

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Efecto del ritmo y frecuencia del eyaculado,
sobre las características seminales en ovinos de
raza Katahdin**

TESIS

**Para obtener el grado de
Maestra en Biotecnología**

Presenta:

Rosalía Hernández García

Director de Tesis: Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca

2018



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2018/050
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 19 de junio de 2018

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Biotecnología de la **C. Rosalía Hernández García**, matrícula 14140009, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título **“Efecto del ritmo y frecuencia del eyaculado sobre las características seminales en ovinos de la raza Katahdin”** para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú

Dra. Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. C. Rosalía Hernández García
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2018/MB/073
ASUNTO	Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 21 de marzo de 2018

C. ROSALÍA HERNÁNDEZ GARCÍA
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo	UNPA	Presidente
Dr. Alfonso Juventino Chay Canul	UJAT	Vocal
MC. Carlos Iván Medel Contreras	UNPA	Secretario
Dr. Sergio Ramírez Ordoñez	UNPA	1er Suplente
Dr. José Abad Zavaleta	UNPA	2º Suplente

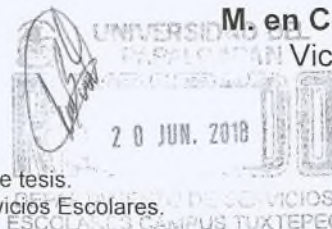
Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



Sandra T. del Moral Ventura
Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado



M. en C. Héctor López Arjona
M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo. Bo.



C.c.p. Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo – Director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

DEDICATORIA

A DIOS

Porque gracias a él existo, por iluminarme y brindarme sabiduría, por estar siempre a mi lado para seguir adelante.

A MI AMOR

César

Por ser mi compañero de vida. Por estar junto a mí en las buenas y las malas. Por aconsejarme y por brindarme tu apoyo y compañía, sólo deseo que sientas que mis logros son también tuyos y que mis esfuerzos son inspirados en ti y para ti. "TE AMO"

A MI HIJA

María Fernanda

Por ser el motor que me impulsa a seguir adelante, culminar este y otros retos futuros, porque gracias a tu existir llenas mi vida de amor y alegría. Gracias por tu amor y compañía mi princesita." TE AMO"

A MIS PADRES

LEOCADIO E ISABEL

Por haberme dado la vida. Porque se que a pesar de la distancia estarían orgullosos de este logro.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo por su amistad y paciencia para la conclusión de la tesis.

Al Dr. José Abad Zavaleta por su apoyo durante la realización de la presente tesis y por su amistad.

A mis súper amigos: Margarita Cruz Avendaño y Antonio Cabrera, por su invaluable amistad y por apoyarme en la realización de la tesis. Gracias amigos.

Al sr. Gustavo Hernández Aguirre y a Heriberto Hernández por su valioso apoyo durante la fase experimental.

Al Dr. Álvaro, por su amabilidad y orientación durante el manejo del CASA, gracias.

A la Universidad del Papaloapan (UNPA) por otorgarme las facilidades para realizar mis estudios de maestría.

A el CONACYT por la beca otorgada (571563) para la realización de mis estudios de maestría.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ABREVIATURAS	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XII
I. INTRODUCCIÓN	- 1 -
II. REVISIÓN DE LITERATURA	- 3 -
2.1 Anatomía funcional de la reproducción ovina.....	- 3 -
2.1.1 Órganos reproductivos del ovino.....	- 4 -
2.2. Células espermáticas	- 4 -
2.3 Fisiología reproductiva del ovino	- 5 -
2.4 Eyaculación.....	- 5 -
2.5 Semen Ovino	- 6 -
2.6 Determinación de la calidad del semen.....	- 7 -
2.6.1 Color.....	- 8 -
2.6.2 Volumen	- 9 -
2.6.3 Motilidad	- 9 -
2.6.4 Concentración espermática	- 10 -
2.6.5 Morfología	- 11 -

2.7 Selección de donantes de semen	- 12 -
2.8 Colección de semen.....	- 13 -
2.8.1 Colección de semen por la técnica de Vagina artificial	- 14 -
2.8.2 Colección de semen mediante la técnica de electroeyaculación.....	- 15 -
2.9 Factores que afectan el desempeño sexual.....	- 15 -
2.10 Efecto del ritmo de recogida sobre la calidad seminal	- 17 -
III. HIPÓTESIS	- 19 -
IV. OBJETIVOS	- 20 -
4.1. Objetivo general	- 20 -
4.2. Objetivos específicos	- 20 -
V. MATERIALES Y MÉTODOS	- 21 -
5.1 Ubicación	- 21 -
5.2 Recolección del eyaculado.....	- 21 -
5.3 Evaluación macroscópica.....	- 22 -
5.4 Evaluación microscópica en el CASA	- 22 -
5.4.1 Motilidad	- 22 -
5.4.2 Concentración espermática.....	- 23 -
5.4.3 Morfología	- 23 -
5.4.4 Fragmentación de ADN.....	- 23 -
5.5 Análisis estadístico.....	- 24 -
VI. RESULTADOS	- 25 -
VII. DISCUSIÓN	- 31 -
7.1 Volumen	- 31 -
7.2 Motilidad.....	- 32 -

7.3 Concentración espermática.....	- 34 -
7.4 Parámetros morfométricos	- 35 -
7.5 Fragmentación de ADN.....	- 36 -
VIII. CONCLUSIÓN	- 38 -
IX. LITERATURA CITADA	- 39 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los eyaculados de los pequeños rumiantes. - 8 -

Tabla 2. Valores del volumen (mL) de los eyaculados sometidos a diferentes frecuencias e intervalos de extracción. - 25 -

Tabla 3. Porcentaje de motilidad espermática en ovinos sometidos a diferentes frecuencias e intervalos de eyaculación. - 26 -

Tabla 4. Concentración de los EZP's (millones EZP's/mL) ovinos sometidos a diferente frecuencia e intervalos de eyaculación. - 27 -

Tabla 5. Longitud de cabeza (μm) de los EZP's ovinos sometidos a diferentes frecuencias e intervalos de eyaculación. - 27 -

Tabla 6. Ancho de cabeza (μm) de los EZP's ovinos sometidos a diferentes frecuencias e intervalos de eyaculación. - 28 -

Tabla 7. Perímetro (μm) de los EZP's ovinos sometidos a diferentes frecuencias e intervalos de eyaculación. - 29 -

Tabla 8. Área (μm^2) de los EZP's ovinos sometidos a diferentes frecuencias e intervalos de eyaculación. - 29 -

Tabla 9. Porcentaje de fragmentación del ADN de los EZP's ovinos sometidos a diferentes frecuencias e intervalos de eyaculación. - 30 -

ABREVIATURAS

mL: Mililitros

EZP's: Espermatozoides

°C: Grados Centígrados

CASA: Análisis de Semen Asistido por Computadora

h: Hora

min: Minutos

µm: Microlitros

s: Segundos

SNC: Sistema Nervioso Central

pH: Potencial de Hidrógeno

µm: Micrómetros

µm²: Micrómetros cuadrados

kg: Kilogramo

1^{ro}: Primero

2^{do}: Segundo

VA: Vagina Artificial

EE: Electroeyaculación

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del ritmo de extracción y frecuencia del eyaculado sobre las características seminales en ovinos de raza Katahdin. Se utilizaron 120 eyaculados, los cuáles se dividieron en orden de recogida (1^{ro} y 2^{do} eyaculado) y ritmo de extracción (intensivo, semi-intensivo y extensivo). Se evaluaron el volumen, motilidad, concentración espermática, morfología y el porcentaje de fragmentación de ADN en las muestras. Las variables se determinaron con el sistema CASA (ISAS, Proiser). El volumen fue mayor para el primer eyaculado en comparación con el segundo; la motilidad presentó diferencia significativa en cuanto a frecuencia de recogida ($P < 0.05$), sin embargo, en ritmo de extracción no presentó diferencia significativa, pero es importante enfatizar que el semi-intensivo presentó mayor porcentaje de motilidad total (76.65 %) del 1^{ro} y 2^{do} eyaculado. La concentración disminuyó conforme aumentó la frecuencia de recogida en los diferentes intervalos de extracción. El porcentaje de fragmentación de ADN disminuyó después de periodos cortos de abstinencia entre las eyaculaciones. En conclusión, la frecuencia y el ritmo de extracción de los eyaculados afecta las variables de volumen, motilidad, concentración y fragmentación de ADN de espermatozoides en ovinos de la raza Katahdin.

Palabras clave: orden de recogida, ritmo de extracción, ADN espermático

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the effect of the extraction rate and frequency of the ejaculate on the seminal characteristics in sheep of the Katahdin breed. 120 ejaculates were used, which were divided in order of collection (1st and 2nd ejaculate) and extraction rate (intensive, semi-intensive and extensive). The volume, motility, sperm concentration, morphology and percentage of DNA fragmentation in the samples were evaluated. The variables were determined with the CASA system (ISAS, Proiser). The volume was greater for the first ejaculate compared to the second; motility presented significant difference in terms of frequency of collection ($P < 0.05$), however, the rhythm of extraction did not present a significant difference, but it is important to emphasize that the semi-intensive had a greater percentage of total motility (76.65%) of the 1st and 2nd ejaculate. The concentration decreased as the collection frequency increased in the different extraction intervals. The percentage of DNA fragmentation decreased after short periods of abstinence between ejaculations. In conclusion, the frequency and rhythm of extraction of ejaculates affects the variables of volume, motility, concentration and fragmentation of sperm DNA in sheep of the Katahdin breed.

