

VARIACIONES ESTACIONALES DE CARACTERÍSTICAS
SEMINALES, CIRCUNFERENCIA ESCROTAL Y
COMPORTAMIENTO SEXUAL EN CARNEROS
PAMPINTA Y CORRIEDALE

Domingo Emilio Aguilar

Trabajo de tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al
Grado de MAGISTER SCIENTIAE EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Unidad Integrada Balcarce

(Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología
Agropecuaria – Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata)

Balcarce, Argentina

Diciembre de 2009

VARIACIONES ESTACIONALES DE CARACTERÍSTICAS
SEMINALES, CIRCUNFERENCIA ESCROTAL Y
COMPORTAMIENTO SEXUAL EN CARNEROS
PAMPINTA Y CORRIEDALE

Domingo Emilio Aguilar

Comité Consejero

M. V. Juan Florencio Aller Atucha, M. Sci.
Director de Tesis

M. V. Ricardo Alberio, Dr.
Asesor

M. V. Federico Hozbor, Dr.
Asesor

M. V. Guillermo Almeida
Asesor

VARIACIONES ESTACIONALES DE CARACTERÍSTICAS
SEMINALES, CIRCUNFERENCIA ESCROTAL Y
COMPORTAMIENTO SEXUAL EN CARNEROS
PAMPINTA Y CORRIEDALE

Domingo Emilio Aguilar

Aprobada por

M. V. Juan Florencio Aller Atucha, M. Sci.

Director de Tesis

M. V. Jorge Cabodevila, Dr.

Evaluador Externo

DEDICATORIA

A mi esposa Mariana, a mis hijas María Elena, Andrea, Manuela y Mercedes por el apoyo y acompañamiento brindado durante el desarrollo de la tesis y en especial a mis padres por el esfuerzo realizado para que nosotros podamos obtener este logro.

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a Juan por su acompañamiento, paciencia, dedicación puesto en el desarrollo de la Tesis y en la corrección de la misma, a Memo por la colaboración especial brindada en la interpretación de las anomalías, las enseñanzas y sugerencias en la corrección de los borradores, a Federico y Eduardo por su amistad y el tiempo compartido en el laboratorio, a Ricardo por su apoyo en la sustanciación de la tarea.

A Natividad Ferreira, por el apoyo en la preparación del material de laboratorio; a Carlos Lobato y Pablo Burges por la colaboración en la toma de muestras y cuidado de los animales.

A los compañeros del posgrado Paula Domínguez, Tomás Vera y Jorgelina Manes por su colaboración desinteresada, compañerismo, apoyo y contención.

A Germán Kaiser y Nicolás Mucci por su acompañamiento y buen humor, en todos los momentos de trabajo y sociales (asados) compartidos.

Al Dr. Campero por habernos permitido utilizar el microscopio de fluorescencia, en coordinación con Kiki y Dorita, a quienes agradezco especialmente.

A Adriana Cano y Claudia Faverin por el aporte en materia de análisis estadístico de la información y por las sugerencias de mirar los datos desde otra perspectiva.

A Marita Cocimano por su amistad y diligencia para apoyarnos en los trámites especialmente a la distancia.

Un agradecimiento especial a todos los compañeros del Chinchorro por todos los buenos momentos compartidos y a los profesores por la enseñanza brindada.

Finalmente quiero agradecer al INTA por haberme permitido realizar esta capacitación.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Actividad ovina en la Argentina	1
1.2. Raza Corriedale	2
1.3. Raza Frisona	2
1.4. Raza Pampinta	2
1.5. Variaciones estacionales	3
1.6. Características reproductivas del ovino macho	3
1.7. Evaluación de semen recién obtenido	3
1.8. Congelación del semen	4
1.9. Evaluación del semen congelado-descongelado	4
1.10. Objetivo general	4
1.11. Objetivos específicos	5
1.12. Hipótesis	5
2. Revisión bibliográfica	6
2.1. La actividad ovina en la Argentina	6
2.2. La raza Corriedale	6
2.3. La raza Frisona	7
2.4. La raza Pampinta	9
2.5. Características reproductivas del ovino macho	10
2.6. Estado nutricional	15
2.7. Circunferencia escrotal o testicular	15
2.8. Comportamiento sexual del macho	16
2.9. Testosterona en sangre	16
2.10. Fisiología reproductiva del carnero	17
2.11. Recolección de semen	27
2.12. Evaluación de semen recién obtenido	29
2.13. Congelación de semen	34
2.14. Evaluación del semen congelado	41
2.15. Cinética espermática	46

3. Materiales y métodos	51
3.1. Lugar de trabajo	51
3.2. Época del año	51
3.3. Datos meteorológicos y ambientales	51
3.4. Animales	51
3.5. Alimentación	51
3.6. Sanidad y manejo	51
3.7. Mediciones sobre los animales	52
3.8. Obtención y valoración del semen	53
3.9. Congelación del semen	55
3.10. Descongelación y evaluación del semen congelado/descongelado	56
3.11. Evaluación de la cinética espermática	60
3.12. Diseño experimental y análisis estadístico	61
4. Resultados	65
4.1. Datos meteorológicos	65
4.2. Variables estudiadas sobre los animales	66
4.3. Semen colectado y eficiencia	74
4.4. Evaluación del semen descongelado	89
4.5. Evaluación de semen congelado/descongelado por medio de CASA	94
5. Discusión	97
5.1. Medición sobre animales	97
5.2. Variaciones estacionales de los parámetros seminales	100
5.3. Evaluación de semen descongelado	103
5.4. Evaluación de semen congelado-descongelado por CASA	105
6. Conclusiones	109
7. Bibliografía	110
8. Apéndice	129

ÍNDICE DE TABLAS

1. Existencia de ganado ovino en la región pampeana	1
2. Características productivas de la raza Pampinta	2
3. Valores seminales en semen recientemente obtenido	27
4. Principales componentes de los diluyentes para la congelación del semen	36
5. Parámetros de motilidad que se evalúan mediante CASA	49
6. Patrones de viabilidad celular y funcionalidad de mitocondrias	59
7. Variables registradas en la evaluación por CASA	64
8. Temperatura, humedad relativa, evapotranspiración diaria, radiación, horas luz (promedio) y precipitación acumulada por estación	65
9. Variables físicas y testosterona plasmática por estación y raza	67
10. Capacidad de servicio de carneros Corriedale y Pampinta en verano, otoño, invierno y primavera	67
11. Correlaciones entre variables analizadas para carneros Corriedale y pampinta	68
12. Porcentaje de eyaculados aprobados para congelación por estación y raza	74
13. Parámetros seminales de carneros Corriedale y Pampinta por estación y raza	75
14. Correlaciones entre factores por raza	76
15. Anormalidades morfológicas mas frecuentemente observadas	88
16. Características seminales posdescongelación evaluadas <i>de visu</i>	89
17. Características seminales posdescongelación evaluadas por CASA (variables con interacción)	95
18. Características seminales posdescongelación evaluadas por CASA (variables sin interacción)	96

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Estructura química de la melatonina	19
2. Estructura química de la testosterona	20
3. Partes de un espermatozoide	22
4. Estructura de membrana en mosaico	24
5. Esquema de una vagina artificial	28
6. Foto de la cámara de Thoma	32
7. Tinción de eosina nigrosina en espermatozoide de carnero	33
8. Componentes del sistema CASA	48
9. Esquema del procedimiento realizado en la descongelación	57
10. Horas de luz y horas de sol por día en Balcarce	66
11. Peso vivo en carneros Corriedale y Pampinta según estaciones	69
12. Condición corporal en carneros Corriedale y Pampinta según estaciones	70
13. Circunferencia escrotal en carneros Corriedale y Pampinta según estaciones	71
14. Nº de montas de carneros Corriedale y Pampinta en 20 minutos	72
15. Nº de Cópulas completas en 20 minutos	72
16. Concentración de testosterona plasmática de carneros Corriedale y Pampinta	73
17. Evolución anual de la concentración plasmática de testosterona	73
18. Volumen seminal de carneros Corriedale y Pampinta por estaciones	77
19. Volumen seminal por orden de eyaculación por raza y por estaciones	78
20. Motilidad masal seminal de carneros Corriedale y Pampinta por estaciones	78
21. Motilidad masal seminal por orden de eyaculación por raza y por estaciones	79
22. pH seminal de carneros Corriedale y Pampinta por estaciones	79
23. pH seminal por orden de eyaculación por raza y por estaciones	80
24. Concentración de espermatozoides por raza y por estaciones	81
25. Concentración de espermatozoides por orden de eyaculación por raza y por estaciones	81
26. Nº total de espermatozoides por raza y por estaciones	82
27. Nº total de espermatozoides por orden de eyaculación por raza y por estaciones	83
28. Motilidad progresiva (%) de carneros Corriedale y Pampinta por estaciones	83
29. Motilidad progresiva (%) por orden de eyaculación por raza y por estaciones	84
30. Vigor seminal de carneros Corriedale y Pampinta por estaciones	85

31. Vigor seminal por orden de eyaculación por raza y por estaciones	85
32. Espermatozoides vivos (%) de carneros Corriedale y Pampinta por estaciones	86
33. Espermatozoides vivos (%) por orden de eyaculación por raza y por estaciones	86
34. Espermatozoides normales (%) de carneros Corriedale y Pampinta por estaciones	87
35. Espermatozoides normales (%) por orden de eyaculación por raza y por estaciones	88
36. Motilidad progresiva (%) a la hora 0 y 2 de semen congelado/descongelado por raza y estaciones	90
37. Vigor a la hora 0 y 2 de semen congelado/descongelado por raza y estaciones	91
38. Acrosoma intacto (%) de semen congelado/descongelado por raza y estaciones	92
39. HOS+ (%) de semen congelado/descongelado por raza y estaciones	92
40. espermatozoides viables por CFDA/PI de semen congelado/descongelado por raza y estaciones	93
41. Mitocondria funcional por Rh123/PI de semen congelado/descongelado por raza y estaciones	94

