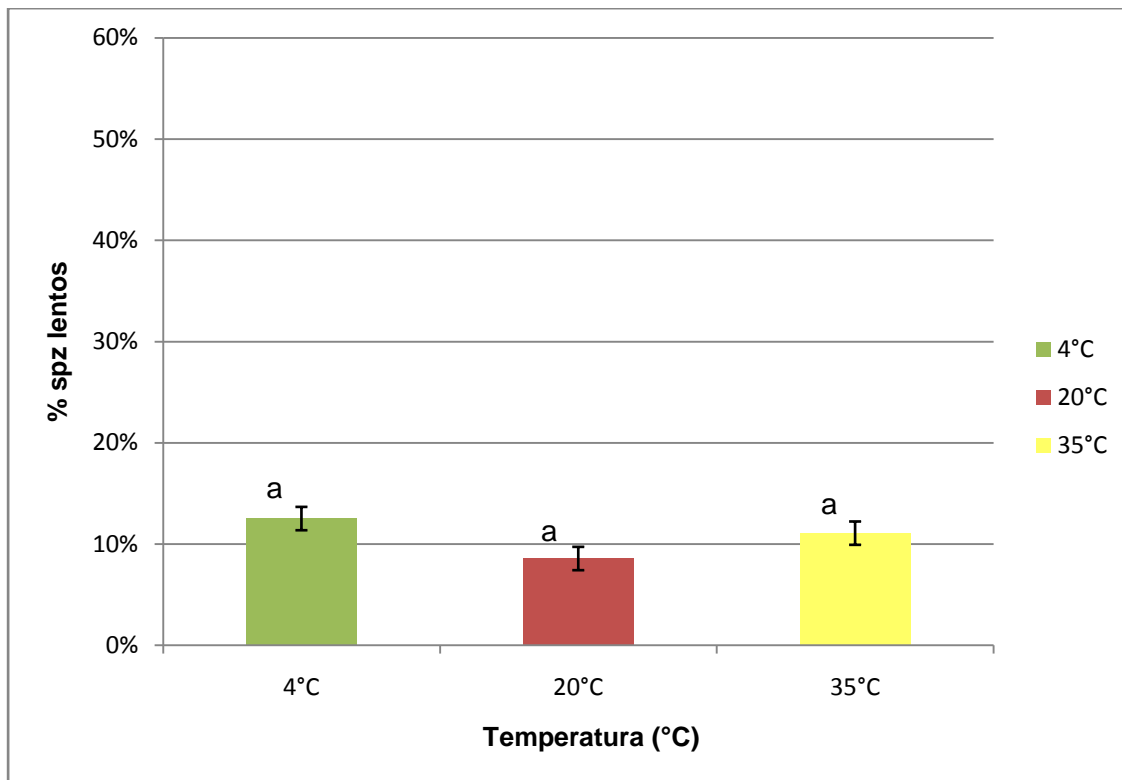
Espermatozoides lentos

El porcentaje de espermatozoides lentos utilizando un intervalo de confianza de 90%, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos tratados a diferentes temperaturas ($p > 0.10$).

Tabla 11. Porcentaje de spz lentos.

Pajuelas	Media	
4°C	13%	a
20°C	9%	a
35°C	11%	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.10$)



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.10$)

Figura 14. Porcentaje de spz lentos según temperatura de empaquetado.

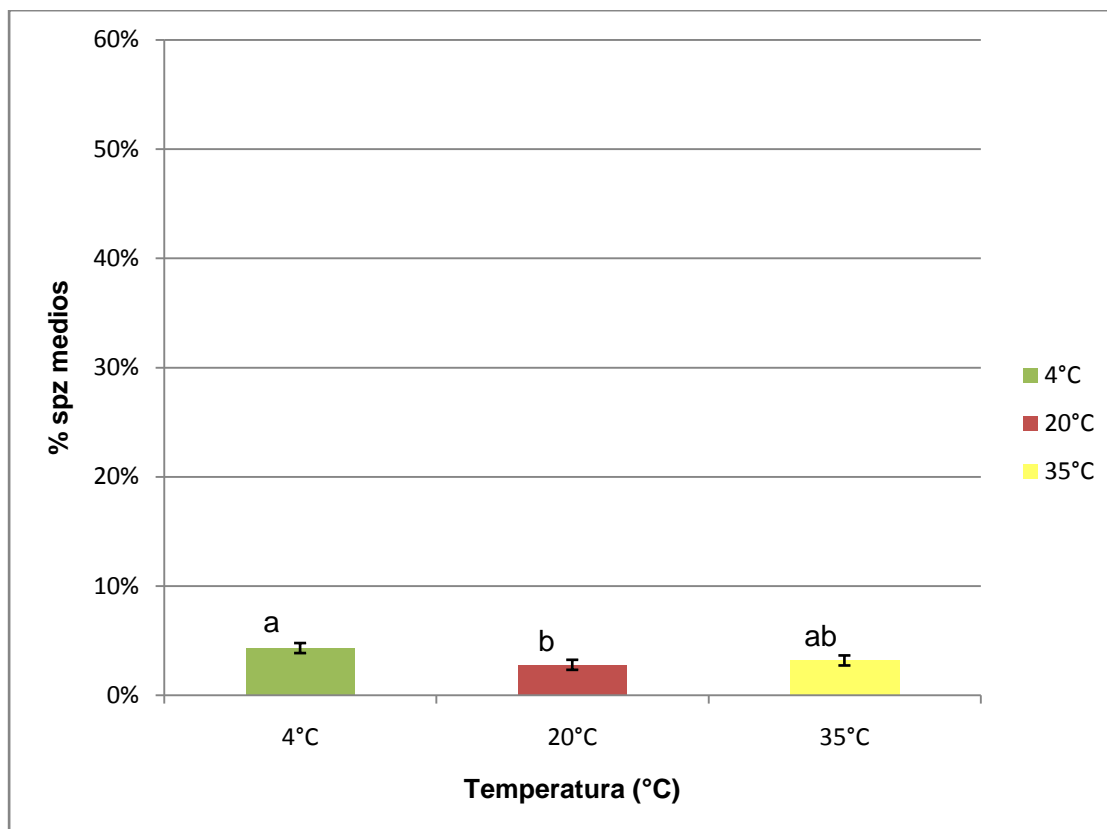
Espermatozoides medios

En el caso de los espermatozoides con velocidad media se observó un mayor porcentaje en las pajuelas empaquetadas a 4°C, siendo menor en las pajuelas de 20°C ($p = 0.084$), esta diferencia se observa utilizando un intervalo de confianza de 90%.

Tabla 12. Porcentaje de spz medios.

Pajuelas	Media	Significance
4°C	4%	a
20°C	2%	b
35°C	3%	ab

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.10$)



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.10$)

Figura 15. Porcentaje de spz medios según temperatura de empaquetado.