Keywords: collection order, extraction rate, sperm DNA

I. INTRODUCCIÓN

La calidad seminal se refiere al conjunto de parámetros que determinan la viabilidad de las células espermáticas (Gadea, 2001). La evaluación de la calidad seminal es una herramienta que ayuda a establecer la fertilidad del macho, y es fundamental para asegurar una buena fertilidad en los sistemas productivos (Sohail *et al.*, 2013; Kathiravan *et al.*, 2011).

Dentro de las características que determinan la calidad seminal se encuentran; la morfología, concentración y movilidad espermáticas, las cuales se respaldan en métodos subjetivos con resultados favorables tanto en ovinos como en muchas otras especies.

Recientemente se han establecido nuevas técnicas basadas en el Sistema de Análisis Computarizado conocido como CASA (Análisis de Semen Asistido por Computadora); el cual permite el análisis de dichas características de forma más objetiva al describir cuantitativamente el movimiento individual de los espermatozoides (EZP's), ofreciendo una mayor confiabilidad sobre los valores de calidad seminal obtenidos (Kathiravan *et al.*, 2011; Hidalgo *et al.*, 2005). Estos indicadores de calidad seminal se pueden ver afectados por la época del año, la edad, la raza, frecuencia de montas y eyaculaciones sucesivas (Yotov *et al.*, 2011).

Diversos estudios han relacionado la frecuencia de eyaculación con alteraciones de las características cuantitativas y cualitativas del eyaculado (Jennings *et al.*, 1976; Bravo *et al.*, 1997; Prado *et al.*, 2003). En este sentido, Ollero *et al.* (1996), concluyen que la frecuencia de eyaculación ejerce un fuerte efecto sobre la calidad espermática de sementales de raza Aragonesa y obtienen los mejores resultados en los segundos eyaculados.

De ahí la importancia de valoración de estos factores, debido a su relación con los parámetros seminales, los cuales se reflejan finalmente en el número de dosis producidas y en la calidad del semen (Rivera y Trujillo,1990).

Por todo lo expuesto anteriormente, el presente trabajo se realizó con el propósito de valorar los efectos del ritmo de extracción y orden de recogida sobre las características seminales en ovinos de raza Katahdin.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Anatomía funcional de la reproducción ovina

El estudio anatómico y funcional del aparato reproductor del ovino inicia en los testículos, los cuales son los responsables de la producción de los EZP's. Los testículos están suspendidos entre las extremidades posteriores dentro de un saco de piel llamado escroto, éstos suben y bajan por acción de los músculos que se encuentran en las paredes del escroto y en el cordón espermático, lo cual permite al animal mantener la temperatura testicular constante. Los EZP's salen del testículo a través de los conductos deferentes y llegan al epidídimo a su porción craneal (cabeza del epidídimo), atraviesan el cuerpo del epidídimo y posteriormente llega a la porción terminal o cola, donde se almacenan hasta pasar al conducto deferente. El traslado de los EZP's por el epidídimo requiere de nueve a trece días. La madurez de los EZP's se lleva a cabo durante el tránsito por el epidídimo; la motilidad incrementa a medida que los EZP's ingresan en el cuerpo del epidídimo. El ambiente de las células espermáticas en la cola del epidídimo provee factores que favorecen la capacidad fecundante; cuando se encuentran en esta región tienen una fecundidad mayor que los del cuerpo epididimario (Amann, 1987).

Al penetrar el conducto deferente en la uretra, los EZP's se unen con las secreciones producidas por las glándulas vesiculares, la próstata y las glándulas bulbouretrales. Estas secreciones sirven como medio de transporte para los EZP's y toma el nombre

de semen. El semen pasa por el segmento uretral que corresponde al pene el mismo que se origina en el periné (bajo el ano), luego se desplaza por la “S” peneana hasta alcanzar al glande y ser expulsados en el momento de la eyaculación. Los músculos retractores del pene mantienen a este dentro del prepucio, que lo protege mientras está relajado (Hafez *et al.*, 2004; Hintz *et al.*, 1987).

2.1.1 Órganos reproductivos del ovino

Los órganos reproductivos del ovino son: el escroto, los testículos, conducto deferente, epidídimo con sus tres porciones (cabeza, cuerpo y cola), plexo pampiniforme, conducto deferente, uretra, glándulas vesiculares, próstata, las glándulas bulbouretrales, pene y flexura sigmoidea, cuerpo del pene y glande (Hafez *et al.*, 2004; Illera, 1994; Evans *et al.*, 1990; Hintz *et al.*, 1987).

2.2. Células espermáticas

Los EZP´s son células especializadas para la fecundación del ovocito, su formación se lleva a cabo en los túbulos seminíferos de los testículos a través de una serie de células germinales en desarrollo. Dichas células son de forma alargada formadas por cabeza y cola, recubierto por la membrana plasmática además manifiesta una estructura de doble pared ubicada entre la membrana plasmática y la porción anterior de la cabeza del espermatozoide conocido como acrosoma (Hafez *et al.*, 2004). La cola del espermatozoide, en forma de flagelo, le permite desplazarse en los líquidos, consta de

tres regiones: pieza proximal, pieza principal o intermedia y pieza terminal (Evans *et al.*, 1990).

2.3 Fisiología reproductiva del ovino

La fisiología reproductiva de los machos ovinos se puede definir como la capacidad que tiene los testículos para producir gametos (EZP's), en cantidad y calidad, suficientes para llevar a cabo la fertilización, además de producir las hormonas sexuales que llevarán a la maduración sexual del individuo (Méndez *et al.*, 2009) y producir una serie de efectos y conductas del ovino como la manifestación de libido o deseo sexual (Latorre *et al.*, 2000).

De manera similar en los ovinos al igual que en todos los mamíferos, el proceso reproductivo está regulado por el Sistema Nervioso Central (SNC). Este control es mediado por el hipotálamo el cual interactúa con la hipófisis y la glándula pineal. Las hormonas producidas en estos tres elementos afectan a la función de las gónadas masculinas (testículos). Las interacciones entre las gónadas, las glándulas reproductivas y el cerebro constituyen el eje central que controla la funcionalidad reproductiva del ovino (Muñoz, 2001).

2.4 Eyaculación

La eyaculación inicia con la aparición de la libido o deseo sexual en el ovino de lo cual es responsable la testosterona. La presencia de una hembra en celo aumenta la

actividad sexual del macho por lo que procura montar a cualquier hembra. El ovino se vale de las feromonas presentes en el aire que han sido liberadas por las ovejas en celo, las cuales son captadas por el sentido del olfato, a esto se le denomina “Signo de Flehmen”. En condiciones de apareamiento natural el ovino busca ovejas en celo, huele su vulva y se empuja contra la grupa de estas. Antes de la monta se observa escurrimientos de líquidos a través de la vaina. El pene se mantiene dentro de la vaina hasta que el animal monta, entonces se da la extensión, el movimiento de propulsión (golpe de riñón), seguido de la eyaculación y desmonta (Hafez *et al.*, 2004; Hintz *et al.*, 1987).

La eyaculación puede ser inhibida por factores externos (presencia de personas extrañas, fallos en la vagina artificial englobados en temperatura y presión), factores fisiológicos (dolor, lesiones musculares y articulares), factores patológicos (adherencias en el pene, enfermedades) (Melling *et al.*, 2000; Illera, 1994).

2.5 Semen Ovino

El semen es la suspensión celular líquida que contiene los gametos masculinos y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino (glándulas accesorias, epidídimo, testículo y conductos deferentes). El plasma seminal constituye la porción líquida de esa suspensión, la cual es liberada en la eyaculación. Los EZP's son provenientes de los túbulos seminíferos localizados en el interior de los testículos los cuales contienen una serie de complejas células germinativas en desarrollo, que

dan origen a los gametos masculinos a través de la espermatogénesis (Hafez *et al.*, 2004).

2.6 Determinación de la calidad del semen

El semen de los ovinos al igual que el de otras especies varía en volumen y calidad dependiendo del estado sanitario, nutricional, influencia medioambiental y actividad sexual. Los parámetros de calidad que se valoran en el semen inmediatamente después de su obtención son: color, volumen, concentración, motilidad y morfología de los EZP's; ver Tabla 1 (Evans *et al.*, 1990). La muestra de semen que se va a valorar deberá carecer de orina, pelos o cualquier otro material extraño (Illera, 1994).

Teniendo en consideración que los EZP's son sensibles al shock térmico, la luz brillante, detergentes, agua, sangre, desinfectantes, metales, humo de cigarrillo, y temperaturas mayores a 40 °C, todo el equipo usado para su examen debe estar libres de contaminantes y ser mantenido a una temperatura aproximada de 37 °C (Melling *et al.*, 2000).

Tabla 1. Características de los eyaculados de los pequeños rumiantes.