RESUMEN

La Estación Experimental del INTA Anguil (La Pampa) dio origen a la raza Pampinta, resultante del cruzamiento de animales de raza Frisona del Este (*Ost-Friesisches Milchschaaf u Ost-Frison*) de origen alemán con aptitud lechera, con animales de raza Corriedale. El plantel resultante ($\frac{3}{4}$ Frisón y $\frac{1}{4}$ Corriedale) fue fijado por endocría y selección y habiendo transcurrido más de veinte años se considera estabilizado. Existen estudios previos sobre las características fisiológicas reproductivas de la hembra a lo largo del año, pero no hay ningún estudio realizado en machos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la estación del año sobre las características seminales, la congelabilidad del semen, la circunferencia escrotal, el comportamiento sexual y los niveles plasmáticos de testosterona en carneros de raza PAMPINTA y compararlos con los de la raza CORRIEDALE. Se utilizaron seis carneros adultos Corriedale y cinco Pampinta. El experimento se realizó entre el 21 de Diciembre de 2005 y el 20 de Diciembre de 2006. El peso vivo, la condición corporal y la circunferencia escrotal fueron evaluados cada quince días. La prueba de comportamiento sexual fue realizada una vez por mes. Muestras de sangre fueron obtenidas cada 15 días para determinación de testosterona plasmática. Dos muestras consecutivas de semen utilizando vagina artificial fueron obtenidas dos veces por semana desde la 4ta. hasta la 9na. semana de cada estación y fueron cuantitativamente evaluadas. Eyaculados que cumplieron con requisitos mínimos prefijados fueron criopreservados en forma de pellets. Posteriormente a la descongelación, se evaluó la motilidad progresiva, el vigor, la sobrevivencia espermática (CFDA-PI), la funcionalidad de las mitocondrias (Rh123-IP), el estado acrosómico (Giemsa) y la actividad bioquímica de la membrana plasmática (HOS_t). La cinética espermática fue evaluada por medio de CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). Se utilizó un diseño completamente aleatorizado y para el análisis de los datos se utilizó el PROC GLM y MIXED del SAS. En la latitud estudiada, en la raza Pampinta, se obtuvieron los mayores registros en circunferencia escrotal y en algunos parámetros seminales (concentración espermática y número total de espermatozoides) previo a la congelación durante las estaciones de verano y otoño. En ambas razas, el primer eyaculado presentó mayor volumen, concentración espermática y número total de espermatozoides. En cambio, en el segundo eyaculado se observaron los mayores valores de motilidad masal y porcentaje de espermatozoides vivos. El orden de eyaculación no afectó la motilidad progresiva, el vigor y el porcentaje de espermatozoides normales. La mayor concentración plasmática de testosterona se

registró en verano, seguida del otoño y valores basales en invierno y primavera. Utilizando técnicas visuales, en ambas razas los mejores valores en los parámetros posdescongelación se obtuvieron en verano y otoño; sin embargo, con la técnica de CASA, los mejores valores posdescongelación se registraron en la raza Pampinta, en la “estación reproductiva” (verano y otoño) y en la raza Corriedale, en la “estación no reproductiva” (invierno y primavera).

Palabras clave: semen, circunferencia escrotal, libido, testosterona, carnero Pampinta y Corriedale.

ABSTRACT

Title: “Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference and serving capacity of Pampinta and Corriedale rams”

The Pampinta breed is the result of more than twenty years of work (inbreeding and selection) at INTA’s Experimental Station of Anguil (La Pampa, Argentina). The breed is composed by $\frac{3}{4}$ Ost Frisian (Ost Friesisches Milchschaaf), a German breed well known for its prolific and milking abilities, and $\frac{1}{2}$ Corriedale. The aim of producing those breed was to attain Corriedale’s rusticity without losing Ost Frisian’s good productive traits. Nowadays, Pampinta is a stable breed. Several previous studies were performed to describe physiological reproductive characteristics of the female along the year, however, there is not any study carried out in males. The objective of the present work to evaluate the seasonal variation in semen characteristics, semen freezability, scrotal circumference, serving capacity and plasma testosterone concentrations of Pampinta rams and to compare the results with those obtained in Corriedale rams. This study was conducted from December 2005 to December 2006. The body weight, body condition and scrotal circumference were evaluated at 2-weeks interval. Serving capacity test was carried out every month. Blood samples were taken at 2 weeks interval to determine plasma testosterone concentrations. Two successive samples were taken twice a week from 4th to 9th week of each season using an artificial vagina and were evaluated for viability, motility and morphology. Ejaculates having minimum requirements (previously fixed) were frozen in pellet and postthawing evaluated for progressive motility, vigor, viability (CFDA-PI), mitochondria functionality (Rh123-PI), acrosomal status (Giemsa) and biochemical activity of plasma membrane (HOST). Sperm kinetic was evaluated by means of CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) method. Complete randomized design was used and data were analyzed using PROC GLM and MIXED (SAS). The higher records of scrotal circumference and some parameters of fresh semen (sperm concentration and total number of spermatozoa) were obtained in Pampinta rams during summer and autumn season. The higher volume, sperm concentration and total number of sperm were observed from first ejaculate in both breeds. However, mass motility and percentage of live sperm were observed in second ejaculate. Ejaculation order did not affect progressive motility, vigor and morphology. Plasma testosterone concentrations were highest in summer season and subsequent gradual decrease was observed. After thawing, the higher records were obtained by means of microscopic method during reproductive season (summer

and autumn). In contrast, CASA method demonstrated that the highest values of semen parameters were obtained in non-reproductive season (winter and spring).

Keywords: semen, scrotal circumference, libido, testosterone, Pampinta and Corriedale ram.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Actividad ovina en la Argentina

En las últimas décadas, la existencia de lanares en Argentina presenta una fuerte tendencia decreciente, debido fundamentalmente a la disminución en el precio internacional de la lana y a la falta de aprovechamiento de la carne ovina, a la cual el sector productivo consideró históricamente como un subproducto de la lana.

Según el último Censo Nacional Agropecuario (2002) la existencia de ovinos en nuestro país es de 12.558.904 cabezas de animales, de los cuales, 1.444.825 se encuentran en la provincia de Buenos Aires. La mayor reducción, por cambio de actividad, se produjo en la región pampeana, donde en términos generales la producción ovina ha quedado reducida a majadas denominadas “de consumo” (Tabla 1).

Tabla 1. Existencia de ganado ovino en la región pampeana según la ENA (Encuesta Nacional Agropecuaria, 1993–2001) y Censo Nacional Agropecuario*(2002).

Año	Argentina	Región Pampeana	Provincia de Buenos Aires
1993	18.436.000	4.417.200	3.163.200
1994	16.922.000	3.963.600	2.677.800
1995	15.244.000	3.459.700	2.314.100
1996	14.323.000	3.252.400	2.254.900
1997	13.198.000	2.893.200	1.897.400
1999	13.704.000	2.784.100	1.934.400
2000	13.561.600	2.692.900	1.741.200
2001	-	3.030.100	2.063.300
2002	12.558.904	2.188.545	1.444.825

INDEC, 2004

Como se puede observar en el Tabla 1, en menos de 10 años las existencias de ovinos en la Argentina se redujeron en un 32 %, en la Región Pampeana en un 50% y en la provincia de Buenos Aires en un 55 %.

En los últimos tres años, la actividad ovejera está retomando importancia gracias al impulso del Plan Ovino Nacional (ley N° 25.422). Esto se ha observado en el aumento de las exportaciones de carne y lana y por el empeño que están poniendo los productores para la incorporación de tecnología y por la búsqueda de carneros de razas consideradas magras como Karakul, Texel, Ile de France, Border Leicester y otras.

1.2. Raza Corriedale

Es originaria de Nueva Zelanda en el siglo XIX, por cruzamiento de la raza Merino y Lincoln en igual proporción y fijada por endocría y selección.

En la Argentina es introducida en 1912 y comienza a desarrollarse alcanzando su mayor distribución en la década del '40, afianzándose entre los criadores, llegando al final del siglo XX a ser una de las principales razas en la Argentina.

1.3. Raza Frisona

También denominada Frisona del Este (*Öst-Friesisches Milchschaaf* u *Öst-Frison*) es de origen alemán, específicamente de la región occidental de Frisia, con aptitud lechera y destacada por su prolificidad.

Ingresa a la Argentina en 1960 para utilizarse como raza pura orientada básicamente a la producción de leche para su posterior industrialización, en varias regiones del país, teniendo problemas de adaptación al medio, motivo por el cual los criadores intentaron utilizarla en cruzamientos.

1.4. Raza Pampinta

En la Estación Experimental del INTA Anguil (La Pampa) se desarrolló la raza Pampinta, como producto de más de veinte años de endocría y selección. El origen fue el cruzamiento de animales de la raza Frisona con animales de la raza Corriedale.

El objetivo principal fue incorporar rusticidad a la raza importada, conservando sus aptitudes lecheras y de prolificidad. El genotipo se fijó en ($\frac{3}{4}$ Frisona : $\frac{1}{4}$ Corriedale) y actualmente se considera estabilizado, siendo sus aptitudes lecheras y carniceras permanentemente mejoradas por medio de la selección. Su registro se encuentra abierto en la Sociedad Rural Argentina.

Las características productivas principales de esta raza se pueden observar en el Tabla 2 (Suárez et al., 1998).

Tabla 2. Características productivas de la raza Pampinta

Característica	Valores promedio y rango
Peso vivo del macho (adulto)	95 – 120 Kg
Peso vivo de la hembra (adulto)	68 – 78 Kg
Prolificidad	180%
Partos dobles	71%
Partos triples	11%
Producción de leche (lactancia 8-9 meses)	190-300 lts (X = 1 litro/día) (5,5% proteína)
Edad/peso a la madurez sexual	7-8 meses/ 40 Kg
Peso vellón	4,3 – 5,8 Kg (hembra – macho)
Diámetro de la fibra	33 micras
Rendimiento de la lana	72%

Por otro lado, la aptitud lechera de las ovejas Pampinta las hace aptas para la producción de leche con destino a la elaboración de quesos, interesante alternativa a considerar por su alta rentabilidad.

El correcto manejo reproductivo, al estacionar los servicios en la época más adecuada y permitir organizar otros manejos, como el sanitario o el nutricional, es uno de los principales factores que puede mejorar la productividad de una majada.