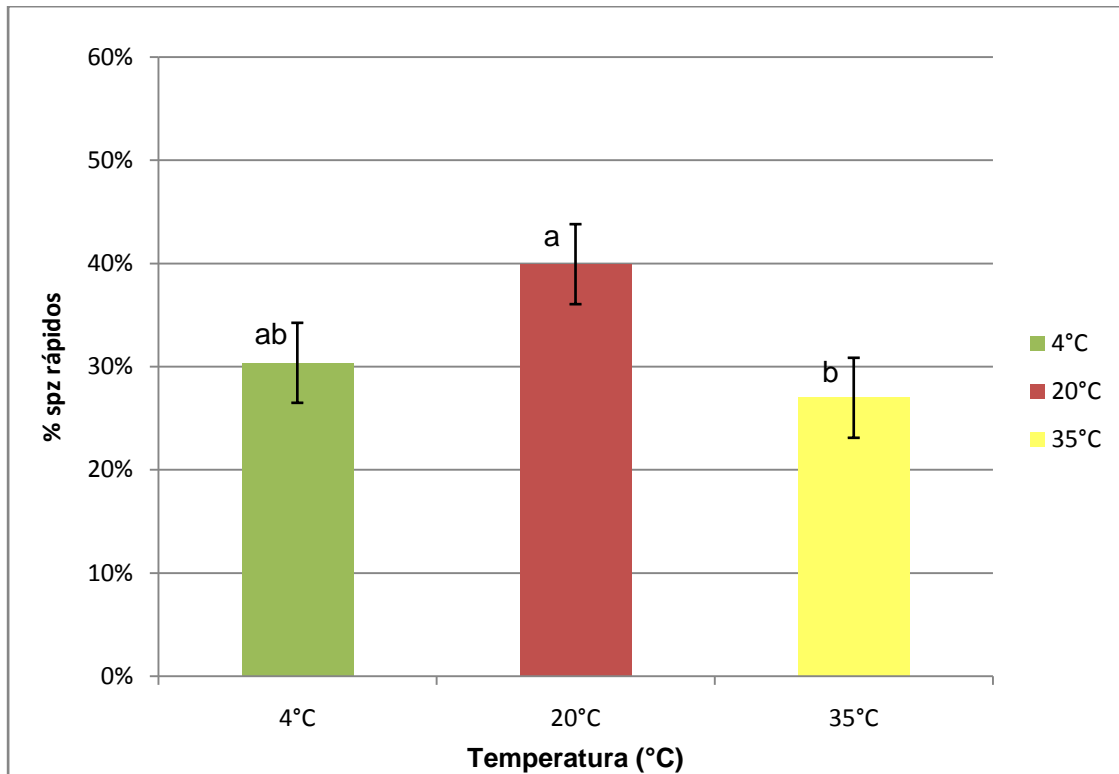
Espermatozoides rápidos

El porcentaje de espermatozoides rápidos, utilizando un intervalo de confianza del 90%, en las pajuelas tratadas a 20°C fue significativamente superior a las tratadas a 35°C ($p=0.058$), no existiendo diferencia con las tratadas a 4°C.

Tabla 13. Porcentaje de spz rápidos.

Pajuelas	Media	Significación
4°C	30%	ab
20°C	40%	a
35°C	27%	b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.10$)



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.10$)

Figura 16. Porcentaje spz rápidos según temperatura de empaquetado.

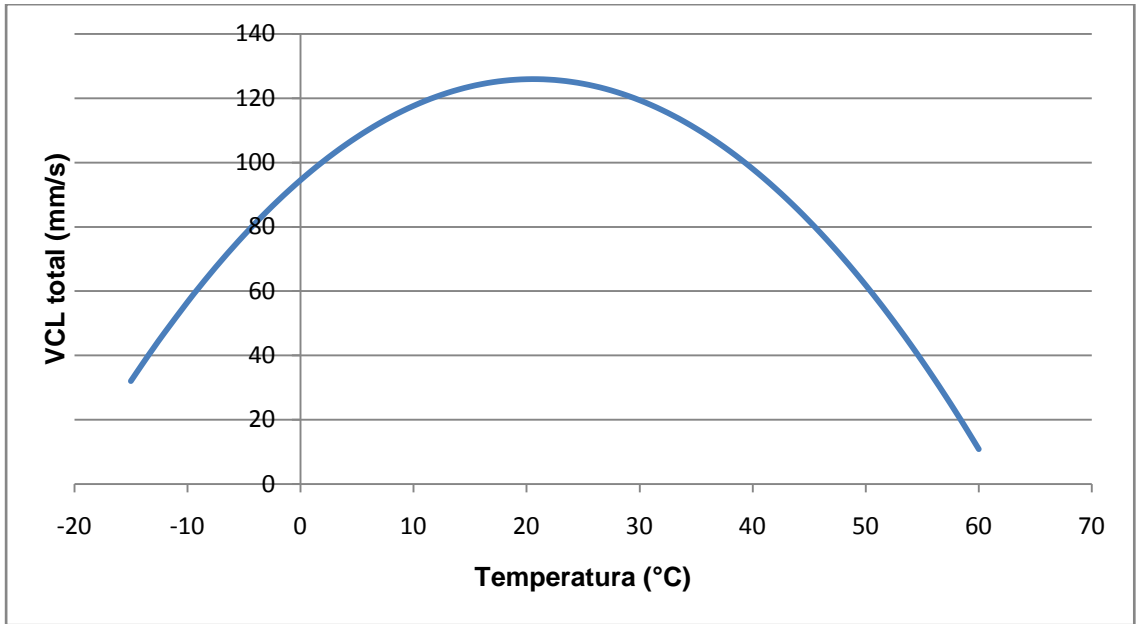
Análisis de los parámetros de velocidad

Estos parámetros son: Velocidad curvilínea (VCL), Velocidad rectilínea (VSL), Velocidad media (VAP), Índice de linealidad (LIN), Índice de rectitud (STR), Índice de oscilación (WOB).

Velocidad curvilínea (VCL)

VCL total de los espermatozoides (sumatoria de lentos, medios y rápidos), en la comparación de medias no se vieron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$).

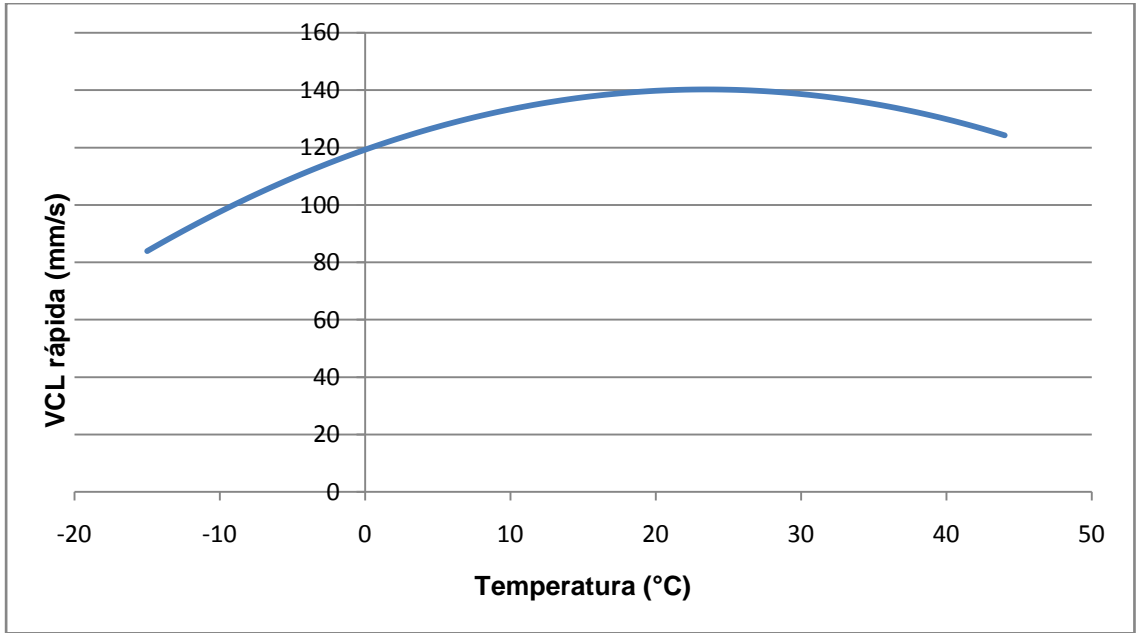
Sin embargo cuando se realizó El análisis de contraste de tendencias, el valor obtenido fue significativo para el modelo cuadrático ($p = 0.028$) con un máximo a 20.6 °C.



p<0.05

Figura 17. Tendencia cuadrática de la VCL total de los spz de pajuelas tratadas a 4°C, 20°C y 35°C.