	Ovino	Macho cabrío
Volumen (mL)	0.5-2.0 (animales maduros) 0.5-0.7 (animales jóvenes)	0.1 0.5 y 1.2
Concentración (millones EZP's /mL)	3.5 x 10 ⁹ a 6.0 x 10 ⁹	2.5 x 10 ⁹ a 5.0 x 10 ⁹
Movilidad (%)	70-95	70-95
pH	5.9-7.3	5.9-7.3

Fuente: Manual de Prácticas en Manejo Reproductivo de Ovinos y Caprinos (Balcázar y Porras, 2009).

2.6.1 Color

Es un parámetro que se toma en cuenta bajo condiciones de campo y se lleva a cabo observando la opacidad de la muestra dentro del tubo colector; una muestra se clasifica como: buena, cuando la muestra es de color crema y de consistencia espesa; regular, cuando tienen una tonalidad grisácea; y mala cuando la coloración es blanco diluido (Hintz *et al.*, 1987). El semen del ovino es de color crema pálido o lechoso. La coloración rosácea indica presencia de sangre, el semen gris indica una posible contaminación del tracto reproductivo. El semen amarillento y diluido es indicativo de contaminación con orina (Hafez *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 1990). La edad, estado nutricional, época del año, habilidad del recolector y la frecuencia de la obtención de las muestras pueden alterar la calidad del eyaculado.

2.6.2 Volumen

El volumen seminal depende del método de recolección utilizado, la edad y estado del ovino, la habilidad del recolector y la frecuencia de obtención de muestras (Hafez *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 1990). En una investigación realizada empleando diferentes métodos de recolección de semen, se determinó que la vagina artificial es el mejor método para la obtención de semen en el ganado ovino, sin perder características de importancia para la capacidad fecundante de los EZP's (Vera, 2009). El volumen normal de eyaculado de un ovino adulto es de 0.5 mL a 2 mL y en ovinos jóvenes de 0.5 a 0.7mL (Hafez *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 1990).

2.6.3 Motilidad

Implica la estimación de la viabilidad de los EZP's y la calidad de la motilidad, y al ser susceptible a las condiciones ambientales (calor o frío), es necesario proteger el semen antes del análisis. Los parámetros de motilidad incluyen: porcentaje de EZP's en movimiento (normal 70 a 90 %), porcentaje de EZP's con motilidad progresiva, velocidad espermática (0= estacionaria, 4= rápida), longevidad de la motilidad espermática en semen puro (temperatura ambiente 20 a 25 °C) y en semen diluido (temperatura ambiente o de refrigeración 4 a 5 °C (Hafez *et al.*, 2004). La valoración por onda de movimiento es el sistema más simple para determinar la movilidad del semen fresco, las muestras de semen calificadas como buenas y muy buenas (puntuación de 4 y 5) serán aquellas que estarán destinadas a la inseminación artificial (Evans *et al.*, 1990).

El movimiento espermático es un atributo de la calidad seminal porque determina la eficacia de la migración de los EZP's a través del tracto genital de la hembra. Puede ser efectuado a través de una evaluación del movimiento de la masa y del movimiento individual de los EZP's de un eyaculado valorando en forma general la calidad del eyaculado.

Esta evaluación es esencialmente subjetiva, llevando a una alta variabilidad entre los observadores (30 a 60 %). Sin embargo, se han desarrollado nuevos sistemas de valoración seminal a través de procesadores de imágenes asistidos computacionalmente conocidos como Análisis de Semen Asistido por computadora "CASA" que independientemente de evaluar la motilidad espermática, permite evaluar significativamente otros parámetros como morfología, concentración espermática y fragmentación del ADN (Vera, 2009).

2.6.4 Concentración espermática

El número de hembras que pueden ser inseminadas está definido por el número de EZP's por mL de eyaculado. La concentración espermática en ovinos es de 3.5×10^9 a 6.0×10^9 EZP's/mL. La concentración se mide en forma directa usando hemocitometría, densimetría (método de Karras) o espectrofotometría (Hafez *et al.*, 2004; Melling *et al.*, 2000; Illera, 1994; Evans *et al.*, 1990).

Una manera indirecta de cuantificar la concentración espermática es la medición de la circunferencia escrotal. La producción de EZP's es un proceso continuo en el ovino y puede llegar a ser aproximadamente 20 millones de EZP's por gramo de tejido testicular. No obstante, se ha demostrado que la circunferencia escrotal está asociada positivamente con la movilidad espermática, la calidad del semen y la producción de EZP's; y negativamente con los defectos espermáticos primarios (Vera, 2009).

2.6.5 Morfología

Las anomalías morfológicas espermáticas están relacionadas con la fertilidad o infertilidad del macho y se asocian con las condiciones medioambientales que ocasionan estados de estrés como lo es el calor y la humedad (Hafez *et al.*, 2004).

El examen morfológico es una prueba de control de calidad del semen, con una proporción muy alta (mayor a 20 %) de EZP's anormales presentes en la muestra seminal, ésta será calificada de baja calidad fértil (Evans y Maxwell, 1990). En ovinos, los eyaculados con 15 % o más de EZP's anormales no se usarán para programas de inseminación artificial (Hafez *et al.*, 2004). Las formas anormales se clasifican como: anomalías de cabeza Figura 3, defectos de acrosoma, cabezas sueltas anormales, piriformes, estrechos en la base, contorno anormal, tamaño diferente; de pieza media (anormal o abaxial); de cola (doblada simple, doblada terminal); gotas citoplasmáticas proximales o distales y cabezas sueltas normales (López *et al.*, 2011).

2.7 Selección de donantes de semen

Los requisitos que deben reunir los donantes de semen deben ser los mismos que para los sementales destinados a la monta natural: ausencia de enfermedades, buen estado corporal y aplomos correctos (Vijil, 1986). Además, estos animales deben manifestar buena libido (Evans y Maxwell, 1990). Paralelamente a estos factores, a la hora de seleccionar un semental, se debe tener en cuenta el potencial genético del mismo (Evans y Maxwell, 1990).

La manipulación de estos animales implica control de los siguientes factores: alojamiento, alimentación, programas sanitarios y régimen sexual (Evans y Maxwell, 1990; Hafez, 1989). La frecuencia óptima de recogida de semen es aquella que nos proporciona el mayor número de EZP's con el mínimo de recogidas semanales durante un periodo de tiempo dado (Vijil, 1986; Cole y Cupps, 1984).

Se ha podido comprobar que el ritmo de recogidas influye notoriamente sobre las características del eyaculado en el ovino (Vijil, 1986; Cameron *et al.*, 1984). Efectivamente, al incrementar el número de recogidas, disminuye el número de EZP's en cada una de ellas.

Los ritmos de recogida que se emplean más frecuentemente, en la especie ovina, para la realización de experiencias de larga duración, son de un eyaculado/vez/semana (Colas, 1980) o bien de un eyaculado/dos veces/semana (Colas, 1984). Dos

eyaculaciones diarias permiten obtener el máximo número de EZP's por día en ovinos sometidos a un régimen regular de recogida (Cameron *et al.*, 1984).

Existen características individuales del semental, cuya interrelación con los factores del medio resultan de interés para determinar su capacidad reproductora. Las más importantes son la edad y la acción del fotoperiodo (Vijil, 1986; Colas *et al.*, 1985; Cole y Cupps, 1984). Se ha comprobado que los ovinos sometidos a fotoperiodo decreciente, presentan una calidad seminal superior a la de los machos sometidos a fotoperiodo creciente (Vijil, 1986; Colas *et al.*, 1985). En este sentido se ha estudiado también la influencia del fotoperiodo sobre la capacidad de conservación del semen ovino. Así, Fiser y Fairfulí, (1986) obtuvieron una alta correlación entre la congelabilidad del semen ovino y el fotoperiodo, observando que el semen recolectado en días cortos presentaba una mejor calidad posdescongelación que aquel obtenido durante los días largos. El efecto de las horas de luz sobre la calidad seminal, estará influenciado también por la raza del semental en cuestión.

2.8 Colección de semen

La recolección del semen en ovinos tiene ciertas características de manejo que deben de revisarse para efectuarla de forma eficiente. Los métodos para la colección de semen en ovinos son: a) Electroeyaculación: aplicable a toros, ovinos y machos cabríos; b) uso de la vagina artificial (Balcázar y Porras, 2009).

2.8.1 Colección de semen por la técnica de Vagina artificial

Después de la valoración reproductiva del semental, se evalúa el semen; el método para la colección del semen es por medio de la vagina artificial, que simula las características de la vagina; la cual se conforma de la siguiente manera: a) un tubo rígido con válvula de dos vías; b) látex interno tubular (funda); c) una perilla; d) se puede usar un tubo de centrifuga graduado, una “copita” colectora o un cono de plástico; e) ligas. La vagina artificial es un tubo rígido de goma de plástico con propiedades aislantes, el tamaño varía con la especie, su longitud es de 20 por 5.5 cm para los ovinos y de 15 por 5.5 cm para el macho cabrío, esta diferencia entre ambas vaginas se debe a la longitud del pene del macho cabrío, ya que es más corto. Presenta una válvula de dos vías por la que se introduce agua caliente y otra donde se introduce el aire, que proporciona la presión (Balcázar y Porras, 2009).