1.5. Variaciones estacionales

El conocimiento de la época de servicio más adecuada, conlleva al máximo aprovechamiento de la fertilidad y de la prolificidad de esta raza. Fort *et al.* (1992) estudiaron la influencia estacional sobre la actividad estral y la tasa ovulatoria de ovejas Pampinta y observaron que la mayor actividad reproductiva ocurría durante el otoño, para luego disminuir durante el invierno, hasta no ser detectada a partir de mediados de la primavera.

1.6. Características reproductivas del ovino macho

Hasta el presente, no hay estudios sobre la actividad reproductiva del macho Pampinta, considerando características tales como, producción y calidad de semen, circunferencia escrotal, capacidad reproductiva (medida por medio de la prueba de capacidad de servicio), niveles plasmáticos de testosterona y cómo el efecto estacional (estaciones del año) influye sobre estos caracteres.

La actividad reproductiva de los carneros está influenciada, en ciertas razas y regiones, por la estación del año, siendo el fotoperíodo un factor preponderante (Boland *et al.*, 1985; Glover *et al.*, 1990; Karagiannidis *et al.*, 2000; Kafi *et al.*, 2004).

1.7. Evaluación de semen recién obtenido

La importancia de la evaluación del semen inmediatamente después de colectado radica en obtener indicadores que permitan inferir acerca del potencial reproductivo del mismo. Históricamente el semen es evaluado por diferentes técnicas (físicas, químicas y combinadas). La fertilidad potencial de una muestra de semen depende de que contenga un número suficiente de espermatozoides viables, morfológicamente normales y funcionalmente competentes, capaces de recorrer el canal reproductivo de la hembra, fecundar el ovocito y finalmente contribuir a la formación y al desarrollo del embrión. Como ya se dijo es prácticamente inexistente la información sobre características seminales en la raza Pampinta.

1.8. Congelación del semen

Es la forma de preservar la contribución genética de un macho, incluso más allá del largo de su vida y potenciar su diseminación alcanzando a un número mayor de hembras. Con este objetivo, numerosos investigadores desarrollaron protocolos teniendo en cuenta agentes crioprotectores, protectores de membrana y nutrientes, en combinaciones diversas. Un conjunto de ellas se aplicaron al semen de la especie ovina. En este estudio se revisarán las que dieron mejores resultados y se implementará un sistema de congelación.

1.9. Evaluación del semen congelado-descongelado

La evaluación del semen mediante técnicas *in vitro*, debería incluir el estudio de tantas características espermáticas como fuese posible, para que tenga algún valor predictivo de su capacidad fecundante *in vivo*. Los nuevos sistemas computarizados para el análisis de la motilidad y de la morfometría espermática, junto con las tecnologías de fluorescencia, permiten producir, de forma rápida y objetiva, datos precisos sobre múltiples parámetros relativos a características estructurales y funcionales de los espermatozoides.

El presente trabajo plantea estudiar la influencia de la variación estacional sobre la actividad fisiológica- reproductiva de carneros de la raza Pampinta, a través de:

- a) características de producción de semen (volumen del eyaculado, concentración espermática, relación de espermatozoides vivos/muertos, porcentaje de células móviles, porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas);
- b) diferencias en las características de producción de semen entre el 1º y el 2º eyaculados;
- c) “congelabilidad” del semen del 1º eyaculado (características seminales pos-descongelación);
- d) tamaño testicular (circunferencia escrotal);
- e) libido (prueba de capacidad de servicio) y
- f) concentración plasmática de testosterona, y comparar los valores de todas estas variables con las correspondientes a carneros Corriedale, raza componente genética menor de la Pampinta.

1.10. Objetivo General

Aumentar la productividad de la raza Pampinta.

1.11. Objetivos Específicos

1- Determinar el efecto de la estación del año sobre los siguientes parámetros reproductivos en carneros de la raza Pampinta y compararlos con los obtenidos en raza Corriedale:

- a. circunferencia escrotal
- b. comportamiento sexual (prueba de capacidad de servicio)
- c. concentración plasmática de testosterona
- d. características seminales del 1º y 2º eyaculado (volumen del eyaculado, concentración espermática, relación vivos / muertos, porcentaje de mótiles, porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas).
- e. "congelabilidad" del semen del 1º eyaculado (características seminales pos-descongelación)

2- Determinar el efecto del orden de eyaculación (1º o 2º eyaculado) en las estaciones del año sobre los parámetros seminales en carneros de la raza Pampinta y compararlos con los obtenidos en raza Corriedale.

1.12. Hipótesis

a) Las características reproductivas (parámetros seminales, circunferencia escrotal y libido) varían según la estación del año, siendo el otoño la mejor estación reproductiva para la raza Pampinta, en la latitud estudiada.

b) Las características seminales del 2º eyaculado son mejores que la del 1º en todas las estaciones y en ambas razas.

c) En ambas razas se observa, en el otoño, una mayor concentración plasmática de testosterona comparada con las otras estaciones del año.

d) La estación reproductiva de los carneros de la raza Pampinta es más larga que la que presenta la raza Corriedale.

e) En la raza Pampinta, el semen congelado en otoño, presenta los mejores parámetros pos/descongelación.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. La actividad ovina en la Argentina

El ovino fue introducido en la Argentina alrededor del año 1550 en la época del virreinato del Río de la Plata, en su mayoría animales de razas Churras y Montañesas españolas que dieron origen a la “raza criolla”. Su gran evolución y desarrollo ocurrió en el siglo XIX, donde la importación en escala de ejemplares de raza Merino en la primera mitad del siglo, introducida por inmigrantes españoles, generó el cambio de la orientación productiva de la época, a este proceso se lo denominó “merinización”.

Poco tiempo después, la mestización con razas denominadas “criollas”, herencia de la época de la colonia, propició el cambio de la calidad y productividad de las majadas que conjuntamente con el gran intercambio comercial que se realizó con Europa, favoreció la orientación de la producción de las razas con aptitud lanera (Calvo, 1983).

Alrededor de 1860, inmigrantes ingleses e irlandeses introdujeron gran parte de las razas británicas ovinas y especialmente la raza Lincoln, que modificó nuevamente la orientación productiva, jerarquizando la producción de carne. En 1876 se inventó la máquina para producción de frío, lo que permitió exportar a Europa carne refrigerada, este hecho generó aún más el desarrollo de la producción de carne con la raza Lincoln y esta época se conoció como “Lincolnización” (Calvo, 1983).

Como consecuencia se comenzó una etapa de cruzamientos entre las razas presentes buscando un animal que reuniera una conformación carnicera y una producción de lana de finura intermedia. Sobre el final del siglo XIX ingresaron las razas Romney Marsh, Hampshire Down, Southdown y otras que no alcanzaron a tener la importancia de las anteriores.

2.2. La raza Corriedale

2.2.1. Origen

Esta raza se formó en la isla Sur de Nueva Zelanda en el año 1866 a partir del cruzamiento de la raza Merino con Romney Marsh, aunque esta línea se perdió rápidamente por no haber satisfecho los objetivos de los iniciadores. En 1880 el Sr. James Little encabezó un nuevo emprendimiento cruzando 4000 ovejas de raza Merino con 100 carneros de raza Lincoln. Luego de obtenida la primera descendencia, por endocría se aparearon y seleccionaron los individuos producto de este cruzamiento hasta 1895, donde en la quinta generación se obtuvo el animal con el tipo pretendido (Calvo, 1983).

También otros criadores en la misma época realizaron intentos con similar objetivo utilizando las razas Leicester y Border Leicester aunque no prosperaron y se perdieron.

El nombre de la raza, según Calvo (1983), se adoptó del lugar donde se realizó la cría de la misma y su composición genética se estableció en 50% Merino y 50% Lincoln fijado por selección y endocría.

2.2.2. Ingreso a la Argentina

La raza Corriedale ingresó a la Argentina en el año 1912. A partir de ese momento, se diseminó por todo el territorio nacional encontrándose en todas las regiones, prosperando hasta la actualidad en las provincias de Tierra del Fuego, Santa Cruz, Chubut, Río Negro, La Pampa, San Luís, Neuquén, Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos, Santa Fe, Corrientes, Formosa, Salta y Jujuy. En la actualidad junto a la raza Merino, es la que más aporta al stock nacional y es sin duda la de mayor distribución territorial.

2.2.3. Principales productos

Se la denomina raza de doble propósito en correcto equilibrio entre la producción de carne de buena calidad y de lana de finura media; destacándose por la armonía entre las proporciones musculares y óseas como rasgos carniceros y lana de buen largo de mecha, alrededor de 12 cm de crecimiento anual y una finura media de entre 27 a 32 micrones.

2.3. La raza Frisona

2.3.1. Origen

La raza es originaria de Alemania donde es conocida como Ostfriesisches Milchschaaf o también se la conoce como Frisona del Este.

2.3.2. Ingreso a la Argentina.

El desarrollo de la raza se inició en la década de '60 en que fue importada con el fin de aumentar la prolificidad de los ovinos en la Argentina, con miras a la producción de carne con mayor proporción de músculo y menor cantidad de grasa. A partir de la década del '80 se la empleó para la producción de leche, ya que posee antecedentes

de ser la raza más productiva del mundo. Los últimos animales importados desde Alemania se trajeron en febrero de 1991.

La raza está alcanzando gran difusión en nuestro país, particularmente dentro del ámbito de la producción lechera. La cifra de tambos, así como la producción de quesos de oveja se duplica cada dos años, siendo importante destacar que existen majadas en formación cuyo objetivo es el ordeño de más de mil ovejas diarias.

La raza se ha adaptado perfectamente a las condiciones agroecológicas de la zona templada y fría de Argentina, prueba de ello es su prolificidad que sobrepasa el 200%. Las cualidades de producción de carne de la raza Frisona son reconocidas tanto para la producción de animales puros como para cruzamientos con otras razas.

Debe tenerse en cuenta también su capacidad de producción de lana, de excelente calidad, con buen largo de mecha, sin fibras meduladas, de buen color y una finura promedio de 32 micrones.