En cuanto a la VCL rápida de los espermatozoides en la comparación de medias no se vieron diferencias significativas entre tratamientos ($p>0.05$). El análisis de contraste de tendencias fue significativo para el modelo cuadrático ($p=0.034$) con un máximo a 23.5°C.



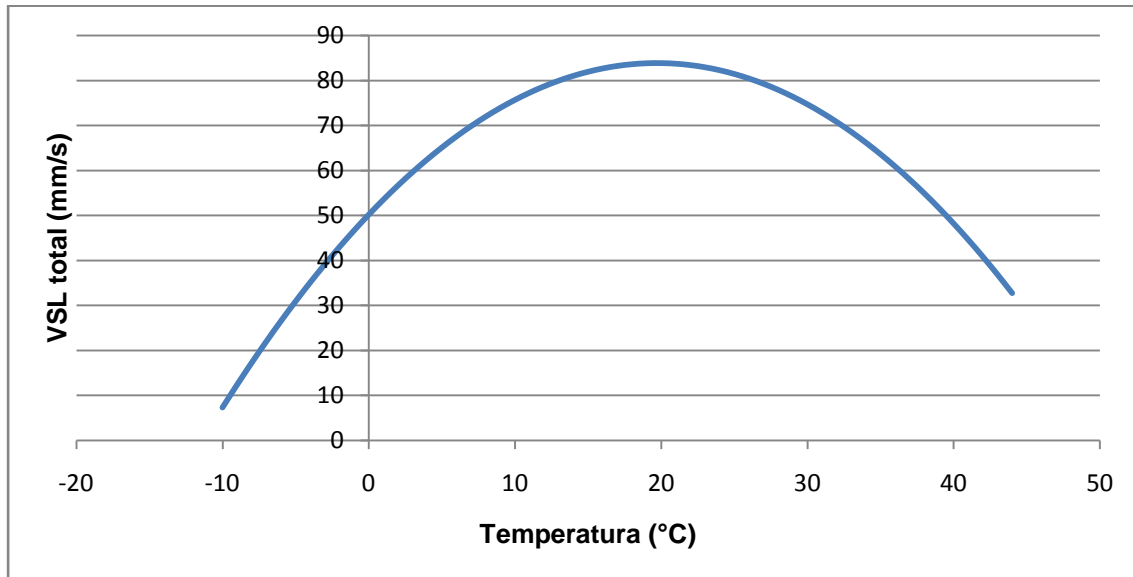
p<0.05

Figura 18. Tendencia cuadrática de la VCL rápida de los spz de pajuelas tratadas a 4°C, 20°C y 35°C.

La VCL de los espermatozoides lentos y medios de las pajuelas de los tres tratamientos, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la comparación de medias ni en el análisis de contraste de tendencias.

Velocidad rectilínea (VSL)

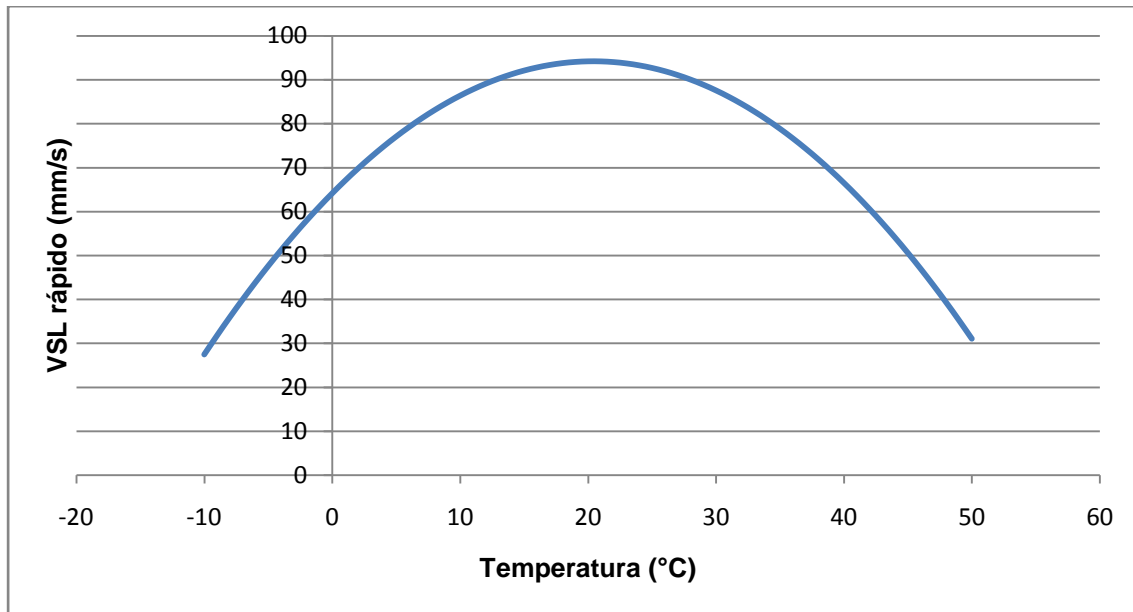
La VSL total de los espermatozoides (sumatoria de lentos, medios y rápidos), en la comparación de medias no se vieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos. El análisis de contraste de tendencias fue significativo para el modelo cuadrático ($p = 0.023$) con un máximo a $19.7\text{ }^{\circ}\text{C}$.



$p < 0.05$

Figura 19. Tendencia cuadrática de la VSL total de los spz de pajuelas tratadas a 4°C , 20°C y 35°C .

En cuanto a la VSL rápida de los espermatozoides en la comparación de medias no se vieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos. El análisis de contraste de tendencias fue significativo para el modelo cuadrático ($p = 0.037$) con un máximo a $20.4\text{ }^{\circ}\text{C}$.