La funda es un tubo de plástico que conforma el conducto interno, es 4 a 6 cm más largo que el tubo rígido, ya que debe plegarse sobre éste y fijarse con las de goma, este procedimiento permite la formación de un espacio para el depósito del agua caliente, es recomendable utilizar una funda por semental. En un extremo de la vagina artificial y con la funda colocada se conecta y se fija con ligas de goma un cono de látex o plástico y en el otro extremo se conecta el tubo de centrifuga graduado o la “copita colectora”, o en su defecto un cono de plástico que sirve como receptor del eyaculado.

Una vez armada la vagina artificial, se introduce agua caliente de 40 a 45 °C con el propósito de medir la temperatura se introduce un termómetro de mercurio al interior de la vagina artificial, inmediatamente se introduce aire con la perilla para crear la presión idónea que permita la entrada del pene (Balcázar y Porras, 2009).

2.8.2 Colección de semen mediante la técnica de electroeyaculación

La electroeyaculación es otro método que se puede elegir cuando los machos rechazan la vagina artificial, no pueden ser adiestrados a ella o se encuentran imposibilitados para realizar la monta. Con este método se obtiene un volumen de eyaculado un poco mayor al obtenido por medio de la vagina artificial, caso contrario a la concentración espermática la cual resulta menor. Consiste en aplicar estímulos eléctricos sobre el piso de la pelvis (10-15 voltios) durante 3-8 s a intervalos de 7-15 s con incrementos en los voltios. El animal se coloca en posición de cúbito lateral, debido a los estímulos el pene se exterioriza por desdoblamiento de la flexura sigmoidea, se coloca una gasa detrás del glande y se coloca una copa colectora para recolectar la secreción de las glándulas accesorias y luego el semen artificial (Balcázar y Porras, 2009).

2.9 Factores que afectan el desempeño sexual

El sentido del olfato es primordial en el proceso reproductivo (Lindsay, 1964), sirve como medio de comunicación entre los mamíferos (Baldwin y Meese, 1997). Las feromonas juegan un papel importante en la identificación de las hembras en celo

(Signoret, 1975; Signoret, 1991; Rekwot *et al.*, 2001). El olor de una hembra en celo es un estímulo importante para el cortejo y la monta (Zenchak *et al.*, 1981).

Los ovinos que son expuestos al olor del moco cervical y a la orina de una hembra en celo, incrementan su nivel de testosterona (Nishimura *et al.*, 1991; Paleologou, 1997; Vázquez y Orihuela, 2001).

Estos estímulos también, aumentan la libido (McGrath *et al.*, 1976; Rodríguez *et al.*, 1991; Rosa *et al.*, 2000), la capacidad de servicio, el volumen y la concentración del semen (Mickelsen *et al.*, 1982; Simplicio *et al.*, 1982). Esto explica que los ovinos sin experiencia expuestos a una hembra en celo, muestran un comportamiento semejante a los ovinos con experiencia, con una hembra en anestro (Price *et al.*, 1991).

Las hembras en celo, producen un olor en la orina y el moco cervical que es detectado por los machos (Blissitt *et al.*, 1994; Vázquez y Orihuela, 2001), que son atraídos y estimulados sexualmente (Tilbrook y Lindsay, 1987; Rosa *et al.*, 2000). Utilizando el sentido del olfato, los ovinos, identifican a las hembras que han montado y a las que no (Zenchak *et al.*, 1981; Baldwin y Meese, 1997; Lezama *et al.*, 2001). La información química que se encuentra en la orina y el moco cervical es importante en la comunicación del estado de receptividad de la hembra para el macho, así, pueden distinguir por el olor a una hembra en celo de una en anestro (Bland y Jubilan, 1987; Blissitt *et al.*, 1990; Maina y Katz, 1997). Sin embargo, aun cuando el olfato es el sentido más importante en el proceso reproductivo, oler y lamer la vulva, es un proceso táctico que involucra, la estimulación visual, gustativa y olfativa (Lindsay, 1964). Esto determina que las hembras tengan diferente efecto de estimulación sobre los ovinos,

relacionándolo con factores como edad, peso, raza, tamaño y apariencia en general (Lindsay y Pearce, 1984).

En los ovinos después de un agotamiento sexual, al cambiar la hembra en estro, se incrementa el número de eyaculados y la libido (Fraser y Broom, 1998; Ibarra *et al.*, 2000; Lezama *et al.*, 2001) Así, los ovinos saciados sexualmente, con este procedimiento, manifiestan restauración en la libido en el 95 % de los casos (Pepelko y Clegg, 1965; Prado *et al.*, 2003).

2.10 Efecto del ritmo de recogida sobre la calidad seminal

El número de recogidas diarias puede oscilar desde una (Bodnár *et al.*, 1996), si bien a partir del segundo eyaculado el volumen, la concentración y el número de dosis seminales decrece (López *et al.*, 1996). Cuando únicamente se realizan dos extracciones consecutivas, algunos autores muestran medias superiores en concentración y motilidad para el segundo eyaculado que, para el primero, mientras que el primero obtiene un mayor volumen seminal y porcentaje de morfoanomalías (Ducci, 1993; Ghaffar *et al.*, 1994; Bencheikh, 1995).

Además, las recogidas seminales pueden realizarse desde un día por semana (Bencheikh, 1995; Bunaciu *et al.*, 1996) hasta diariamente (Bodnár *et al.*, 1996). En este caso, características como el volumen y la concentración seminal, al igual que antes, disminuyen conforme aumenta el ritmo de recogidas semanales (Bencheikh, 1995; Bodnár *et al.*, 1996; Bunaciu *et al.*, 1996).

Sin embargo, el número de EZP's recogidos/semana es mayor en los ritmos más intensivos (Bencheikh, 1995). En cuanto a otras características como la motilidad, los resultados son divergentes.

III. HIPÓTESIS

La calidad espermática de los ovinos está influenciada por la frecuencia y el número de eyaculados debido al tiempo que permanecen los EZP's en el epidídimo.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la frecuencia e intervalo de extracción del eyaculado sobre las características seminales en ovinos de la raza Katahdin.

4.2. Objetivo específicos

Evaluar el efecto del intervalo de extracción (intensivo, semi-intensivo y extensivo) del eyaculado sobre las características macroscópicas y microscópicas.

Evaluar las características macroscópicas y microscópicas del 1^{ro} y 2^{do} eyaculado en seminales de la raza Katahdin.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Ubicación

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología Animal el cual se localiza en la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec, ubicada en el circuito Central No. 200, Col. Parque Industrial.

Se utilizaron 15 reproductores ovinos de la raza Katahdin, con un peso de 110 kg y una edad aproximada de 12 meses cada uno; los cuales fueron distribuidos en tres tratamientos (n=5) en base a los intervalos de colecta: intensivo (cada 2 días), semi-intensivo (cada 4 días) y extensivo (cada 8 días), durante la fase experimental los animales permanecieron en estabulación y recibieron una dieta de mantenimiento, y libre acceso a agua limpia y fresca

5.2 Recolección del eyaculado

Las muestras de semen fueron colectadas mediante la técnica de vagina artificial. La vagina se cargó con agua calentada con un rango de 37-39 °C hasta el momento de su utilización, posterior a que la vagina fuese cargada, se le agregó aire a la cámara de agua cerrando rápidamente la válvula lateral. La recolección del semen se llevó a cabo en un lugar limpio y libre de polvo. Como estímulo se utilizó la misma hembra en anestro, rotando el orden entre los ovinos. Una vez asegurada la oveja, se procedió a la recolección del semen, colocando en la mano diestra la vagina con el extremo

abierto frente al prepucio. Cuando el macho montó se desvió el pene lateralmente para ser introducido en la vagina artificial. Inmediatamente después del salto, el tubo de recolección se protegió con la mano de los cambios bruscos de temperatura, posteriormente las muestras se transportaron al laboratorio, donde fueron mantenidas a baño María a 37 °C, para su posterior análisis. La frecuencia de los eyaculados fue a diferencia de 5 y 10 min.

5.3 Evaluación macroscópica

El volumen y color de los eyaculados se determinó directamente del tubo recolector graduado.

5.4 Evaluación microscópica en el CASA

5.4.1 Motilidad

La motilidad masal se valoró tomando una alícuota de 5 µl del eyaculado y depositándola en un portaobjeto situado sobre la platina termostada a 37 °C de un microscopio biológico, modelo UB203i. Seguidamente, cada muestra fue valorada por medio del programa de análisis de imágenes CASA (VIMAS, Microptics España), con la lente de fase 10 X negativo. De cada muestra se capturaron 4 campos, tras su análisis permitió obtener el parámetro de motilidad utilizado en este trabajo.

.4.2 Concentración espermática

La concentración espermática se realizó mediante una dilución de 1:200 (semen: agua destilada), posteriormente se depositaron 8 µl de la dilución en una cámara de Neubauer y observada con la lente de fase 10X positivo en el sistema CASA.

5.4.3 Morfología

La evaluación de la morfología espermática se realizó mediante la fijación de una muestra del eyaculado en solución morfológica, la cual se dejó secar por 24 h. Transcurrido este tiempo, se le añadieron los hemocolorantes (Hycel) 1 (10 mL) y 2 (10 mL) y se observaron en la lente de fase 20 X en el sistema CASA. Se observaron 200 EZP's por eyaculado.