El 17 de marzo de 1993 se fundó la Asociación de Criadores de Ovinos Frisones de Argentina (C.O.F.A.), con el fin de promover el desarrollo y mejoramiento de la raza "Ostfriesisches Milchschaaf", conocida oficialmente en la República Argentina como raza "Frisona".

En la actualidad la asociación cuenta con más de cuarenta socios entre los que se destacan tres criadores con majadas de pedigrí y varias más en proceso de absorción por medio de un programa controlado que posibilitará el aumento de majadas puras en el país. En el corto plazo se pretende iniciar un programa de control lechero que permitirá una selección más objetiva de reproductores y el mejoramiento de los reproductores en la Argentina.

2.3.3. Principales productos

Se destaca por su elevada prolificidad superior al 200%, su res magra, gran desarrollo de la carcasa y muy buena producción de leche, lográndose alrededor de 300 litros de leche en lactancia de 270 días. Su lana es blanca, con una finura de 32 micrones sin fibras meduladas y un largo de mecha corto de alrededor de 6 cm de crecimiento anual.

2.4. La raza Pampinta

2.4.1. Origen

La raza Pampinta es el producto de la adaptación a la región pampeana de la oveja lechera Frisona del Este a través de la incorporación de 1/4 de sangre Corriedale. El resultado es un animal de porte grande y alargado, totalmente blanco, sin cuernos y descubierto de lana en la cara y patas, de elevada prolificidad, precocidad, producción lechera y de res magra (Suárez *et al.*, 1998). Tanto la cola como los testículos y las ubres son bastante limpios, casi desprovistos de lana. Los pezones son de mediano tamaño e implantados algo lateralmente y dirigidos hacia delante.

2.4.2. Aparición en la Argentina

Esta raza se originó en la EEA INTA Anguil en la década de '70 a partir del cruzamiento entre ovejas de raza Corriedale y carneros Frisona. Se pretendía dotar de rusticidad a la raza Frisona a través de la incorporación del Corriedale, dado que, en algunos ambientes pampeanos, la raza Frisona tenía problemas de adaptación. Finalmente el biotipo se estabilizó en un $\frac{3}{4}$ Frisona : $\frac{1}{4}$ Corriedale, a través de la endocría y selección dichas proporciones fueron fijadas. Actualmente la raza se encuentra nucleada en la Asociación Argentina de Criadores de Pampinta fundada el 17 de Marzo de 2005, y mantiene abierto el registro en la Sociedad Rural Argentina. Tiene como objetivo la comercialización de productos y servicios para beneficio de sus asociados, mejorar la raza en forma continua, integrar, promover, impulsar y desarrollar las potencialidades económicas de la raza propendiendo a hacer conocer sus virtudes como productora de carne, leche y lana (COFA, com. pers., 2008).

2.4.3. Principales productos

Pampinta luego de 30 años de trabajo se define como una raza de alta prolificidad y una reconocida aptitud materna y la manifiesta adaptabilidad de la raza en vastas regiones del país, entre otras, la región semiárida pampeana, lugar de las primeras experiencias en cruzamientos industriales para el logro de corderos magros y pesados.

Pampinta constituye una raza triple propósito (carne, leche y lana) aceptada de buen grado a juzgar por la calidad de sus carne, queso y lana. La aptitud de Pampinta para la producción de leche se refleja al superar el litro diario con lactancias de 8 – 9 meses y rendimientos totales de 190 a 300 litros en borregas y ovejas respectivamente. La cantidad de leche necesaria para fabricar un Kg de queso de

oveja se sitúa alrededor de los 5,5 litros al inicio de la lactancia, pudiéndose lograr dicho peso con 4 litros o menos al final de la misma.

Es una raza de muy buena prolificidad (200%) y precocidad sexual, dado que las borregas a los 8 meses pueden recibir el primer servicio y la ganancia de peso predestete es de aproximadamente 300 g/día hasta el destete de 90 días y 30 Kg de peso (Suárez, 2004).

En cuanto a la lana, presenta un vellón semiabierto que en promedio produce 4,3 Kg en las ovejas y 6 Kg en los carneros. El rendimiento al lavado es del 70% y la finura es de 33 micras, ubicándose la lana como cruza media, apta para destinos industriales como prendas con telas de grosor medio y pesadas.

En lo referente a la carne, los buenos rendimientos de las carcasas, los altos porcentajes de músculo respecto al hueso y grasa y la calidad constitutiva de los ácidos grasos que conforman los lípidos corporales, han determinado junto a la precocidad de crecimiento que es una raza de muy buenas características productivas.

2.5. Características reproductivas del ovino macho

2.5.1. Anatomía del aparato reproductor del carnero

El aparato reproductor está conformado por el escroto, los testículos, los conductos aferentes, los epidídimos, los conductos deferentes, la uretra, las vesículas seminales, las glándulas bulbouretrales, la próstata, el pene y el prepucio. El origen, su desarrollo, su ubicación, forma y tamaño frecuente, sus funciones serán desarrollados en los apartados siguientes.

2.5.1.1. Desarrollo prenatal

Los testículos se desarrollan a partir del mesonefros dentro del abdomen en posición medial al riñón embrionario. Dentro del testículo, el plexo de conductos se conecta a los túbulos mesonéfricos, para formar el epidídimo, conducto deferente y las vesículas seminales. La próstata y las glándulas bulbouretrales se forman a partir del seno urogenital embrionario y el pene se genera por tubulización y alargamiento de un tubérculo que se desarrolla en el orificio del seno urogenital. Los encargados de la diferenciación y desarrollo, son los andrógenos fetales y una glucoproteína inhibidora de los conductos de Müller (Hafez; Hafez, 2002). Las anomalías en la diferenciación y el desarrollo de las gónadas y conductos pueden dar origen a distintos grados de intersexualidad.

2.5.1.2. Descenso de los testículos

El descenso testicular consiste en su traslado desde el abdomen hacia la profundidad del anillo inguinal, su recorrido a través del canal y su migración para llegar al escroto. En primer lugar, la gónada emigra caudalmente hasta llegar al anillo inguinal profundo. Luego atraviesa la pared abdominal para emerger en el anillo inguinal superficial que se encuentra muy agrandado y que alberga al nervio genitofemoral. Finalmente se completa el recorrido al descender al fondo del escroto. Este descenso es precedido por la formación de un saco de peritoneo (proceso vaginal) que encierra al ligamento inguinal testicular o gubernáculo testis que termina en la región de los rudimentos escrotales. La retracción de este ligamento y la presión abdominal se cree que son los responsables del descenso testicular. El momento del descenso de los testículos en el carnero ocurre a la mitad de la edad fetal, aproximadamente a las 11 semanas de gestación. Algunas veces los testículos no entran al escroto, generando lo que se denomina “criptorquidia” y en este caso no se satisfacen las necesidades térmicas especiales del testículo y epidídimo, aunque no está afectado el funcionamiento endócrino testicular, por lo tanto, los machos con esta anomalía tienen impulso sexual más o menos normal, aunque son estériles (Hafez; Hafez, 2002).

2.5.1.3. Desarrollo posnatal

Cada componente de los conductos reproductivos aumenta de tamaño hasta alcanzar un tamaño relativo al tamaño corporal total y sufre la diferenciación histológica. No todos los componentes del aparato reproductor adquieren competencia funcional de manera simultánea. En el carnero, el segmento terminal del epidídimo es morfológicamente maduro a las seis semanas, pero el segmento inicial no lo es hasta las 18 semanas. En la pubertad todos los componentes del aparato reproductor masculino han alcanzado un desarrollo suficiente para que el sistema en conjunto sea funcional. El desarrollo se completa algunos meses o años (> 2 años) después de haber alcanzado la pubertad.

2.5.1.4. Escroto

La piel del escroto es rica en grandes glándulas sudoríparas adrenérgicas; su componente muscular (dartos) le permite modificar el espesor y la superficie del escroto y variar la distancia de contacto de los testículos con la pared corporal (cremáster). En tiempo frío los músculos lisos se contraen, elevan los testículos y

arrugan y engrosan la pared escrotal. En tiempo cálido los músculos se relajan, bajando los testículos en el escroto, el cual se distiende y adelgaza su pared. Además la especial disposición de las arterias y las venas en el plexo pampiniforme, generan mecanismos de contracorriente que permiten un descenso importante de la temperatura de la sangre, llegando en el carnero a bajar hasta 4 °C entre el anillo inguinal superficial y el testículo.

2.5.1.5. Testículo

Es un órgano par que se encuentra ubicado en la región inguinal, albergado dentro del escroto junto al epidídimo y recubierto por una túnica albugínea y el proceso vaginal.

Los testículos están fijados a la pared del proceso vaginal, a lo largo de la unión con el epidídimo. Presentan una forma ovalada alargada dorsoventralmente cuyas medidas aproximadas son 10 cm de largo, 6 cm de diámetro y un peso de 275 g (Hafez, 1993). El tejido conectivo de la túnica albugínea separa en lóbulos a paquetes de túbulos seminíferos que se encuentran muy enrollados. Entre estos, en el intersticio se encuentran las células de Leydig encargadas de la producción de hormonas masculinas.

2.5.1.6. Conductos eferentes

Los conductos eferentes unen la red testicular con el epidídimo y forman parte de la región de la cabeza de este último, en una cantidad variable entre 10 y 13 se unen luego para formar el conducto epididimario. La región media de cada conducto eferente presenta una importante actividad secretoria.

2.5.1.7. Epidídimo

Se reconocen tres regiones anatómicas del epidídimo, la cabeza, donde están los conductos eferentes, forma una estructura aplanada ubicada en el polo dorsal del testículo, continuándose luego por un cuerpo estrecho y terminando en una amplia y prominente cola en el polo opuesto del testículo. Todo el órgano es recorrido por el conducto epididimario que en el carnero tiene una longitud de 50 m aproximadamente, es muy contorneado, distinguiéndose histológicamente tres segmentos diferenciados que no se corresponden a las regiones anatómicas descritas anteriormente. Hay una disminución progresiva de la altura del epitelio y de los estereocilios y ensanchamiento de la luz a través de los tres segmentos. En los dos primeros, los espermatozoides

maduran y en el tercero se almacenan. El transporte de los espermatozoides a través del epidídimo requiere entre 9 y 13 días (Hafez, 1993).