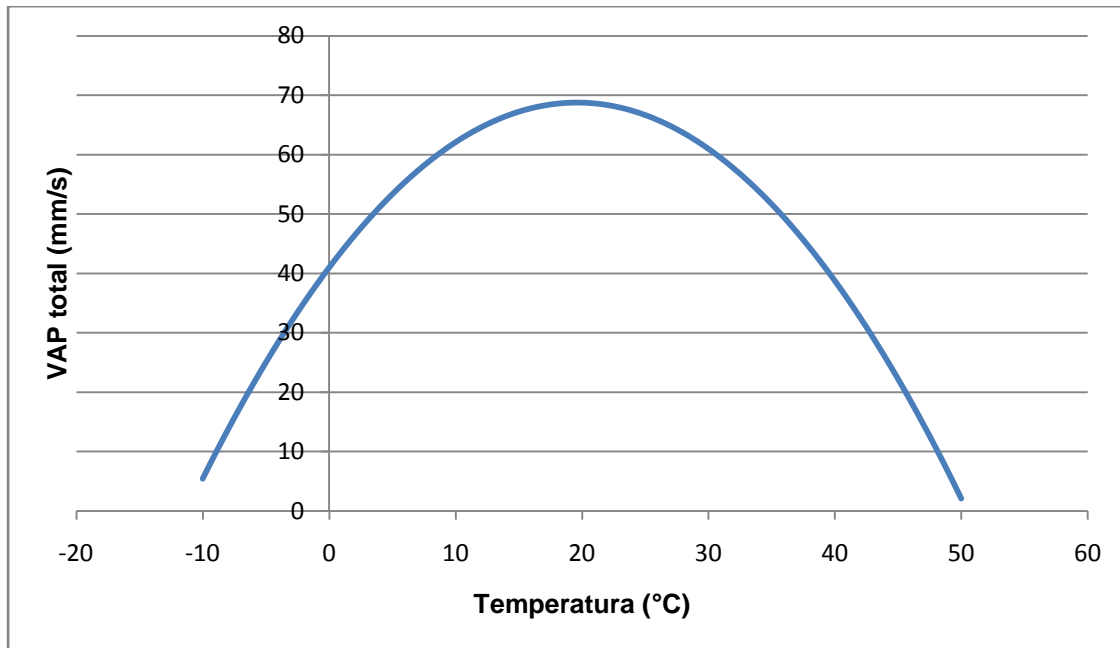
$p < 0.05$

Figura 20. Tendencia cuadrática de la VSL rápida de los spz de pajuelas tratadas a 4°C, 20°C y 35°C.

La VSL de los espermatozoides lentos y medios de las pajuelas de los tres tratamientos, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la comparación de medias ni en el análisis de contraste de tendencias.

Velocidad media (VAP)

La VAP total de los espermatozoides (sumatoria de lentos, medios y rápidos), en la comparación de medias no se vieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos. El análisis de contraste de tendencias fue significativo para el modelo cuadrático ($p = 0.038$) con un máximo a 19.6°C.



$p < 0.05$

Figura 21. Tendencia cuadrática de la VAP total de los spz de pajuelas tratadas a 4°C, 20°C y 35°C.

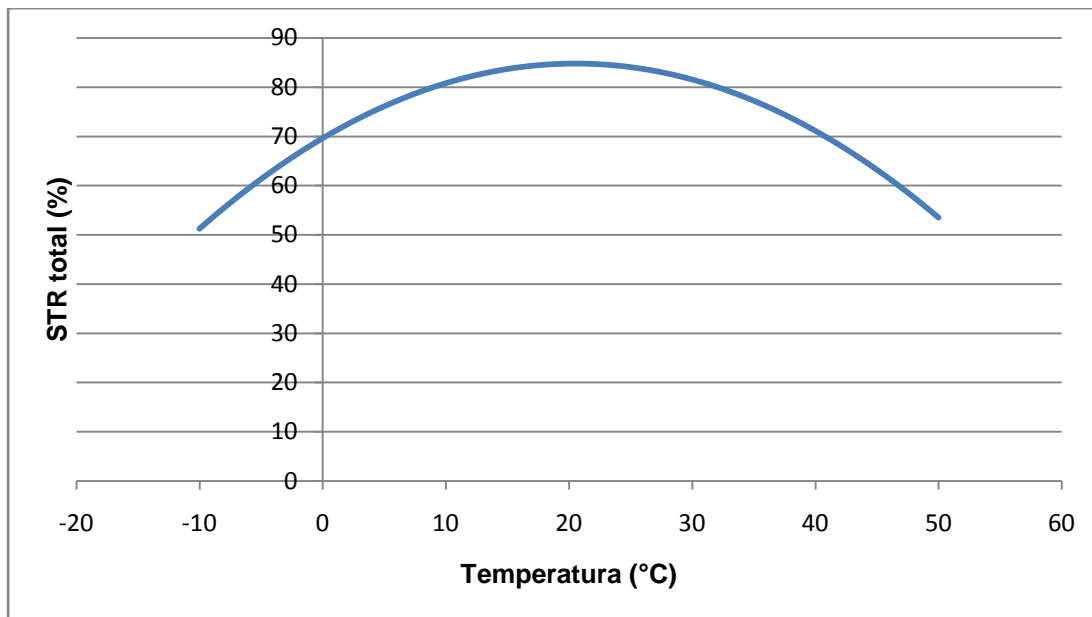
La VAP de los espermatozoides lentos, medios y rápidos de las pajuelas de los tres tratamientos, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la comparación de medias ni en el análisis de contraste de tendencias.

Índice de linealidad (LIN)

El LIN de los espermatozoides totales, lentos, medios y rápidos de las pajuelas de los tres tratamientos, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la comparación de medias ni en el análisis de contraste de tendencias.

Índice de rectitud (STR)

El STR total de los espermatozoides (sumatoria de lentos, medios y rápidos), en la comparación de medias no se vieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos. El análisis de contraste de tendencias fue significativo para el modelo cuadrático ($p = 0.019$) con un máximo a 20.5 °C.



p<0.05

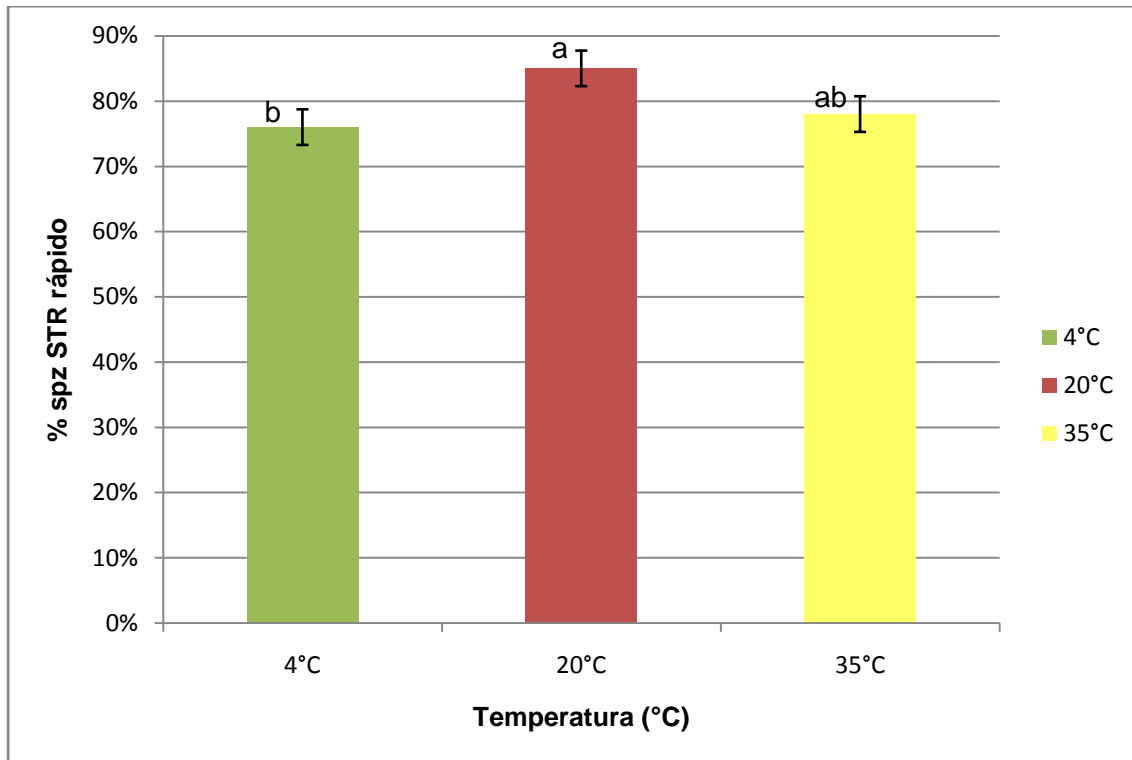
Figura 22. Tendencia cuadrática de la STR total de los spz de pajuelas tratadas a 4°C, 20°C y 35°C.