5.4.4 Fragmentación de ADN

El porcentaje de fragmentación de ADN se determinó mediante una dilución semen-solución salina, posteriormente se realizó la fijación de la muestra del eyaculado y se dejó en solución de Carnoy's durante 48 h, después se dejaron secar durante 10 min, transcurrido este tiempo se sumergieron durante 5 min en la solución tinción (naranja de acridina, ácido cítrico y fosfato de sodio monohidratado). Posterior a esto se lavaron con agua las tinciones y se evaluaron inmediatamente en el microscopio con el objetivo 20 X. Se capturaron 4 campos de cada eyaculado.

5.5 Análisis estadístico

Los datos de los diferentes parámetros (volumen, motilidad, concentración, morfología y fragmentación de ADN, intervalo de extracción) presentes en el primer y segundo eyaculado fueron analizados por un ANOVA factorial de medias repetidas usando el programa estadístico SPSS para Windows versión 24.0.

VI. RESULTADOS

El promedio total del volumen obtenido de los eyaculados en el presente trabajo se presenta en la Tabla 2. En la cual se observa que el ritmo de extracción no afecta ($P>0.05$) el volumen del eyaculado, sin embargo, es importante enfatizar que el ritmo de extracción semi-intensivo presentó en promedio un volumen mayor (0.86 mL) en comparación con un 0.82 mL y 0.80 mL de los ritmos de extracción intensivo y extensivo respectivamente. El orden de recogida, no presentó efecto sobre el volumen de eyaculado; a pesar de observarse un volumen mayor durante el primer salto (0.90 mL) en comparación con el segundo salto (0.75 mL) con ritmo de extracción intensivo no se observó diferencia significativa ($P>0.05$).

Tabla 2. Valores del volumen (mL) de los eyaculados sometidos a diferentes frecuencias e intervalos de extracción.

Orden de recogida	Ritmo de extracción		
	C/2 días	C/4 días	C/8 días
1 ^{ro} Eyaculado	0.90 ± 0.48	0.84 ± 0.35	0.80 ± 0.32
2 ^{do} Eyaculado	0.75 ± 0.25	0.89 ± 0.31	0.80 ± 0.28

C/2 días: Intensivo, C/4 días: Semi-intensivo, C/8 días: Extensivo

Los datos para el porcentaje de motilidad se muestran en la Tabla 3, en la cual se observa una diferencia estadísticamente significativa ($P<0.05$) sobre el parámetro de orden de recogida, existe una disminución de la motilidad conforme aumenta el orden de recogida. En cuanto al ritmo de extracción no presentan diferencias ($P>0.05$), el

semi-intensivo presenta un promedio total del primer y segundo eyaculado del 76.65 % de motilidad en comparación con un 74.07 y 72 % de los ritmos de extracción extensivo e intensivo, respectivamente.

Tabla 3. Porcentaje de motilidad espermática en ovinos sometidos a diferentes frecuencias e intervalos de eyaculación.

Orden de recogida	Ritmo de extracción		
	C/2 días	C/4 días	C/8 días
1 ^{ro} Eyaculado	76.75 ± 15.72 ^a	79.35 ± 17.47 ^a	75.80 ± 21.27 ^a
2 ^{do} Eyaculado	67.40 ± 18.5 ^b	73.95 ± 16.03 ^b	72.35 ± 18.77 ^b

Literales diferentes entre filas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

C/2 días: Intensivo, **C/4 días:** Semi-intensivo, **C/8 días:** Extensivo.

La concentración promedio de los eyaculados se presenta en la Tabla 4. Se observa que existe diferencia significativa ($P < 0.05$) para el ritmo de extracción; el intensivo presenta una concentración promedio mayor de EZP's para el primer eyaculado (5004.05 millones EZP's/mL) y para el segundo (4740.66 millones EZP's/mL) en comparación con el intervalo semi-intensivo y extensivo, respectivamente. En cuanto al orden de recogida no presenta diferencias significativas ($P > 0.05$), pero cabe mencionar que la concentración espermática tiende a disminuir conforme aumenta la frecuencia de recogida en los diferentes intervalos de extracción, como podemos apreciar en las diferentes columnas.

Tabla 4. Concentración de los EZP's (millones EZP's/mL) ovinos sometidos a diferente frecuencia e intervalos de eyaculación.

Ritmo de extracción			
Orden de recogida	C/2 días	C/4 días	C/8 días
1^{ro} Eyaculado	5004.05 ± 1128 ^a	3829.84 ± 1364 ^b	4265.86 ± 1484 ^c
2^{do} Eyaculado	4740.66 ± 1209 ^a	3800.58 ± 1697 ^b	4024.15 ± 1595 ^c

Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

C/2 días: Intensivo, **C/4** días: Semi-intensivo, **C/8** días: Extensivo.

La longitud de la cabeza espermática se muestra en la Tabla 5, en la cual se observa que no existen diferencias ($P > 0.05$) para el ritmo de extracción y el orden de recogida. Por lo tanto, la frecuencia e intervalo de recogida no afectó la longitud de cabeza espermática de los diferentes eyaculados.

Tabla 5. Longitud de cabeza (μm) de los EZP's ovinos sometidos a diferentes frecuencias e intervalos de eyaculación.

Ritmo de extracción			
Orden de recogida	C/2 días	C/4 días	C/8 días
1^{ro} Eyaculado	1.99 ± 0.07	1.90 ± 0.03	1.85 ± 0.05
2^{do} Eyaculado	2.01 ± 0.08	1.92 ± 0.03	1.86 ± 0.08

C/2 días: Intensivo, **C/4** días: Semi-intensivo, **C/8** días: Extensivo.

Los datos de anchura de la cabeza espermática en los distintos eyaculados se observan en la Tabla 6. La anchura espermática fue afectada por el ritmo de extracción seminal. Conforme aumenta el número de extracciones la anchura espermática disminuye.

El intervalo de extracción intensivo presenta diferencias ($P < 0.05$) significativa con respecto a los ritmos de extracción semi-intensivo y extensivo.

Tabla 6. Ancho de cabeza (μm) de los EZP's ovinos sometidos a diferentes frecuencias e intervalos de eyaculación.

Orden de recogida	Ritmo de extracción		
	C/2 días	C/4 días	C/8 días
1^{ro} Eyaculado	1.23 \pm 0.04 ^a	1.13 \pm 0.02 ^b	1.12 \pm 0.02 ^c
2^{do} Eyaculado	1.21 \pm 0.06 ^a	1.15 \pm 0.06 ^b	1.14 \pm 0.05 ^c

Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

C/2 días: Intensivo, **C/4** días: Semi-intensivo, **C/8** días: Extensivo.

El perímetro de la cabeza espermática se muestra en la Tabla 7, en la cual se observa que los ritmos de extracción de los eyaculados presentaron diferencia significativa ($P < 0.05$) conforme aumenta el ritmo de extracciones seminales, siendo el ritmo intensivo el de mayor perímetro de cabeza espermática, seguido del ritmo semi-intensivo y extensivo. Respecto al orden de recogida, este parámetro no mostró diferencia significativa el eyaculado 1^{ro} en comparación con el 2^{do}.

Tabla 7. Perímetro (μm) de los EZP's ovinos sometidos a diferentes frecuencias e intervalos de eyaculación.

Orden de recogida	Ritmo de extracción		
	C/2 días	C/4 días	C/8 días
1^{ro} Eyaculado	5.42 \pm 0.20 ^a	5.12 \pm 0.09 ^b	5.05 \pm 0.16 ^c
2^{do} Eyaculado	5.49 \pm 0.22 ^a	5.21 \pm 0.15 ^b	5.08 \pm 0.23 ^c

Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

C/2 días: Intensivo, **C/4** días: Semi-intensivo, **C/8** días: Extensivo.

Los valores del área de la cabeza espermática se reportan en la Tabla 8, los ritmos de extracción presentan diferencias significativas ($P < 0.05$); el intervalo intensivo presentó mayor área de cabeza ($P < 0.05$) para el primero y segundo eyaculado, en comparación con el semi-intensivo y extensivo. En cuanto a la orden de recogida, esta variable no presentó diferencia significativa ($P > 0.05$).

Tabla 8. Área (μm^2) de los EZP's ovinos sometidos a diferentes frecuencias e intervalos de eyaculación.

Orden de recogida	Ritmo de extracción		
	C/2 días	C/4 días	C/8 días
1^{ro} Eyaculado	2.05 \pm 0.12 ^a	1.84 \pm 0.06 ^b	1.81 \pm 0.09 ^c
2^{do} Eyaculado	2.08 \pm 0.16 ^a	1.90 \pm 0.13 ^b	1.84 \pm 0.16 ^c

Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

C/2 días: Intensivo, **C/4** días: Semi-intensivo, **C/8** días: Extensivo.

Los datos del porcentaje de fragmentación de ADN en los diferentes eyaculados se muestran en la Tabla 9, se observa que el ritmo de extracción afectó dicho parámetro. Siendo el intervalo semi-intensivo el que menor ($P < 0.05$) porcentaje de fragmentación de ADN presentó, en comparación con el intervalo intensivo y extensivo, respectivamente.