2.5.1.8. Conductos deferentes

El conducto deferente conduce a los espermatozoides desde la cola del epidídimo hasta la uretra, sigue un trayecto flexuoso al salir de la cola del epidídimo para luego enderezarse formando con los vasos y nervios el cordón espermático.

2.5.1.9. Uretra

Es el conducto tubular común al aparato urinario y reproductivo del macho. Se divide en dos: uretra pelviana y uretra peneana. La uretra pelviana comienza en el colículo seminal, lugar donde desembocan los conductos deferentes en su porción ensanchada, denominada ampolla deferente y finaliza al introducirse en el interior del cuerpo esponjoso iniciando la porción peneana de la uretra. Su función es la traslación de la orina o semen en el momento de la eyaculación.

2.5.1.10. Vesículas seminales

Son glándulas lobuladas pares de 4 cm de longitud por 2 cm de ancho que secretan un líquido viscoso opaco amarillento, rico en proteínas, sales de potasio, ácido cítrico y fructosa, que se elimina en el momento del eyaculado, pudiendo representar el 50% del mismo.

2.5.1.11. Glándulas bulbouretrales

Son pequeñas en forma de avellana de 1,5 cm de largo por 1 cm de ancho, producen un líquido viscoso cuya función es limpiar y lubricar la uretra previo a la eyaculación.

2.5.1.12. Próstata

Es muy pequeña, rodea casi en su totalidad a la uretra, posee una estructura tubular ramificada y el aporte al eyaculado es poco importante, solo otorga algunas sales y enzimas.

2.5.1.13. Pene

Presenta una longitud de unos 40 cm pudiendo dividirse en 3 partes: raíz, cuerpo y glande. La raíz está unida a la pelvis por dos ramas laterales que se prolongan

formando las bandas laterales del cuerpo, éstas, junto a una tercera banda central se unen para formar el cuerpo cavernoso. Esta última banda se halla rodeando en toda su extensión a la uretra peneana y se la denomina cuerpo esponjoso. Los músculos retractores del pene que tienen nacimiento en las vértebras sacras y se insertan alrededor de la zona de la curvatura sigmoidea, ejercen su acción retractora al contraerse. En su porción terminal se encuentra el glande, donde desemboca la uretra prologándose por sobre la extensión del mismo en unos 3 a 4 cm, formando lo que se denomina proceso uretral o “apéndice vermiforme”. Este apéndice actúa como un látigo en el momento de la eyaculación impulsando el semen hacia el cuello del útero.

2.5.1.14. Prepucio

Es una invaginación de la piel de unos 10 a 12 cm; su abertura está controlada por un músculo estriado y se encuentra recubierto internamente por un epitelio diferenciado.

2.5.2. Eyaculación

Es un proceso rápido que dura entre 2 y 5 segundos. En forma natural ocurre la erección del pene, monta del macho a la hembra, introducción del pene en la vulva de la hembra, eyaculación y retracción del pene dentro del prepucio. El fenómeno de eyaculación en sí, se produce ante la excitación sexual que desencadena la contracción de los pequeños músculos lisos del epidídimo y del conducto deferente que hacen ascender a los espermatozoides hasta la uretra, mezclándose con las secreciones vesiculares, prostáticas y bulbouretrales. Posteriormente el músculo bulboesponjoso comprime al bulbo peneano, bombeando sangre al cuerpo cavernoso provocando la erección peneana. Las ondas de presión que pasan por debajo de la uretra peneana ayudan al transporte del semen provocando la expulsión del líquido seminal al exterior.

2.6. Estado nutricional

2.6.1. Peso

El control del peso en forma periódica permite observar la evolución del estado general del animal en forma objetiva. Este es muy variable en la época de crecimiento y no refleja necesariamente el estado nutricional del animal. Permite si la comparación entre individuos de edades y tamaños corporales semejantes. Para el control del

estado nutricional se debe complementar con técnicas como la determinación de la condición corporal.

2.6.2. Condición corporal

Jefferies (1961) describió la técnica de condición corporal, basándose en la observación del área lumbosacra y cuartos posteriores de ovejas recientemente esquiladas, aplicando una escala de 6 puntos (0-5), donde el punto 0 se correspondía al animal extremadamente flaco y 5 al extremadamente gordo. Russel *et al.*, (1969) realizaron la adaptación de la técnica visual de Jefferies (1961) para describir el método de condición corporal utilizando la palpación de la región lumbar, específicamente el grado de cobertura de tejidos musculares y grasa sobre las apófisis transversas y espinosas de las vértebras dorsales, utilizando una escala de 6 puntos (0-5) correspondiéndose el 0 al animal extremadamente emaciado o flaco que se encontraba al borde de la muerte y el 5 al extremadamente gordo, donde las apófisis espinosas y transversas no se pueden percibir, con el músculo *longissimus dorsi* muy lleno y el tejido subcutáneo con gran cantidad de grasa al igual que el anca y la cola. Entre ambos extremos hay 4 puntos intermedios bien definidos para cada uno de ellos. Esta adaptación permitió no tener en cuenta el grado de cobertura de lana, ya que la palpación podía realizarse de igual manera. También, con la experiencia, luego se podían encontrar los puntos intermedios lográndose intervalos de 0,5 puntos de condición corporal y eventualmente hasta puntos intermedios de 0,25 de condición corporal. Esta técnica fue ampliamente adoptada hasta nuestros días y se la utiliza para caracterizar el estado corporal del animal en cualquier época del año.

2.7. Circunferencia escrotal o testicular

La necesidad de valorar el tamaño, volumen y peso testicular y relacionarlo con la producción de espermatozoides ha llevado a los investigadores a desarrollar numerosas técnicas, entre las que se destacan peso y volumen testicular (Lincoln; Davidson, 1977). Los carneros presentan estacionalidad en su actividad sexual, afectando el comportamiento sexual, la actividad hormonal, la espermatogénesis, el peso y el volumen testicular (Schanbacher; Lunstra, 1976; Lincoln; Davidson, 1977). Sin embargo, la estacionalidad en el carnero es menos pronunciada que en la oveja, puesto que la oveja prácticamente deja de ovular, y en el macho la espermatogénesis no cesa del todo (Pelletier; Almeida, 1987). Se han llegado a medir diferencias de 10-20 gramos en el peso testicular entre primavera y otoño, una menor producción de

espermatozoides de hasta 4 millones por gramo de testículo (Ortavant *et al.*, 1985), y una menor libido. La medición de la circunferencia escrotal es una técnica ampliamente utilizada para valorar en forma indirecta el volumen testicular.

2.8. Comportamiento sexual del macho

2.8.1. Prueba de capacidad de servicio

Los cambios en la libido fueron estudiados por Schambacher; Lunstra, (1976) y la agresividad entre machos fue abordada por Lincoln; Davidson, (1977). Otros autores (Mickelsen *et al.*, 1982) preocupados por cómo afectaban estos elementos a los índices de preñez comenzaron a estudiar el comportamiento a campo de los reproductores ovinos, a través de pruebas a corral. Esta simulación del servicio a corral permitió inferir el comportamiento del reproductor en condiciones naturales de servicio. Es así que, Holmes (1986); Blockey; Wilkins (1984); Kilgour (1985); Laborde *et al.* (1991) y otros, formularon diversas técnicas de cómo realizar la prueba de capacidad de servicio. Pruebas realizadas por Ibarra *et al.*, (1999) con las diferentes técnicas, permitieron acortar las pruebas a un tiempo de 20 minutos sin encontrar diferencias entre ellas. Las determinaciones más frecuentes citadas son: número de montas sin servicio, número de servicios o cópulas completas y tiempo de reacción a la primera monta.

2.9. Testosterona en sangre

La concentración de testosterona en sangre puede determinarse por diferentes técnicas, pero el radioinmunoensayo es el más difundido y utilizado.

Los niveles de testosterona sanguínea en carneros de 2 a 4 años de razas Texel, Suffolk e Ile de France se determinaron entre 1,5 y 6,5 ng/ml (Mandiki *et al.*, 1998b), observándose una influencia importante de las estaciones sobre la concentración.

Los valores más bajos se registraron en verano y los valores más altos en el otoño, (Mandiki *et al.*, 1998b y Gündogan, 2007).

2.10. Fisiología reproductiva del Carnero

2.10.1. Eje Hipotalámico – Hipofisiario – Gonadal

El hipotálamo ocupa una pequeña parte del cerebro en la región del tercer ventrículo, entre el quiasma óptico y los cuerpos mamilares. Entre el hipotálamo y la hipófisis existen conexiones de tipo neuronal y vascular, específicamente con la parte anterior de la hipófisis. La circulación sanguínea en la hipófisis ingresa a través de las

arterias hipofisiarias superior e inferior. Estas arterias, según Hafez *et al.* (2002), tienen un recorrido flexuoso formando asas capilares, uniéndose luego al sistema porta hipotalámico –hipofisiario que comienza y termina sin pasar la sangre por el corazón. En su recorrido la sangre avanza algunas veces hacia delante y otras en sentido retrógrado, exponiendo al hipotálamo a altas concentraciones de hormonas secretadas por la parte anterior de la hipófisis.

La hipófisis, también denominada glándula pituitaria, se localiza en la depresión ósea en la base del cerebro denominada “silla turca”. Esta glándula se divide en 3 zonas: lóbulos anterior, medio y posterior. La primera secreta seis hormonas, a saber: somatotrofina (STH), adenocorticotrofina (ACTH), prolactina, tirotrófina (TSH) y las gonadotrópicas: Foliculoestimulante (FSH) y Luteinizante (LH).

Las gónadas cumplen un doble rol, producen las células germinales (gameta masculina, espermatozoide) y secretan hormonas gonadales (testosterona y otras). Las células intersticiales de Leydig secretan testosterona.

2.10.2. La luz como factor regulador de la reproducción

La variación de la relación de horas de luz:oscuridad del día que ocurre a largo del año, se denomina “fotoperíodo”. El fotoperíodo puede ser positivo, cuando se incrementa la cantidad de horas luz o puede ser negativo cuando disminuye. La latitud a la que se realiza la medición, genera cambios en el fotoperíodo acentuando las diferencias a medida que se aleja de la latitud 0° (Ecuador).