El STR rápido de los espermatozoides en la comparación de medias se vio diferencias significativas ($p=0.049$) entre tratamientos.

Tabla 14. Porcentaje de STR rápido en spz tratados a 4°C, 20°C y 35°C.

Pajuelas	Media	
4°C	76%	b
20°C	85%	a
35°C	78%	ab

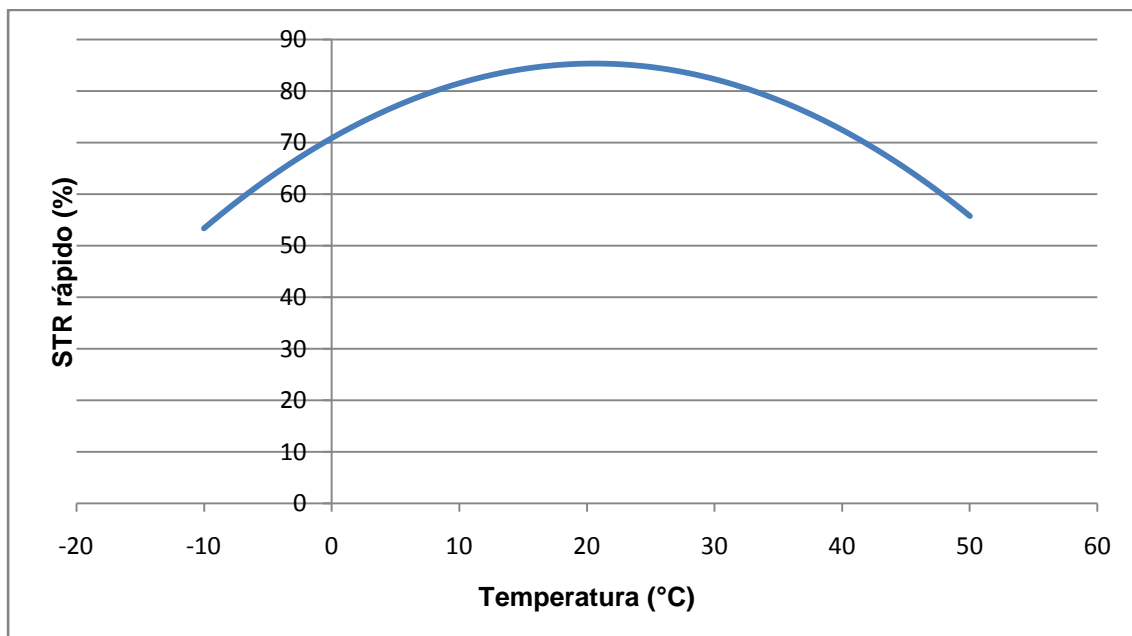
p<0.05



p<0.05

Figura 23. Porcentaje spz STR según temperatura de empaquetado.

El análisis de contraste de tendencias fue significativo para el modelo cuadrático (p=0.019) con un máximo a 20.5 °C.



p<0.05

Figura 24. Tendencia cuadrática de la STR rápido de los espermatozoides de pajuelas tratadas a 4°C, 20°C y 35°C.

Índice de oscilación (WOB)

En cuanto a WOB de los espermatozoides totales, lentos, medios y rápidos de las pajuelas de los tres tratamientos, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la comparación de medias ni en el análisis de contraste de tendencias.

Análisis de motilidad en el tiempo

En el cronometrado, se evaluó un modelo de comportamiento que incluye los efectos principales de tratamientos y tiempos de congelado y las interacciones entre efectos, ajustándose el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + TRAT_i + MIN_j + (TRAT \times MIN)_{ij} + (MIN \times MIN)_{jj} \\ + (TRAT \times MIN \times MIN)_{ijj}$$

Donde la motilidad de los espermatozoides se considera como respuesta de cada tratamiento y de cada minuto, además de la interacción entre minutos y tratamientos, el efecto cuadrático del tiempo expresado con el término minutos al cuadrado (minutos * minutos) y por la interacción entre el término cuadrático del tiempo y los tratamientos (minutos * minutos * tratamientos). No se observaron efectos significativos en ningún parámetro de este modelo ($p > 0.05$).

DISCUSIÓN

En este trabajo la motilidad fue el indicador utilizado para evaluar el impacto de la temperatura al momento del empaquetado en pajuelas durante el proceso de congelamiento sobre la calidad del semen ovino (Buzón Cuevas, 2013). Existen variados reportes que documentan la disminución de la motilidad en el proceso de congelamiento- descongelamiento de semen en diferentes especies incluida la ovina. Observándose un aumento de espermatozoides estáticos o sin movimiento progresivo Karthikeya (2003), Martínez-Pastor y col., (2005), Dorado y col., (2009) Hashida y col. (2013).

A través del análisis del semen en equipo automatizado se obtuvo porcentaje de espermatozoides estáticos o sin movimiento, móviles progresivos y no progresivos en cada grupo de pajuelas tratadas a diferentes temperaturas (4°C, 20°C y 35°C). Los resultados muestran que la condición más desfavorable resultó ser 35°C en la cual el porcentaje de espermatozoides estáticos es mayor, siendo la diferencia significativa con el tratamiento a 20°C pero sin poder diferenciarse con el de 4°C. Asimismo, el porcentaje de espermatozoides no progresivos no mostró diferencias significativas ($p > 0.10$) entre los tres tratamientos. Estos resultados no estarían de acuerdo con lo reportado por Maxwell y col. (1995) para quien la mejor temperatura de empaque para el semen ovino es entre 4 y 6°C.

Según Fernández Abella (2015) el movimiento progresivo o normal es el que determina que el espermatozoide avance y pueda fecundar, interesando por esto la existencia de un alto número de espermatozoides con dicho movimiento. En nuestro trabajo con un intervalo de confianza de 90% el porcentaje de espermatozoides progresivos es significativamente superior en el tratamiento a 20°C frente a los de 4°C y 35°C. Cuando se analizó la velocidad de los espermatozoides, el porcentaje de los mismos medios y rápidos a 4°C es significativamente superior o sin diferencia frente a los otros dos tratamientos respectivamente, lo cual concordaría con lo reportado por Maxwell y col, (1995). El porcentaje de espermatozoides lentos no presentó diferencias entre los tres tratamientos. Estos resultados no muestran diferencias entre los espermatozoides estáticos o lentos, pero si se observó diferencias entre tratamientos en los porcentajes de progresivos, rápidos y medios, por lo que de acuerdo a lo expresado por Fernández Abella serían los espermatozoides con mayor chance de fecundar.

De acuerdo a los resultados obtenidos los daños causados por el proceso de congelamiento o descongelamiento se reflejan en los porcentajes de estáticos y lentos obtenidos en los tres tratamientos los cuales se reportan afectan diferentes aspectos de la fisiología celular especialmente reducción de la función mitocondrial (Viswanath y Shannon, 1997). El impacto de la temperatura al momento de empaquetar estaría afectando entonces al grupo de espermatozoides con movimiento progresivo y velocidad rápida o media según los resultados obtenidos en este ensayo. Asimismo, 35°C podría reportarse como la temperatura más desfavorable.