El orden de recogida no presenta diferencia significativa ($P > 0.05$) en el porcentaje de fragmentación de ADN.

Tabla 9. Porcentaje de fragmentación del ADN de los EZP's ovinos sometidos a diferentes frecuencias e intervalos de eyaculación.

Orden de recogida	Ritmo de extracción		
	C/2 días	C/4 días	C/8 días
1^{ro} Eyaculado	14.87 ± 14.59 ^a	1.97 ± 1.41 ^b	14.15 ± 19.37 ^c
2^{do} Eyaculado	8.05 ± 13.11 ^a	3.61 ± 7.00 ^b	14.18 ± 26.41 ^c

Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$)

C/2 días: Intensivo, **C/4** días: Semintensivo, **C/8** días: Extensivo.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Volumen

El volumen promedio de los eyaculados se encuentra dentro de los rangos descritos para ovinos de pelo 0.5 y 2 mL propuesto por Balcázar y Porras (2009). En cuanto a la frecuencia de eyaculación los resultados del volumen de este estudio difieren a lo reportado por Bravo y Roy (2015) quienes reportaron un volumen promedio de 1.22 mL para el 1° eyaculado y 1.16 mL para el 2° eyaculado en sementales de raza Ile de France, el volumen promedio para el 1^{ro} eyaculado fue de 0.84 mL y de 0.81 mL para el 2^{do} eyaculado. A pesar de no mostrar diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de eyaculación, se observa que en ambos estudios dicho factor influyó sobre el volumen disminuyendo con el salto, esto podría deberse a que las sucesivas eyaculaciones pueden alterar el volumen del eyaculado. Esto coincide con Scholaut, (1985), quién reportó un volumen de 0.90 mL para el 1^{ro} eyaculado y 0.75 mL en el 2^{do}, respectivamente y de igual manera sugiere que la frecuencia de eyaculación reduce el volumen de los eyaculados.

A pesar de no mostrar diferencia significativa para el parámetro de volumen, existe una diferencia numérica, disminuyendo los valores del volumen conforme aumenta la frecuencia de eyaculación, pero es un proceso esperado debido al agotamiento del reservorio epididimal. Lo reportado se ha observado de forma similar en otras razas ovinas (Ibrahim, 1997; Snowden *et al.*, 2004).

En un trabajo realizado en conejos Bodnár *et al.* (1996), informan que el volumen promedio/eyaculado es significativamente mayor en el ritmo extensivo (0.79 mL) en comparación con el intensivo (0.54), en el presente estudio se observa que el ritmo de extracción que presentó mayor volumen fue el semintensivo (0.86 mL) a diferencia del extensivo (0.80 mL) e intensivo (0.82).

En cuanto al orden de recogida no se encontraron diferencias significativas en el 1^{ro} y 2^{do} eyaculado, a pesar de esto se observa un mayor volumen durante el 1^{ro} eyaculado (0.90 mL) en comparación con el 2^{do} (0.75 mL). Resultados similares a este estudio fueron obtenidos por Carvajal *et al.* (2018), quienes al comparar el volumen del 1^{ro} y 2^{do} eyaculado de tres razas ovinas de lana, en condiciones de trópico alto colombiano disminuyó de forma significativa entre el 1^{ro} (1.24 mL) y 2^{do} (0.99 mL) eyaculado, respectivamente. Resultados similares a lo reportado por otros autores en ovinos (Yotov, *et al.*, 2011; Ollero *et al.*, 1996; Nel-Themaat *et al.*, 2006).

7.2 Motilidad

La motilidad es el parámetro microscópico más estudiado y al que mayor importancia se presta durante las evaluaciones de calidad seminal en ovinos (Guillén, 2001). Los valores obtenidos de motilidad en este trabajo presentan diferencia significativa, el 1^{ro} eyaculado presenta un mayor porcentaje de motilidad, independientemente del ritmo de extracción (77.30 %, motilidad promedio de los 3 ritmos de extracción) en comparación con el 2^{do} eyaculado (71.23 %, motilidad promedio de los 3 ritmos de extracción), datos que difieren a los reportados por Carvajal *et al.* (2018), a pesar de

haber presentado valores similares a los de este estudio; (76.96 %) para el 1^{ro} eyaculado contra (75.38 %) del 2^{do} eyaculado no tuvo cambios significativos ($P>0.05$) entre eyaculados, el comportamiento de la motilidad se relacione con un sistema de adaptación a las condiciones del medio en el que se llevó cabo el estudio.

Nel-Themaat *et al.* (2006) observaron que el 2^{do} eyaculado (63.83 %) presentó mayor motilidad comparado con el 1^{ro} (56.80 %), los cuales fueron colectados con un intervalo inferior a 10 min en ovinos nativos del Golfo, la diferencia de estos resultados y el bajo porcentaje de motilidad con respecto al presente estudio, podría deberse al método de extracción seminal utilizado en los diferentes estudios, ya que los valores de motilidad presentan los valores más altos para los EZP's obtenidos a través de VA que los obtenidos por EE.

Los resultados mostrados para el parámetro de motilidad difieren a lo reportado por Bravo y Roy (2015) al evaluar características seminales de sementales de raza Ile de France según el eyaculado, encontrando que los caracteres cualitativos de motilidad registraron una tendencia al alza en los 2^{do} eyaculados (83.33 %) en comparación con el 1^{ro} (80.27 %) con diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$). Por el contrario, dichos resultados contradicen los obtenidos por Jennings y McWeeney (1976), en sementales de raza Suffolk quienes concluyen que la motilidad no se ve afectada por la frecuencia de colección seminal.

En el presente estudio se puede apreciar que el ritmo intensivo presenta una menor motilidad (67.40 %) en el 2^{do} eyaculado en comparación con el extensivo (72.35 %) y

semi-intensivo (73.95 %), respectivamente, esto podría deberse a que los elevados ritmos de extracción de semen aceleran el recorrido epididimario del espermatozoide, la maduración espermática no se completa y como resultado la motilidad del semen disminuye Bonet *et al.* (1993). Como se puede apreciar en este trabajo, a pesar de no mostrar diferencia significativa, el ritmo intensivo presenta una motilidad menor (67.40 %) en el 2^{do} eyaculado en comparación con el extensivo (72.35 %) y semi-intensivo (73.95 %), respectivamente, contrario a esto Bencheikh, (1995) encontró diferencias significativas a favor del ritmo extensivo.

7.3 Concentración espermática

A pesar de no encontrarse diferencia significativa entre el 1^{ro} (4366×10^6 EZP's/mL, y 2^{do} eyaculado (4188.44×10^6 EZP's/mL) en el orden de recogida, los resultados del presente estudio son similares a los obtenidos por Ollero *et al.* (1996) en sementales de raza Aragonesa, en el cual se observaron que la concentración espermática se vio influenciada por el orden de recogida, disminuyendo con el salto, este proceso podría ser el resultado de la eyaculación consecutiva, en relación con la función del reservorio espermático, con posible efecto racial como lo describen Stellflug y Berardinelli (2002).

Los diferentes ritmos de extracción mostraron diferencia significativa en la concentración espermática de los diferentes eyaculados, pues disminuyó significativamente cuando el periodo de abstinencia incrementó (5004.05×10^6 EZP's/mL para el ritmo intensivo y 4265.86×10^6 EZP's/mL para el extensivo). Estos resultados difieren a lo observados por Ollero *et al.* (1996), a pesar de encontrar

diferencias significativas, reportó que la concentración espermática incrementó significativamente cuando el periodo de abstinencia aumentó (2820.00×10^6 EZP's/mL para el ritmo intensivo y 3210.00×10^6 para el extensivo) .

7.4 Parámetros morfométricos

Los parámetros morfométricos de la cabeza del EZP's; longitud ($1.91 \mu\text{m}$), anchura ($1.16 \mu\text{m}$), perímetro ($5.19 \mu\text{m}$) y área ($1.9 \mu\text{m}$), observados en el presente estudio, son relativamente inferiores a lo reportado por Maroto *et al.* (2010), Choquepuma *et al.* (2017); longitud ($8.52\mu\text{m}$), anchura ($4.64\mu\text{m}$), perímetro ($24.34 \mu\text{m}$) y área ($32.11\mu\text{m}$), esta diferencia podría deberse a las condiciones de nuestro estudio, entre las cuales destacan los diferentes ritmos de extracción y orden de recogida, así como también la época de recolección seminal, lo cual concuerda con lo observado por Bravo (2010), éste último señala que existen diferencias en los tamaños de las cabezas, mostrando un comportamiento estacional con valores más elevados en otoño y a principios de invierno en el hemisferio norte. Martí *et al.* (2011) evaluaron los cambios en la morfometría de la cabeza del espermatozoide de ovinos que fueron criopreservados en relación con la edad de madurez sexual, encontraron al evaluar el efecto de la congelación en los parámetros morfométricos de los EZP's del ovino que éstos son mayores en animales jóvenes. Los valores son inferiores a los reportados por Maroto *et al.* (2010) y Bravo (2010).

7.5 Fragmentación de ADN

En el presente trabajo se muestra evidencia que el orden de recogida de los eyaculados no muestra diferencia significativa en el porcentaje de fragmentación de ADN, estos resultados son similares a los de Bravo *et al.* (1997) al evaluar el efecto de la frecuencia de recolección sobre las características seminales en alpacas observaron que no hubo efecto significativo sobre el porcentaje de ADN fragmentado.