En el hemisferio sur, la cantidad de horas de luz mínima en un día, ocurre el 21 de Junio, dando inicio a la estación de invierno. La cantidad de horas de luz máxima en un día, ocurre el 21 de Diciembre, dando inicio a la estación del verano. Entre el 21 de junio y el 21 de diciembre hay un aumento progresivo de la cantidad de horas luz, siendo el fotoperíodo positivo y coincide con la época no reproductiva en la mayoría de los ovinos. Entre el 21 de diciembre y el 21 de Junio hay una disminución progresiva de la cantidad de horas de luz por día, siendo el fotoperíodo negativo, coincidiendo esta época con la mayor actividad reproductiva de los ovinos.

La señal de las diferencias lumínicas diarias que ingresan al animal a través de la retina y viajan por el nervio óptico, estimulan a la glándula pineal para que secreten melatonina al torrente sanguíneo y al líquido cefalorraquídeo (Hafez; Hafez, 2002). El aumento de la secreción de melatonina ocurre en fotoperíodo negativo.

2.10.3. Hormonas intervinientes: acción en el macho

2.10.3.1. FSH

La hormona folículoestimulante o FSH (acrónimo del inglés Follicle-Stimulating Hormone) es una gonadotropina de naturaleza glicoproteica producida por el lóbulo anterior de la glándula hipófisis, que se encuentra en el cerebro. Esta hormona, tiene como función principal en el macho, favorecer la espermatogénesis desde las células primordiales de los túbulos seminíferos hasta el estado de espermatozoides secundarios.

2.10.3.2. LH

La hormona luteinizante (LH) o luteoestimulante, también llamada lutropina y en el macho hormona estimulante de las células intersticiales, es una hormona gonadotrópica de naturaleza glicoproteica que, al igual que la FSH, es producida en el lóbulo anterior de la hipófisis o pituitaria.

La LH es una glucoproteína dimérica, es decir, con dos unidades polipeptídicas, en la que cada unidad es una molécula de proteína con una azúcar unida a ella. Su estructura es similar a la de otras glucoproteínas—FSH, TSH, hCG—en la que cada polipéptido recibe el nombre de alfa (α) y beta (β) y están conectadas entre si por enlaces disulfuro. Las unidades alfa de la LH, FSH, TSH, y hCG son idénticas y contienen 92 aminoácidos.

La unidad beta varía: la LH tiene una unidad beta con 121 aminoácidos y le confiere su función biológica específica, por lo que es responsable de la interacción de la hormona con su receptor celular. La unidad beta de esta hormona tiene la misma secuencia de aminoácidos que la hormona hCG, y comparten el mismo receptor, sin embargo, la β -hCG contiene 24 aminoácidos adicionales y difiere de la LH en su composición de azúcares.

La diferencia en la composición de los oligosacáridos afecta la bioactividad y la velocidad de degradación. La vida media biológica de la LH es de 20 minutos, mucho más corta que la vida media de 3-4 horas de la FSH o las 24 horas de la hCG.

La LH es la proteína que regula la secreción de la testosterona, estimulando las células intersticiales de Leydig en los testículos, para producir andrógenos (testosterona). Éstos a su vez ejercen funciones endócrinas e intratesticulares, regulando la espermatogénesis y promoviendo el crecimiento del tejido testicular.

2.10.3.3. Melatonina

La melatonina es una sustancia natural presente en el organismo de todos los mamíferos, siendo sintetizada por la glándula pineal, proceso en el que intervienen enzimas cuya actividad está regulada por la percepción día/noche. De este modo, la melatonina es la hormona transmisora de la información fotoperiódica y reguladora de la actividad reproductiva en los pequeños rumiantes. Se libera desde el cerebro, en sangre durante la noche, y de forma más importante durante las noches largas, en otoño-invierno, de manera que, marca dos épocas reproductivas a lo largo del año: la estación fértil (estro), que va de enero a julio, y una contraestación (anestro) desde agosto a diciembre, con menor o nula fertilidad.

La melatonina es de naturaleza aminada derivando del triptófano sintetizada en la glándula pineal. Una de las características más sobresalientes respecto a la biosíntesis pineal de melatonina es su variabilidad a lo largo del ciclo de 24 horas, y su respuesta precisa a cambios en la iluminación ambiental. Por ello, se considera una neurohormona con función pertinente en la fisiología circadiana.

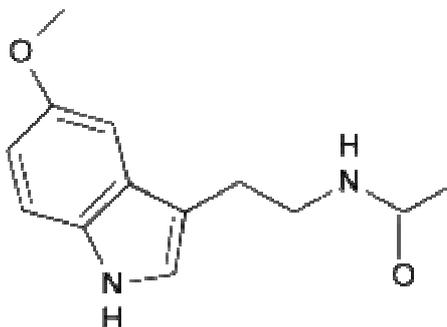


Figura 1: Estructura química de la Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) Hardeland, 2008

En el ovino su secreción aumenta a medida que se incrementa la cantidad de horas de oscuridad, es decir en fotoperíodo negativo y tiene la función de estimular a las gónadas. En el macho aumenta la secreción de andrógenos promoviendo una mayor libido.

2.10.3.4. Testosterona

Es una hormona androgénica producida por los testículos. En realidad es una prohormona, ya que para realizar su acción fisiológica o farmacológica debe reducirse en posición 5-alfa-dihidrotestosterona, que es la hormona activa. Es una hormona propia del macho, que permite el desarrollo de la masa muscular. Las hembras producen una cantidad mucho menor. La testosterona (Figura 2) puede ser

aromatizada en varios tejidos para formar estradiol. El papel del estradiol en el macho aún no está claro, pero su exceso absoluto o relativo puede provocar feminización.

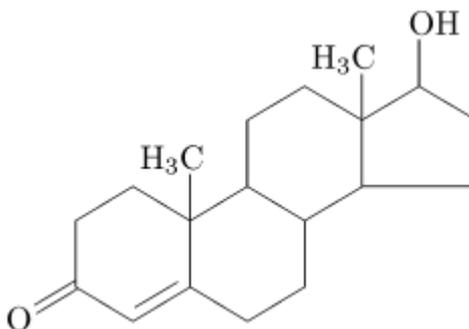


Figura 2: Estructura química de la Testosterona (Hafez; Hafez, 2002)

Los estrógenos del testículo son probablemente producidos por las células de Leydig, pero también son sintetizados en otros tejidos a partir de los andrógenos circulantes. La testosterona estimula la espermatogénesis y prolonga la vida media del espermatozoide en el epidídimo, promueve el crecimiento, el desarrollo y la actividad secretora de los órganos sexuales accesorios del macho, como la próstata, las glándulas vesiculares, las glándulas bulbouretrales, el conducto deferente y los genitales externos. También cumple importantes funciones en el mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios como en el comportamiento y libido del macho (Hafez; Hafez, 2002).

2.10.4. Variación entre estaciones

Las hormonas gonadales varían sus concentraciones plasmáticas dependiendo de las estaciones del año. Como ya se sostuvo en el punto 2.9, la testosterona es una de las que presenta importantes variaciones influenciadas por la melatonina, que a su vez, está condicionada por el fotoperíodo. Esto conlleva a importantes cambios en la espermatogénesis y en el comportamiento sexual.

2.10.5. La libido

El término libido, en su uso común, significa "deseo sexual". En los carneros se manifiesta aproximadamente 1,5 meses antes de la época de receptividad de las hembras y es frecuente en esta etapa de libido alta el cambio de comportamiento de los machos, especialmente se vuelven más agresivos, intentan montar a otros machos (homosexuales), se ensucian las cabezas, cambia el olor de la lana y se establece un orden de dominancia. La libido es variable entre individuos y es posible determinarla a

través de pruebas de capacidad de servicio. La baja libido, lleva al poco impulso sexual y eventualmente a la apatía sexual. Es frecuente observar en los campos “carneros apáticos”, efecto que es solapado por la inclusión de un alto porcentaje de carneros en servicios colectivos.

La libido se cree que está correlacionada con el nivel de concentración de testosterona sanguínea.

2.10.6.El semen

El semen o esperma, proviene del griego *sperma*, que significa semilla, es un líquido viscoso y blanquecino, que es expulsado a través del pene durante la eyaculación. Está compuesto por espermatozoides (de los testículos) y plasma seminal (de las glándulas vesiculares, la próstata y las glándulas bulbouretrales).

2.10.6.1. Aspectos fisiológicos, de morfología y motilidad del espermatozoide de los mamíferos

Los espermatozoides de mamíferos están formados básicamente por 2 zonas con distintas funciones: la cabeza y la cola. La cola, a su vez se divide en 3 segmentos que, por orden cráneo-caudal, se denominan pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal. En la figura 3 se describe de una manera general las partes que conforman el espermatozoide de mamíferos.

El núcleo de la cola está formado por un axonema eucariota típico, con una estructura radial de pares de microtúbulos dispuestos en el típico esquema 9+2 (Mortimer, 2000). Alrededor de este axonema se sitúan diversas estructuras que varían respecto al segmento de la cola de que se trate. Así, tanto la pieza intermedia como la pieza principal contienen una serie de elementos semirrígidos (vainas fibrosas, columnas longitudinales) cuya función es la de otorgar direccionalidad y flexibilidad al movimiento flagelar (Gagnon, 1995). La pieza intermedia también contiene las mitocondrias estructuradas en una vaina mitocondrial, cuya función es la de generar la energía necesaria para el mantenimiento del movimiento del axonema (Gagnon, 1995). Todo este sistema genera que la cola presente un patrón de movimiento rotacional y elíptico, el cual se transmite a la cabeza del espermatozoide a través del cuello. Este movimiento rotacional subsidiario de la cabeza, es lo que otorga en última instancia, progresividad al movimiento espermático (Mortimer, 2000). Esto explica que dentro de los parámetros de motilidad originados por el CASA (Computer Assisted

Sperm Analysis), algunos de los más importantes estén relacionados con el desplazamiento de la cabeza.