El análisis de las medias de VCL, VSL, VAP y STR, en el total de los espermatozoides no mostró diferencias significativas, pero si se encontró en el contraste de tendencias en el modelo cuadrático diferencias significativas, con máximos de 20.6°C, 19.7°C, 19.6°C y 20.5°C respectivamente. Mientras que en las variables de LIN y WOB no se encontró diferencias ni en las medias ni en el contraste de tendencias.

Cuando se analizó en el grupo de espermatozoides rápidos VCL, VSL y STR si bien no hubo diferencia significativa en las medias si se encontraron en el contraste de tendencias y los máximos respectivos fueron: 23.5°C, 20.4°C y 20.5°C. En el grupo de espermatozoides lentos y medios no se encontraron en ninguna de las variables analizadas diferencias significativas ni en medias ni en contraste de tendencias.

Estos resultados sugerirían que la temperatura de 35°C no sería una condición adecuada mientras que entre las de 4°C y 20°C teniendo en cuenta los porcentajes de espermatozoides progresivos, rápidos y medios serían ambas pasibles de utilizar. Al tener en cuenta los análisis de tendencia y los máximos obtenidos se tendría mejores resultados al utilizar la temperatura de 20°C.

En el análisis de la motilidad de los espermatozoides como respuesta a tratamiento y a tiempo post descongelamiento, y de la interacción entre tiempo y tratamientos no se observaron efectos significativos en ningún parámetro de este modelo ($p > 0.05$). El objetivo de esta parte del ensayo era simular el tiempo transcurrido desde el descongelado a la inseminación propiamente dicha, por lo cual en este período analizado (9 minutos) no se producirían alteraciones en las variables analizadas.

Este ensayo muestra que la temperatura en la cual se obtienen mejores resultados coincide con la temperatura media estacional en Salto en otoño, momento en el cual los carneros Merino se encuentran en la mejor condición para producir semen.

CONCLUSIONES:

La calidad del semen ovino es afectada por la temperatura ambiente al momento de empaquetar las pajuelas siendo los espermatozoides de movimiento progresivos, rápidos y/o medios los más afectados.

De las tres temperaturas testeadas en este ensayo, 35°C sería la condición más desfavorable para el empaquetamiento de semen de carnero Merino Australiano.

Las temperaturas 4°C y 20°C, teniendo en cuenta los porcentajes de espermatozoides progresivos, rápidos y medios serían ambas posibles de utilizar. Al tener en cuenta los análisis de tendencia y los máximos observados se obtendría mejores resultados al utilizar la temperatura de 20°C.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Aisen E. (2004) Reproducción ovina y caprina. Buenos Aires, Inter-Médica, 206p.
- 2- Alberio, R.; Colas, G. (1976). Influence of photoperiodism on the sexual development o the young Ile-de-France ram. International Congress of Animal Reproduction and artificial insemination. 8th, Cracow. Pp. 26-29.
- 3- Alberio, R. J. (1979). Avances en conservación de semen ovino. Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental de Balcarce. Boletín Técnico N° 80. 19 pp.
- 4- Bernardi, S., Allende, R., Mazzeo, R., Monti, J., Marini, P. (2011). Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. InVet. 13 (2):25-38.
- 5- Bomsel-Helmreish, O.; Thibault, C. (1967). Anomalies chromosomique set troubles pathologique sou sexuels chez les mammiferes. Année Biologique. 5-6:287-322.
- 6- Braden, A. W. H.; Mattner, P. E. (1970). The effect of scrotal heating in the ram on semen characteristics, fecundity and embryonic mortality. Australian Journal of Agricultural Research. 21:509-518.
- 7- Bruére, A. N.; Chapman H. M. (1974). Double translocation heterozygosity and normal fertility in domestic sheep. Cytogenet Cell Genet. 13:342-351.
- 8- Buratovich, O. (2010). Eficiencia reproductiva en ovinos: factores que la afectan. Parte II: otros factores no nutricionales. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/produccion_ovina/76-Eficiencia_reproductiva.pdf. Fecha de consulta: 1 de julio de 2016.
- 9- Burgess, G. W. (1982). Ovine contagious epididymitis: a review. Veterinary Microbiology. 7:551-571.
- 10-Buzón Cuevas, A. (2013) Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer. Tesis. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba, 172 p. Disponible en: <http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/11586/2014000000902.pdf?sequence=1> Fecha de consulta: 24 de octubre de 2016.
- 11-Cameron, A. W. N.; Murphy, P.M.; Oldham, C.M. (1988). Nutrition of rams and output of spermatozoa. Proceedings of the Australian Society of Animal Production. 17:162-165.
- 12-Cavestany, D. (1994). Procesamiento y congelación de semen de toro. Montevideo, Santa Catalina, 23 pp.
- 13-Courot, M. (1962). Développment du testicule chez l'agneau; établissement de la spermatogenése. Annales de Biologie Animale, Biophysique 2:25-42.
- 14-Cunningham, J.; Klein, B. (2009). Fisiología Veterinaria. 4^o ed. Barcelona, Elsevier, 700 p.
- 15-Colas, G. (1983). Factors affecting the quality of ram semen. En: Haresign, W. Sheep production. London. Butterworths. pp. 453-465.

- 16-D'Alessandro, G. A.; Martemucci, G. (2016). Post-thaw survival and acrosome integrity of spermatozoa of Leccese rams frozen in different seasons with a milk-egg yolk extender. *Italian Journal of Animal Science*. p.139-148. Disponible en: <http://ijas.pagepress.org/index.php/ijas/article/view/ijas.2005.139> Fecha de consulta: 12 de agosto de 2016.
- 17-Doardo, J.; Hidalgo, M.; Rodriguez, I. (2009). Assessment of goat freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Animal Reproduction Science*, 112: 150-157.
- 18-Durán del Campo, A. (1980). *Anatomía, Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en Ovinos*. Montevideo, Hemisferio Sur, 264 p.
- 19-Dutt, R. H. (1954). Fertility rate and embryonic death loss in ewes early in the breeding season and fertility in sheep. *Journal of Animal Science* 13:464-469.
- 20-Dutt, R. H.; Hamm, P. (1957). Effect of exposure to high temperature and shearing on semen production of rams in winter. *Journal of Animal Science* 16:328-334.
- 21-Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1987). *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Sydney, Butterworths, 194 p.
- 22-Fernández Abella, D. (1992). Efectos de la edad y la raza en la producción de semen y la actividad sexual. *Boletín Técnico de Ciencias Biológicas* 2:37-49.
- 23-Fernández Abella, D.; Villegas, N.; Echeverría, D.; Robaina, J. (1993). Evaluación de las variaciones estacionales en la producción espermática de cuatro razas. *Boletín Técnico de Ciencias Biológicas* 3:23-24.
- 24-Fernández Abella, D.; Saldanha, S.; Surraco, L.; Villegas, N.; Hernández, Z.; Rodríguez P. (1994). Evaluación de la variación estacional de la actividad sexual y crecimiento de lana en cuatro razas ovinas. *Boletín Técnico de Ciencias Biológicas* 4:19-43.
- 25-Fernández Abella, D.; Becu-Villalobos, D.; Lacau-Mengido I. M.; Villegas, N.; Bentancur, O. (1999). Sperm production, testicular size and concentrations of gonadotropins and testosterone in plasma of Merino and Corriedale sheep. *Reproduction, Nutrition Development* 39:617-628.
- 26-Fernández Abella, D. (2003). *Manual de inseminación artificial por vía cervical en ovinos*. Montevideo, Secretariado Uruguayo de la Lana. 71 p.
- 27-Fernández Abella, D. (2006). *Manual de Inseminación Artificial en Ovinos*. Montevideo, Hemisferio Sur, 79 p.
- 28-Fernández Abella, D.; Presa, Y.; Irabuena, O.; Sterla, S.; Villegas, N. (2013). Efecto del Selfos plus en la fertilidad del semen fresco y congelado en carneros Merino. *Revista Argentina de Producción Animal*. 33:43-52.
- 29-Fernández Abella, D. (2015). *Tecnologías Reproductivas Bovinas y Ovinas*. Montevideo, Hemisferio Sur. 200pp.
- 30-Gibbons, A.; Cueto, M. (1995). *Manual de Inseminación Artificial en la Especie Ovina*. INTA Bariloche N°281. Disponible en: <http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta->

[manual de inseminacion artificial en la especie .pdf](#) Fecha de consulta: 18 de Abril de 2016.