A pesar de que no se encontró diferencia significativa en el porcentaje de la fragmentación de ADN con respecto a la frecuencia de eyaculación, es importante resaltar que en el 2^{do} eyaculado con un ritmo de extracción intensivo (14.87 %) existe una disminución del porcentaje de fragmentación de ADN (8.05 %), estos resultados concuerdan con los reportados por Gosalvéz *et al.* (2011), quien indistintamente del ritmo de extracción observó en el semen humano niveles iniciales bajos de fragmentación de ADN después de periodos cortos de abstinencia entre las eyaculaciones. La disminución de la fragmentación del ADN espermático podría deberse al estrés oxidativo en el epidídimo, cuanto más prolongado sea el tiempo de almacenamiento en el epidídimo, mayor será el aumento de la fragmentación del ADN. De igual manera, Aitken y Krausz (2001) indicaron que el daño al ADN de los EZP's es producido después de la espermiación, durante la co-migración de EZP's maduros e inmaduros, desde los túbulos seminíferos al epidídimo, ya que los EZP's inmaduros producen elevados niveles de sustancias reactivas al oxígeno, las cuales inducen fragmentación de ADN a nivel del epidídimo, ya sea actuando de forma directa sobre

el ADN o indirectamente, mediante la activación de endonucleasas y caspasas espermáticas.

VIII. CONCLUSIÓN

Independientemente de los ritmos de extracción, en los parámetros de volumen, motilidad y concentración espermática no se observaron diferencias significativas entre el 1^{ro} y 2^{do} eyaculado.

Los parámetros morfométricos (longitud, perímetro y anchura) se vieron influenciados por los diferentes ritmos de extracción, observándose un valor mayor en el 2^{do} eyaculado.

La morfometría espermática analizada mediante el CASA es capaz de determinar la influencia que ejercen los ritmos de extracción en los diferentes eyaculados.

El ritmo de extracción semi-intensivo es el que presentó menor porcentaje de fragmentación de ADN, con respecto a los otros intervalos de extracción, lo que representa un efecto significativo del ritmo de extracción, en el que el ritmo semi-intensivo es el más idóneo en cuanto a porcentaje de fragmentación se refiere.

IX. LITERATURA CITADA

- Aitken, R. J & Krausz, C. (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome *Reprod.* 122: 497-506.
- Amann, R. P. (1987). Function of the epididymis in bulls and rams. *J Reprod Fertil Suppl.* 34:115.
- Balcázar, J. A. S. & Porras, A. I. A. (2009). *Manual de Prácticas en Manejo Reproductivo de Ovinos y Caprinos.* Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de reproducción. Págs. 53-58.
- Baldwin, B. A. & Meese, G. B. (1997). The ability of sheep to distinguish between conspecifics by means of olfaction. *Anim. Behav. Sci.* 18: 803-808.
- Battaglini, M., Castellini, C. & Lattaioli, P. (1992). Variability of the main characteristics of rabbit semen, *J. Appl. Rabbit Res.* 15. 439-446.
- Bencheikh, N. (1995). Effect de la fréquence de collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme et des spermatozoïdes récoltés chez la lapin, *Annales Zootechnie*, 44: 263-279.

- Bland, K. P. & Jubilan, B. M. (1987). Correlation of flehmen by male sheep with female behaviour and oestrus. *Anim. Behav.* 35: 735-738.
- Blissitt, M. J., Bland, K. P. & Cottell, D. F. (1990). Discrimination between the odours of fresh oestrous and non-oestrous ewe urine by rams. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 25: 51-59.
- Blissitt, M. J., Bland, K. P. & Cottell, D. F. (1994). Detection of oestrous-related odour in ewe urine by rams. *J. Reprod. Fertil.* 101: 189-191.
- Bodnár, K., Török, L., Hejel, P. & Bodnár, E. (1996). Preliminary study on the effect of ejaculation frequency on some characteristics of rabbit semen, 6th World Rabbit Congress, 2:41-44.
- Bonet, S., Briz, M. & Fradera, A. (1993). Estudio comparativo entre la morfología espermática del eyaculado de verracos sometidos a extracciones de semen cada 2 días y la morfología del esperma procedente de las 3 regiones epididimarias. *Rev. Asoc. Nac. Porcinocult. Cient.* 124:30-38.
- Bravo, D. J. A. (2010). Estudio de la influencia de la estación sobre los parámetros seminales y morfométricos del espermatozoide de morueco de raza Ile de France. Tesis Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura. Cáceres. España.

- Bravo, P.W., Flore, D. & Ordóñez, C. (1997). Effect of repeated collection on semen characteristics of alpacas. *Biol. Reprod.* 57(3): 520-524.
- Bravo, J.A. & Roy, T.J. (2015) Características seminales de moruecos de raza Ile de France según el eyaculado. Unidad de Reproducción y Obstetricia. Facultad de Veterinaria. UEX, España.
- Bunaciu, P., Cimpeau, I. & Bunaciu, M. (1996). Mating frequency effect on spermatogenesis and performance of breeding rabbits, 6th World Rabbit Congress. 2:51-54.
- Cameron, A.W.N., Fairnie, I.J., curnow, D.M. & Lindsay, D.R. (1984). The effect of frequency of semen collection and testicular size on the output of spermatozoa by rams. 10th I.C.A.R. 267-269.
- Carvajal, S. M., Cortés, L. H. A., Manríquez, P. C. & Grajales, H. A. (2018). Evaluación de los parámetros de calidad seminal y cinemática espermática en tres razas ovinas de lana en condiciones de Trópico Alto Colombiano. *Rev. Med. Vet.* 18: 49-61.
- Choquepuma W., Ordoñez C., Quispe H. & Cucho H. (2017). Efecto de la congelación en los parámetros morfométricos del espermatozoide carnero. *Asociación Peruana de Reprod Animal. Spermova.* 7(1): 48. 52.

Colas, G. (1980). Variations Saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile de France. 1 etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. *Reprod. Nutric Déveleo.*, 20 (6). 1789-1799.

Colas, G. (1984). Semen Technology iii the ram. *Ihe male in farn Animal Reproduction* Ed. M. Courot. 219-236.

Colas, G., Guerin, Y., Clanet, V. & Solari A. (1985). Influence de la durée d'éclairément sur la production et la fecondance des spermatozoides diez le bélier adulte Ile de France. *Reorod. Nutr. Déveleo.*

Cole, H.H. & Cupps, P. T. (1984). *Reproducción de los Animales Domésticos*. Ed Acribia. Zaragoza. 551.

Ducci, M., Gazzano, A., Sighieri, C., Rossi, P., Frateschi, T. L. & Martelli, F. (1993). Valutazioni morfologica degli spermatozoi di coniglio *Annali della facolta di Medicina Veterinaria di Pisa*. 46: 227-237.

Evans, G. y Maxwell, W.M.C. (1990). *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. Zaragoza: ACRIBIA, 1990. ISBN: 84-200-0675-0.

Everett, R. W. & Bean, B. Environmental influences on semen output. *En: J of Dairy Sci*. Vol. 65 (1982):1303 -1310.

Fiser, P.S. & Fairfull, R. (1986). The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on survival of spermatozoa before *mi* after freezing. *Crvobiolo2v*. 23:518-524.

Fraser, A. F. & Broom, D.M. (1998). Domestic animal behaviour and welfare. 3rd Edition. CAB International, N.Y. 437.

Gadea, J. (2001). La evaluación de la capacidad fecundante de los EZP's porcinos mediante la fecundación in vitro (Revisión). *Producción y Sanidad Animales*, 16(1): 63-77.

Ghaffar, A.E., Azab, A.I. & Dawy, K.H. (1994). Rabbit semen metabolism, *Cahiers Options méditerranéennes*. 8:305-312.

Gosalvez, J., Gonzalez, M.M., Lopez F.C., Fernandez, J. L. & Sanchez M. P. (2011). Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Departamento de Biología, Unidad de Genética, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid; Vol. 96, No.5.*

Guillén, H. (2001). Evaluación de las características seminales en carneros Blackbelly (tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.

Hafez, E. (1989). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Nueva Editorial Interamericana. México. 694.

Hafez, E.S.E. & Hafez, B. (2004). Reproducción e inseminación artificial en animales.

México: McGraw-Hill Inteamericana, 2004. ISBN: 0-683-30577-8.

Hidalgo, C.O., Tamargo, C. & Díez, C. (2005). Análisis del semen bovino. Tecnología

Agroalimentaria. Boletín Informativo del SERIDA, 2(2) :39-43.

Hintz, H., Legates, J., Loosli, J., Maynard, L., Sorenses, A., Warner, R. & Warwick, E.

(1987). *Ganadería*: Guía para la reproducción, nutrición. cría y mejora del ganado. Primera. México: McGraw-Hill, 1987. pág. 286. Vol. I. ISBN: 968-422-268-8.

Ibarra, D., Laborde, D. & Van, L. (2000). Repeatability and relationship with field mating

performance of a serving capacity pen test in rams. Small rumin. Res. (17): 165-169.