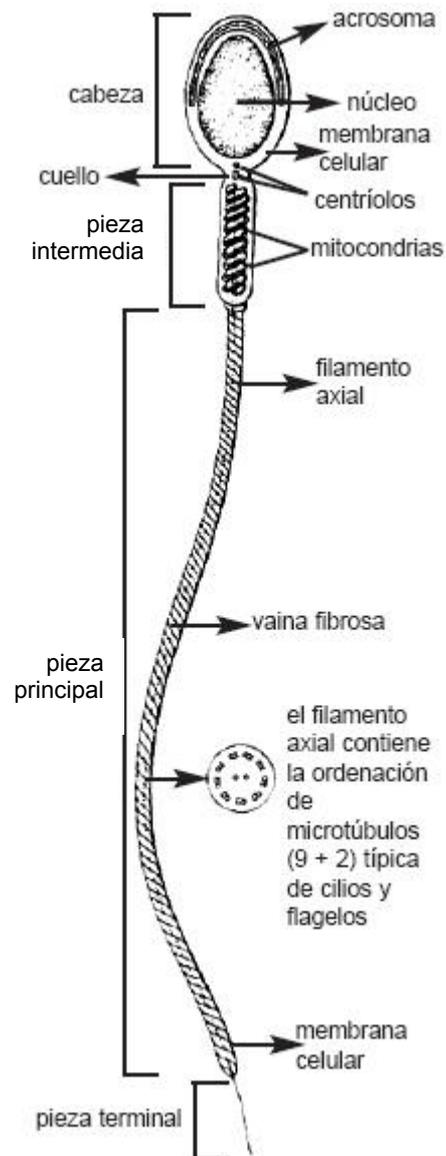


Figura 3. Partes de un espermatozoide.

El patrón de movimiento espermático está modulado por numerosos factores y a su vez está íntimamente relacionado con la gestión del metabolismo energético espermático (Rigau *et al.*, 2001). Esto explica los rápidos movimientos que se observan en los patrones de motilidad de los espermatozoides sometidos a incubaciones con cafeína o a una capacitación *in vitro* (Abaigar *et al.*, 1999). Estos últimos hallazgos confirman que el patrón de movimiento del espermatozoide está influenciado por el medio ambiente externo (Serres *et al.*, 1984; Mortimer, 2000).

2.10.6.2. Parámetros bioquímicos relacionados con la calidad seminal

Los métodos bioquímicos para la valoración de la calidad seminal se pueden clasificar en métodos de evaluación celular (composición fosfolipídica de la membrana espermática, actividad de enzimas como la aspartato aminotransferasa o la acrosina y el estado de la cromatina) y de evaluación del plasma seminal (proteínas totales, niveles de zinc, etc.), los cuales se describen a continuación.

2.10.6.2.1. Fosfolípidos de la membrana espermática

En los últimos años se han incrementado los estudios referentes a los componentes de la membrana espermática, ya que esta juega un papel preponderante en los procesos de conservación de los espermatozoides. En estudios recientes realizados en células espermáticas de verraco, se observó que en eyaculados de alta calidad, la fosfatidilcolina (FC) está presente en mayor cantidad y la esfingomielina en menor proporción, disminuyendo y aumentando respectivamente cuando la calidad es menor (De Alba *et al.*, 1996). Los lípidos que forman la membrana celular están involucrados en la respuesta de los espermatozoides a la conservación del semen (O'Rand, 1979; Quinn *et al.*, 1980). Así, la FC puede tener efecto protector durante el enfriamiento de la célula. Esto explicaría que un mayor contenido de FC en el semen podría mejorar la conservación de dicho eyaculado, ya que la FC colabora a que la motilidad, el estado del acrosoma y el metabolismo celular sean normales (Blesbois; Hemier, 1990). Cuando se refrigera o congela un eyaculado previamente diluido, la membrana de la célula espermática es el primer lugar donde se manifiestan los efectos del estrés por frío. La sensibilidad al frío está relacionada con la composición y estructura de la membrana de los espermatozoides. Según el modelo de la membrana formulado por Singer; Nicholson (1972), ésta presenta una estructura a modo de mosaico fluido con una doble capa lipídica y proteínas entremezcladas formando una matriz de cristales líquidos, donde tanto los lípidos como proteínas pueden realizar movimientos de traslación dentro de la bicapa (Figura 4). Por lo tanto, la susceptibilidad de la célula al enfriamiento está relacionada con la composición lipídica de la membrana del espermatozoide. Este hecho explica que, los espermatozoides de especies como el verraco, el toro o el carnero, en cuya membrana la relación ácidos grasos insaturados/ ácidos grasos saturados es muy alta, sean más sensibles al frío (Koehler, 1985; citado por De Alba *et al.* 1997).

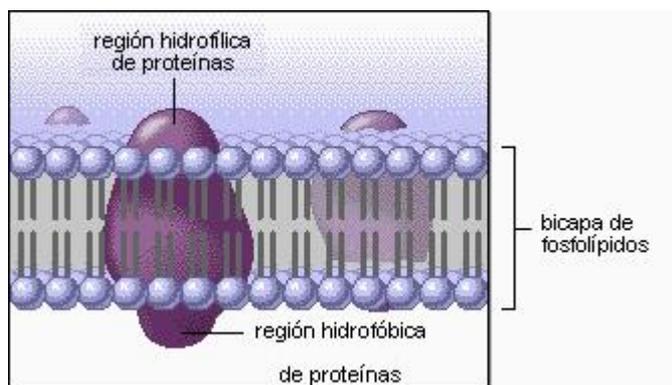


Figura 4. Estructura de membrana en mosaico (Adaptado de Singer; Nicholson, 1972).

La susceptibilidad al shock térmico se ha relacionado también con el contenido del colesterol y fosfolípidos de la membrana espermática. Así, las especies más sensibles al shock térmico tienen un contenido de colesterol más bajo que el de las especies más resistentes, como el hombre y el perro (White; Darin-Bennett, 1976). En estudios realizados por De Alba *et al.*, (1996), se observaron cambios en la composición fosfolipídica de la membrana espermática en el semen del verraco durante su dilución y posterior conservación a 15° C. Por lo tanto, la dilución produce cambios en la estructura de la membrana, lo que se traduce en la capacidad de conservación de dicho eyaculado. De hecho, la composición fosfolipídica de la membrana espermática del verraco es diferente con respecto a aquellas especies menos sensibles al shock frío (Darin-Bennett; White, 1975; Darin-Bennett, 1977; Watson; Plummer, 1985). Incluso entre eyaculados de distintas razas también existen diferencias en cuanto a la composición fosfolipídica de la membrana (Saiz-Cidoncha *et al.*, 1994). Este hecho podrá estar en la base de las diferencias individuales existentes respecto a la resistencia osmótica en esta especie.

2.10.6.2.2. Actividad enzimática de la aspartato aminotransferasa

La aspartato aminotransferasa (AST) es una enzima cuya función consiste en transferir grupos amino del aspartato a moléculas de oxalacetato para formar glutamato. Se encuentra en las células en forma mitocondrial (mAST) y citoplasmática (cAST) (Ciereszko; Strzezek, 1989). La actividad de esta enzima en el aparato reproductor de los mamíferos se localiza principalmente en los espermatozoides, en el líquido epididimario y en las secreciones prostáticas. La síntesis de esta enzima está controlada por los andrógenos (Dubiel *et al.*, 1987). Se ha descrito que todo factor que suponga un aumento de la actividad enzimática en el fluido extracelular dará como

resultado un descenso de la fertilidad de ese eyaculado (Strzezek; Swidowick, 1986). Sin embargo, en semen fresco de verraco se ha observado que una actividad de AST elevada es indicativa de una mejor calidad seminal (De Alba *et al.*, 1996). En esta misma línea están los estudios de Ciereszko *et al.* (1990), los cuales describieron la correlación existente entre la motilidad, la concentración espermática y la actividad AST. Según estos autores, la enzima se libera del espermatozoide bajo el efecto de varios factores físicos-químicos y esta actividad extracelular está correlacionada con la calidad del semen. Del mismo modo, se ha descrito que la actividad AST varía durante la conservación del semen, estando correlacionada con la capacidad de conservación del eyaculado (Strzezek; Cieresko, 1987; De Alba *et al.*, 1996). La actividad AST extracelular es 5 veces superior en muestras con espermatozoides móviles que en las que contienen células inmóviles, observándose una correlación significativa entre la concentración espermática y la actividad de la enzima (Ciereszko *et al.*, 1990; Saiz-Cidoncha *et al.*, 1994). Esto significa que la AST está implicada en la supervivencia de los espermatozoides, dado que, seguramente el espermatozoide muere inmediatamente después de perder su motilidad. La cuantificación de la AST es relativamente sencilla. El método está basado en la acción de la enzima sobre un substrato formado por ácido 2-oxoglutarico y ácido DLaspártico, en presencia de piridoxal fosfato, añadiendo EDTA para la inhibición de la acción de las fosfatasas. El color desarrollado en la reacción se mide por espectrofotometría a 505nm (Strzezek; Cieresko, 1987; citado por De Alba, *et al.*, 1997).

2.10.6.2.3. Determinación de la acrosina

La acrosina deriva de una proenzima inactiva denominada proacrosina que se ha identificado y cuantificado en el conejo y el verraco (Huang-Yang; Meizel, 1975;). La acrosina es una enzima con características similares a la tripsina y se encuentra en la pared acrosomal interna del acrosoma (Baccetti, 1979). Esta enzima juega un papel esencial en la penetración del espermatozoide en el óvulo (Brown; Harrison; 1978; Bedford; Cross, 1978). La liberación de acrosina después de un shock frío, al igual que ocurre en el caso de la AST, indica el estado de permeabilidad de la membrana espermática y consecuentemente el grado de deterioro de la misma. La cuantificación de la acrosina requiere una diálisis previa para la eliminación de inhibidores del paso de la proacrosina a la acrosina. En un trabajo realizado por Marigorta *et al.*, (1997) en semen congelado de verraco, se demostró que la liberación de acrosina y de AST de

la célula espermática durante el proceso de congelación fueron paralelas y están altamente correlacionadas.