- 31-Gibbons, A.; Cueto, M.; GarciaVinent, J.; Wolff, M.; Arrigo, J. (1993). Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Manual de divulgación. Comunicación Técnica de Producción Animal del INTA Bariloche Nº 200. 19 p.
- 32-Galloway, D. B. (1966). Some aspects of reproductive wastage in rams. Australian Veterinary Journal 42:79-83.
- 33-Gil, J. (2003). Preservación de semen ovino. En: Ungerfeld, R. Reproduccion en los animales domesticos. Montevideo, Melibea, V2, p 365-385.
- 34-Gil, M.C., García-Herreros, M., Barón, F.J., Aparicio, I.M., Santos, A.J., GarcíaMarín, L.J. (2009). Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. Theriogenology 71: 254-263.
- 35-Graham, J.K. (1996) Cryopreservation of stallion spermatozoa. The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice 12:131-147.
- 36-Grajales, H.; Tovío, N. (2008). Factores que inciden en la eficiencia de la reproducción caprina y ovina. IV Congreso Internacional Ovino-Caprino ANCO. Congreso Internacional Ovino-Caprino, 2008, Bogotá. 4pp.
- 37-Gomes, W. R.; Butler, W. R.; Johnson, A. (1971). Effect of elevated ambient temperature and blood levels and in vitro biosynthesis of testosterone in the ram. Journal of Animal Science 4:804-807.
- 38-Gunn, R. M. (1942). Studies in fertility of sheep. Seminal changes affecting fertility of rams. Australian Veterinary Journal 18:94-106.
- 39-Guthrie, H. D.; Welch, G. R. (2006). Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. Journal of Animal Science. 84:2089-2100.
- 40-Hashida, N. H.; Nor Ashikin, M. N. K.; Khaironizam, M. Z.; Abdullah, R. B. (2013). Effects of freezing on sperm velocity in four different age groups of Jermasia buck. Indian Journal of Animal Research, 47: 54-57.
- 41-INUMET. Estadísticas Climatológicas. Instituto Uruguayo Meteorológico. Disponible en:
<http://www.meteorologia.com.uy/ServCli/estadisticasClimatologicas> Fecha de consulta: 1 de Julio de 2016.
- 42-Karthikeya G.(2003). Computer automated motility and morphometric analysis of bull and buck spermatozoa. MVSc Thesis, Tamil Nadu Veterinary and Animal Sciences University, Chennai, India. 320 pp.
- 43-Ledesma, A.; Manes, J.; Ríos, G.; Aller, J.; Cesari, A.; Alberio, R.; Hozbor, F. (2015). Effect of Seminal Plasma on Post-Thaw Quality and Functionality of Corriedale Ram Sperm Obtained by Electroejaculation and Artificial Vagina. Reproduction in Domestic Animals. 3:386-392.
- 44-Limaye, L. S. (1997). Bone marrow cryopreservation: improved recovery due to bioantioxidant additives in the freezing solution. Stem Cells 15: 353-358.

- 45-Lindsay, D. R.; Pelletier, J.; Pisselet, C.; Courot M. (1984). Changes in photoperiod and nutrition and their effects on testicular growth of rams. *Journal of Reproduction and Fertility* 71:351-356.
- 46-Louvandini, H.; McManus, C.; Martins, R.; Lucci, C. M.; Correa, P. S. (2008). Testicular biometric characteristics in Santa Ines sheep submitted to protein supplementation and antihelminth treatments. *Ciencia Animal Brasileira* 9 (3): 638-647.
- 47-Malama, E.; Jannet, F; Siuda, M.; Bollwein, H. (2016). Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality. *Theriogenology* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.002>
- 48-Martinez-Pastor, F.; Garcia-Macias, V.; Alvarez, M.; Herrez, P.; Anel, L.; De Paz, P. (2005). Sperm subpopulation in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biology of Reproduction*, 72: 316-327.
- 49-Maxwell, W.; Salamon, S. (1993). Liquid Storage of Ram Semen: a Review. *Reproduction, Fertility and Development*; 5: 613-638.
- 50-Maxwell, W. M. C.; Watson, P. F. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science* 42: 55-65.
- 51-MGAP-DIEA. (2015). Anuario Estadístico Agropecuario. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2015,O,es,0>, Fecha de consulta: 24 Agosto de 2016.
- 52-Morrier, A.; Bailey, J.L. (2012). Pre-incubation prior to semen processing and the subsequent effect on the quality of fresh-cooled and cryopreserved ram semen. *Small Ruminant Research* 102(1):57-62.
- 53-Moule, G. R.; Waites, G. M. H. (1963). Seminal degeneration in the ram and its relation to the temperature to the scrotum. *Journal of Reproduction and Fertility* 5:433-446.
- 54-Muiño, R.; Tamargo, C.; Hidalgo, C.O.; Peña, A. I. (2008). Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science* 109: 27–39.
- 55-Oldham, C. M.; Adams N. R.; Gherardi, P.B.; Lindsay, D.R.; MacKintosh, J.B. (1978). The influence of level of feed intake on sperm producing capacity of testicular tissue in the ram. *Australian Journal of Agricultural Research*. 29:173-179.
- 56-Ortavant, R. (1958). Le cycle spermatogénétique chez le bélier. Université de Paris VI.127pp
- 57-Osorio C. (2013). Valoración computarizada de la integridad funcional de la membrana plasmática, motilidad y morfología espermática en semen criopreservado de búfalo. Programa de Maestría en Reproducción Animal. LUZ. Maracaibo. 106p.