Ibrahim, S. A. (1997). Seasonal variation in semen quality of local crossbred rams

raised in the United Arab Emirates. Anim. Reprod. SSci. 49:161-167.

Illera, M. (1994). Reproducción de los animales domésticos. Madrid: AEDOS, 1994.

ISBN: 84-7003-339-5.

Jennings, J.J. & Mcweeney, J. (1976). Effect of frequent ejaculation on semen

characteristics in rams. Vet. Rec., 98(12): 230-233

Kathiravan, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K. & Kadirvel, G. (2011). Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system-A Review. *Reprod in Domestic Anim.* 46(1): 165-172.

Latorre, E. & Sales, F. (2000). *Retajos en Producción Ovina.* ISSN: 0717-4829.

Lezama, V., Orihuela, A. & Angulo, R. (2001). Sexual behavior and semen characteristics of rams exposed to their own semen or semen from a different ram on the vulva of the ewe. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 75:55-60.

Lincoln, G. A., Lincoln, C. E. & MacNeilly, A. S. (1990). Seasonal cycles in the plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in ram of wild, feral and domesticated breeds of sheep. *J. Reprod. Fertil.* 88: 623-633.

Lindsay, D. R. (1964). The importance of olfactory stimuli in the mating behaviour of the ram. *Anim. Behav.* 13:75-78.

Lindsay, D. R. & Pearce, D. T. (1984). Ram mating preferences. *J. Exp. Agric.* 15: 545-548.

López, J., Alvariño, J. M. R., del Arco, J. A., Bueno, A. & Sanz, C. (1996). Effect of male rabbit management on semen production, 6th Worth Rbbit Congress, 2: 83-86.

López, A., Regueiro, M., Castrillejos, A. & Pérez, R. (2011). Morfología espermática en carneros: efectos del plano nutricional y de la época del año.

Maina, D. & Katz, L. S. (1997). Exposure to a recently mated increases ram sexual performance. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 51: 69-74.

Maroto, M.A., Ramón, M., Garcia, A.O., Soler, A. J., Esteso, M.C., Martinez, P.F., Pèrez, G.M.D. & Garde, J.J. (2010). Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm- Class Analyzer. *Theriogenology* 73: 437-448.

Martí, J., Aparicio, I. & García, H.M. (2011). Head morphometric changes in cryopreseved ram spermatozoa are related to sexual maturity. *Theriogenology*. 75(3):473-481.

McGrath, P. E., Boland, M. P. & Gordon, I. (1976). Effect of sexual preparation procedures on semen characteristics in the ram. *J. Agric. Sci.* 93: 761-763.

Melling, M & Alder, M. (2000). *Práctica ovina y caprina*. Buenos Aires.: Intermédica, 2000. ISBN: 950-555-230-0.

Méndez, G., Jaramillo, G., Aragón, A., Ayala, M. E. & Domínguez, I. (2009). Función reproductiva de sementales ovinos importados de Nueva Zelanda durante su primera época reproductiva en México. *Vet. Méx.*, 40 (2): 123 -131.

Mickelsen, W. D., Paisly, L. G. & Dahmen, J. J. (1982). Seasonal variation in scrotal circumference, sperm quality, and sexual ability in rams. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181: 376-380.

Muñoz, C. (2001). *Curso Avances en producción ovina*. 2001. ISSN: 0717-4810.

Nel-Themaat, L., Harding, G. D., Chandler, J.E., Chenevert J. F., Damiani, P. & Fernandez, J. M. (2006). Quality and freezing qualities of first and second ejaculates collected from endangered Gulf Coast Native rams. *Anim Reprod Sci.* 95 (3-4):251-61.

Nishimura, K., Utsumi, K., Okano, T. & Iritani, A. (1991). Separation of mounting-inducing pheromones of vaginal mucus from estrual heifers. *J. Anim. Sci.* 69: 3343-3347.

Ollero, M., Blanco, T., Pérez, M. J. & Pérez, J. A. (1996). Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *Inter. J. Androl.* 19: 287-292.

Paleologou, A. M. (1997). Detecting estrus in cows by a method based on bovine sex pheromones. *Vet. Rec.* 100: 319-320.

Pepelko, E. W. & Clegg, T. (1965). Studies of mating behaviour and some factors influencing the sexual response in the male sheep (*Ovis aries*) Anim. Behav. 13:249-257.

Prado, V., Orihuela, A., Lozano, S. & Pérez, I. (2003). Effect on ejaculatory performance and semen parameters of sexually-satiated male goats (*Capra hircus*) after changing the stimulus female. Theriogenology. p. 261- 267.

Price, E. O., Estep, D. Q., Wallach, S. J. R. & Dally, M. R. (1991). Sexual performance of rams as determined by maturation and sexual experience. J. Anim. Sci. 69: 1047-1052.

Price, E. O., Erhard, H., Borgwardt, R. & Dally, M. R. (1992). Measures of libido and their relation to serving capacity in the ram. J. Anim. Sci. 70: 3376-3380.

Rekwot, P. I., Ogwu, D., Oyedipe, E. O. & Sekoni, V. O. (2001). The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. Anim. Reprod. Sci. 65: 157-170.

Rivera, R. M. & Trujillo, A. L. E. (1990). Evaluación de algunas características del eyaculado en toros Holstein. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. Vol. 43, N°1 y 2.: 3-27.

Rodríguez, R. M. I., Ciccio, N. H., Irazoqui, H., & Rodríguez, B. T. (1991). Importance of behavioural stimuli in ram-induced ovulation in seasonally anovular Corriedale ewes. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 30: 323-332.

Rosa, H. J. D., Juniper, D. T. & Bryant, M. J. (2000). The effect of exposure to oestrous ewes on rams' sexual behaviour, plasma testosterone concentration and ability to stimulate ovulation in seasonally anoestrous ewes. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 67: 293-305.

Schlolaut, W. (1985). *Compendium of rabbit production*. Eschborn. Germany. 119-120.

Signoret, J. P. (1975). Influence of sexual receptivity of teaser ewe on the mating preference in the ram. *Appl. Anim. Ethol.* 1: 229-232.

Signoret, J. P. (1991). Sexual pheromones in the domestic sheep: importance and limits in the regulation of reproductive physiology. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 39: 639-645.

Simplicio, A. A., Riera, G. S., Nelson, E. A. & Pant, K. P. (1982). Seasonal variation in seminal and testicular characteristics of Brazilian Somali rams in the hot semi-arid climate of tropical northeast Brazil. *J. Reprod. Fertil.* 66:735-738.

Snowder, G. D., Stellflug, J. N. & Van Vleck, L. D. (2004). Genetic correlation of ram sexual performance with ewe reproductive traits of four sheep breeds. *App. Anim. Behav Sci.* 88: 253-261.

Sohail, A., Andrabi, S. M. H., Anwar, M., Ali, L. & Mehmood, A. (2013). Assessment of Buffalo Bull Semen Quality Based on Sperm Motility Parameters, Motion Characteristics and In Vitro Fertilization Rate. *Pakistan Veterinary J.*, 33(1):53

Stellflug, J. N. & Berardinelli, J. G. (2002). Ram selection for reproductive Rate in ram-bouillet ewes. *J Anim Sci.* 80 (10): 2588-93.

Sutovsky, P. & Manandhar, G. (2006). Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. En: De Jonge C. and Barrat C. *the sperm Cell.* Cambriadge, UK: Cambridge Univesity Press. 1-30.

Taylor, J. F. (1985). Genetic and environmental components of semen production traits of artificial insemination Holstein bulls. En: *Journal of Dairy Science.* Vol. 68: p. 2703-2722.

Tilbrook, A. J. & Lindsay, D. R. (1987). Differences in the sexual "attractiveness" of oestrous ewes to rams. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 17: 129-138.

- Vázquez, R. & Orihuela, A. (2001). Effect of vaginal mucus and urine from ewes in estrus on plasma testosterone levels and weight gain of feedlot rams. *Small Rumin. Res.* 42:173-177.
- Vera, N. M. (2009). Caracterización de la función sexual de carneros de la raza highlander y suffolk. [Citado el: 15 de marzo del 2018] Tesis. http://www.bibliodigital.udec.cl/sdx/UDEC4/tesis/2009/vera_n/doc/vera_n.pdf
- Vijil, M. E. (1986). La Inseminación Artificial ovina: una técnica a potenciar. ONTE “Especial ovino”, Ed. 2.:61-68.
- Yotov, S., Fasulkov. I. & Vassilev, N. (2011). Effect of ejaculation frequency on spermatozoa survival in diluted semen from Pleven Blackhead rams. *Turkish J Vet Anim Sci.*;35(2):117-22.
- Zenchak, J. J. & Anderson, G. C. (1980). Sexual performance levels of rams (*Ovis aries*) as affected by social experiences during rearing. *J. Anim. Sci.* 1:167-174.
- Zenchak, J. J., Anderson, G.C. & Schein, M. W. (1981). Sexual partner preference of adult rams (*Ovis aries*) as affected by social experiences during rearing. *Appl. Anim. Ethol.* 7: 157-167.
- Zuriñe, A (2001) Efecto del ritmo de recogida sobre la calidad, capacidad de conservación y producción seminal de machos jóvenes.1-26.