- 58-Papolu Rama Devi, MD. (2009). A to Z Infertility: Hope for Infertile Couples. Disponible en: http://www.fertilityindia.com/how_to_get_pregnant.php Fecha de consulta: 1 de julio 2016.
- 59-Patel, J. B.; Dhami, A. (2013). Computer assisted sperm analysis of fresh and frozen thawed HF X Kankrej (F1) bulls semen and their interrelationship. *Indian Journal of Animal Research*. 47 (4):315-320.
- 60-Paulenz, H.; Söderquist, L.; Pérez-Pé, R.; Berg, K.A. (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology* 57: 823-836.
- 61-Quintero-Moreno, A., Miró, J., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E. (2003) Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*. 59:1973-1990.
- 62-Quintero-Moreno, A., Rubio-Guillén J., González-Villalobos D., Gutiérrez JC., Madrid-Bury N.; López-Brea JJ. (2011). Identification of cryodamage on plasma membrane Integrity in bull spermatozoa and its relationship with field fertility. *Revista Científica (Universidad de Zulia)*. 21(5): 403 - 407.
- 63-Rodríguez-Martínez, H. (2003). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia. *Reprod Dom Anim* 38: 312–318.
- 64-Salamon, S.; Maxwell, W.M.C.; Evans, G. (1990). Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza, Ed. Acribia, 192pp.
- 65-Salamon, S.; Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62: 77-111.
- 66-Sanford, L.; Dickson, K. A. (2008). Prolactin regulation of testicular development and sexual behavior in yearling Suffolk rams. *Small Ruminant Reserch* 77:1-10.
- 67-Sapsford, C. S. (1951). Seasonal changes in spermatogenesis in rams; their relation to plane of nutrition and to vitamin A status. *Australian Journal of Agricultural Research* 2:331-341.
- 68-Senger, PL. (2003). *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2^a ed. Washington. Current Conceptions, 373 p.
- 69-Soler Vázquez, C; Sancho Navarro, M; Fuentes, MC. ISASv1. Integrated Semen Analysis System. Valencia, Universitat Valencia, 60pp.
- 70-Sterbenc, N.; Koser, M.; Bollvvein, H.; Kline, P. (2014). The effect of Equex STM® in freezing media on post thaw motility, viability and DNA integrity of frozen-thawed ram spermatozoa. *Slovenian Veterinary Research*. 1:35-42.
- 71-Synnott, A. L., Fulkerson, W. J., Lindsay, D. r. (1981). Sperm output birams distribution amongst ewes under condition of continual mating. *Journal of Reproduction and Fertility* 62:355-361.
- 72-Tiwari, R.; Mishra, G. K.; Singh, R. B.; Saxena, S. K.; Siddiqui, M. U. (2012). Performance of pure Danish Holstein Friesian bulls under Indian management and tropical climatic conditions. *Indian Journal of Field Veterinarians* 8 (1): 50-54.

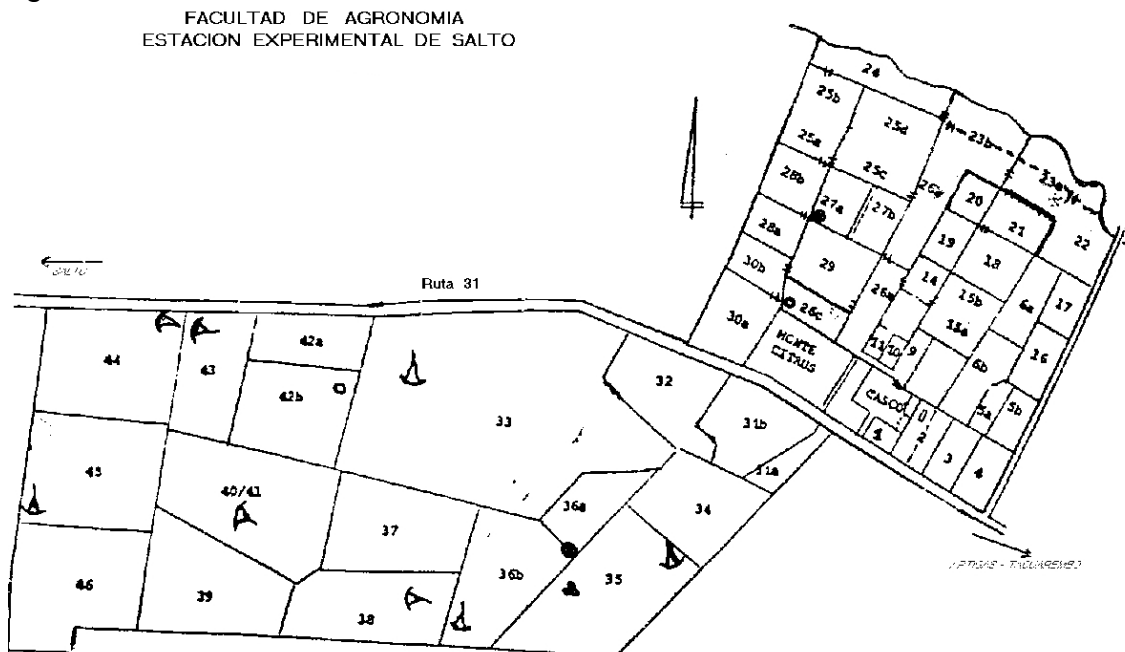
- 73-Tvrđá, E.; Mackovich, A.; Greifová, H.; Lukáč, N. (2016). Lycopene Offers Protection against Oxidative Damage in Frozen-Thawed Bovine Semen. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies* 49(1): 115-118.
- 74-Ungerfeld, R. (2002). *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea, V1, 291 p.
- 75-Upreti, G.C.; Oliver, J.E.; Duganzich, D.M.; Munday, R.; Smith, J.F. (1995). Development of a chemically defined ram semen diluent (RSD-1). *Animal Reproduction Science* 37: 143-157.
- 76-Viswanath, R.; Shannon, P. (1997). Do sperm cells age? A review of the physiological change in sperm during storage at ambient temperature. *Reproduction Fertility Development*. 9: 321-331.
- 77-Waites, G. H. H.; Ortavant, R. (1968). Effects precoces d'une élévation de la température testiculaire sur la spermatogenèse du bélier. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*. 8:323-331.
- 78-Wang, W.; Luo, J.; Sun, S.; Xi, L.; Gao, Q.; Haile, A. B.; Shi, H.; Zhang, W. (2015). The Effect of Season on Spermatozoa Motility, Plasma Membrane and Acrosome Integrity in Fresh and Frozen-Thawed Semen from Xinong Saanen Bucks. *Reproduction in Domestic Animals*. 50(1):23-28.

ANEXO

Tipo de suelo:

El establecimiento comprende una superficie de 1019 hectáreas con un índice CONNEAT 92, dedicadas a la ganadería, agricultura, lechería, horticultura y citricultura. Los suelos predominantes son VertisolesHáplicos (Grumosoles), BrunosolesÉútricos Típicos, LitosolesÉútricosMelánicos y LitosolesSubéútricosMelánicos.

Figura 25. Distribución de los potreros de la Estación Experimental de Facultad de Agronomía de Salto.



Fuente: <http://www.fagro.edu.uy/eefas/index.php/institucional/que-es-la-eefas>

RESULTADOS MOTILIDAD

Tabla 15. Resultado espermatozoides estáticos.

ESTATICOS	4°C	20°C	35°C
Media	0,5283	0,4875	0,5878
Lower	0,4822	0,4367	0,5444
Upper	0,5739	0,5385	0,63

Tabla 16. Resultado espermatozoides progresivos.

PROGRESIVOS	4°C	20°C	35°C
-------------	-----	------	------

Media	0,1653	0,3034	0,1518
Lower	0,1035	0,2116	0,09538
Upper	0,2537	0,4142	0,233

Tabla 17. Resultado espermatozoides no progresivos.

NO PROG	4°C	20°C	35°C
Media	0,3064	0,2091	0,2604
Lower	0,246	0,153	0,2066
Upper	0,3743	0,2791	0,3225

Tabla 18. Resultado espermatozoides con motilidad media.

MEDIO	4°C	20°C	35°C
Media	0,04307	0,02774	0,03174
Lower	0,03363	0,01966	0,02413
Upper	0,05501	0,03902	0,04164

Tabla 19. Resultado espermatozoides con motilidad lenta.

LENTOS	4°C	20°C	35°C
Media	0,125	0,08554	0,1106
Lower	0,08701	0,05213	0,07666
Upper	0,1764	0,1373	0,1571

Tabla 20. Resultado espermatozoides con motilidad rápida.

RAPIDOS	4°C	20°C	35°C
Media	0,3037	0,3993	0,2698
Lower	0,2369	0,3182	0,2094
Upper	0,3798	0,4863	0,3402