2.10.6.2.4. Estado de condensación de la cromatina

La determinación del estado de condensación cromática es un parámetro importante para la determinación de la calidad seminal en semen conservado, ya que las lesiones a nivel cromático pueden estar induciendo un incremento de la mortalidad embrionaria. De esta manera se complementan los estudios sobre integridad de acrosoma y membrana celular para establecer una mejor correlación con la fertilidad. El estado de la cromatina en los espermatozoides puede determinarse *in vitro* en base a su susceptibilidad a la descondesación. Ésta se produce mediante la ruptura de los puentes disulfuro, formando complejos con iones metálicos divalentes, especialmente con el zinc, que estabiliza la cromatina espermática. La heparina es uno de los compuestos más importantes que da lugar a la descondesación de la cromatina *in vitro* (Björndahl, 1986). Los espermatozoides con un desarrollo normal mantienen una estructura de cromatina resistente a la desnaturalización del DNA. Evenson; Thompson (1990) admiten la posibilidad de que el DNA en espermatozoides con una estructura cromática anormal sea susceptible de desnaturalizarse *in situ*. En este sentido, Strzezek; Smigielska (1978) observaron cómo se producía la descondesación cromática en semen conservado a -151°C, mientras que Evenson; Thomson (1990) determinaron una buena correlación del estado de condensación cromática del semen congelado de verracos con la fertilidad. Estos resultados remarcan la importancia de este parámetro como marcador de calidad seminal.

2.10.2.6.5. Proteínas totales en el plasma seminal

El contenido de proteínas totales en el plasma seminal también afecta la calidad del semen en algunas especies como el verraco (Boursnell *et al.*, 1968; Strzezek, 1976). En experimentos con verracos vesiculectomizados se ha demostrado que, la susceptibilidad al shock térmico aumenta en ausencia de secreciones de las vesículas seminales (Davies *et al.*, 1975; Moore *et al.*, 1976). En dicho trabajo se afirma que las proteínas de las secreciones seminales cubren la superficie del espermatozoide, disminuyendo así la permeabilidad de la membrana. Una modificación en el contenido de proteínas totales puede ayudar así a explicar el aumento de susceptibilidad al shock térmico en estos espermatozoides (Moore; Hibbitt, 1977). En concordancia, De

Alba (1995) encontraron en el eyaculado de calidad seminal alta, un contenido en proteínas totales mayor con respecto a los de calidad seminal inferior.

2.10.6.2.6. Niveles de zinc en el plasma seminal

El plasma seminal tiene un alto contenido en zinc, encontrándose los iones en forma libre o combinados con proteínas. Según Luberda y Strzezek (1988) la cantidad de zinc en plasma seminal influye sobre la calidad del semen de verraco. Su papel fisiológico y bioquímico no está claro, aunque se piensa que es importante para la estabilidad de la membrana y de la cromatina, así como en el mantenimiento de la motilidad (Blom, 1976).

La eliminación del zinc en semen de verraco da lugar a un elevado consumo de oxígeno y a la formación de peróxidos lipídicos (McDermott y Fraser, 1992). Estos datos fueron confirmados posteriormente por De Alba *et al.* (1996), observando que el contenido en zinc disminuye a medida que lo hace la calidad seminal.

2.10.7. Parámetros seminales normales

Los valores considerados normales para el semen del carnero se observan en la Tabla 3.

Tabla 3: Valores seminales normales en semen recientemente obtenido

Volumen	0,5 – 2,0 ml
Concentración espermática	3500 x10 ⁶ a 6000 x 10 ⁶ ESPZ/ml
Motilidad masal (0 – 5)	4 – 5
Motilidad progresiva	70 – 90 %
Porcentaje de espermatozoides normales	80-95%
pH	7,5 – 8,5 %

Adaptado de Hafez; Hafez, 2000

2.11. Recolección de semen

2.11.1. Vagina artificial

Usualmente se utiliza un tubo de material rígido liviano pudiendo ser caucho, PVC o aluminio que tiene externamente una cobertura térmica de aislamiento, pudiendo ser esta material de tela o bien sintética. Interiormente se adosa una camisa o funda de látex, generando entre ésta y el tubo un espacio que posteriormente se llena con agua atemperada a $\pm 45^{\circ}\text{C}$ para que luego de entrar en contacto con los elementos continentes se establezca la temperatura a unos 38°C .

Finalmente en un extremo se adosa un tubo colector de PVC o vidrio pudiendo requerir o no un intermediario cónico de látex para así conducir el semen eyaculado al tubo colector. El tubo rígido tiene una espita con válvula para poder introducir aire a presión al interior simulando de esta manera la presión natural de vagina de la hembra generando el estímulo sobre el glande del pene del carnero. Toda la vagina pueda ser cubierta con una funda aislante protegiéndola de potenciales golpes, de las diferencias de temperaturas entre el ambiente y la vagina y por último de la luz, manteniendo sólo expuesta la porción que entra en contacto con el macho.

Todas las vaginas artificiales comerciales tienen en general los mismos elementos constitutivos, variando solamente en formas y tamaños dentro de determinados márgenes (Figura 5).

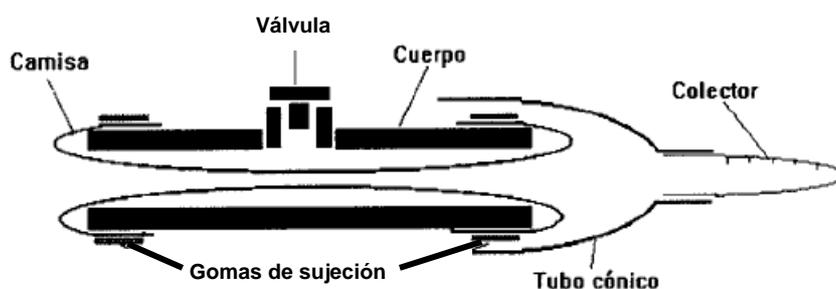


Figura 5. Esquema de una vagina artificial

La simpleza de los elementos constitutivos permite incluso el desarrollo artesanal de la misma, cumpliendo todas ellas con el objetivo de coleccionar el semen de los carneros.

2.11.2. Súcubo.

Se puede utilizar animales u objetos inanimados (Katz *et al.*, 1998 y Aguirre Flores *et al.*, 2005) que semejan o no a la hembra de la especie. En ovinos se usa frecuentemente hembras de la misma especie pudiendo estar en celo o no. Es conveniente que en la etapa de acostumbramiento las ovejas inicialmente estén en celo, una vez que el carnero se acostumbra a la rutina no es necesario el celo y es posible utilizar hembras ovariectomizadas (castradas) como súcubo. Existe el concepto de que en la mayoría de los animales domésticos el desencadenante de la monta es la inmovilidad de la hembra. (Aguirre Flores *et al.*, 2005).

2.11.3. Estimulación

En la etapa de adiestramiento de los machos es conveniente que los mismos observen la monta de sus pares y manejándolos desde un cabestro se les permita realizar intentos de monta, bajándolos antes que pudieran completar la cópula (falsa monta). Una vez acostumbrados a la rutina, solamente se introducen al lugar de extracción 5 minutos antes de la misma, luego de dos falsas montas se considera al carnero estimulado y se procede a la extracción.

2.11.4. Monta y extracción de semen

Luego de la etapa de estimulación se permite al carnero la monta y en ese momento se procede a la extracción del semen, utilizándose la vagina artificial.

2.12. Evaluación de semen recién obtenido

El análisis seminal o espermograma incluye una serie de pruebas que evalúan diversos parámetros de la célula espermática. Como resultado del análisis seminal podemos clasificar a la muestra como apta o no apta para su uso en inseminación artificial.

Entre todas las pruebas disponibles citadas por los investigadores se revisaran las siguientes:

2.12.1. Volumen

El volumen seminal es medido directamente en el tubo de recolección y expresado en ml. Se determina utilizando tubos colectores calibrados al 0,1 ml o bien en especies con eyaculados más abundantes se puede utilizar una balanza electrónica para determinar el volumen en forma indirecta.

2.12.2. Motilidad total o masal

La motilidad es uno de los parámetros más importantes del análisis seminal. Existen varias técnicas de estudio de la motilidad, pero la más utilizada y a la vez la más simple es la valoración visual subjetiva del porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad de su movimiento. Para la realización de esta valoración todo el material usado debe de estar en condiciones de normocinesis (temperatura de 37 °C).

Los espermatozoides pueden presentar 2 tipos de movimientos:

- Movimiento de rotación (alrededor de su eje).

- Movimiento progresivo (desplazamiento de la célula), el cual a su vez puede ser: lineal o circular.

Dentro de la motilidad total un caso especial hace referencia a la denominada motilidad masal que es únicamente valorable en eyaculaciones de mamíferos con concentraciones espermáticas muy elevadas, como es el caso de los rumiantes. Se determina depositando una gota de la muestra seminal sin diluir sobre un porta-objetos atemperado en una placa térmica y se visualiza sobre la muestra en un microscopio óptico a 40 a 100 aumentos. Se evalúa en forma subjetiva el movimiento de las células espermáticas en su conjunto. Se le otorga una valoración de 0 a 5 o de 0 a 100% según la preferencia del técnico evaluador.

2.12.3. Motilidad Individual

La motilidad individual se obtiene utilizando mediante observación en microscopio óptico a 400 aumentos de una gota seminal (generalmente diluida) dispuesta entre porta y cubreobjeto. En este caso se valoran dos parámetros: primero, el porcentaje estimado de espermatozoides que muestran algún tipo de movimiento o motilidad total, segundo, el porcentaje de espermatozoides mótiles que presentan un movimiento progresivo o motilidad progresiva. La estimación de la motilidad total y la progresiva será una indicación de la calidad de movimiento que presente la muestra seminal.

2.12.4. Vigor

El vigor espermático es estimado tomando una muestra de semen fresco o crioconservado (entre 5 y 20 μ l) y colocada sobre una lámina portaobjetos previamente calentada y observada directamente al microscopio de luz con objetivo de 10X. El vigor espermático es definido como el grado o intensidad de movimiento de los espermatozoides y se estima en una escala de 0 a 5.

2.12.5. pH

Las determinaciones de pH se realizan usualmente con tiras de papel reactivo llamadas papel para pH, calibradas entre rangos de 0 – 14 con escala de 1 o bien de rango menor de 6 – 10 con escala de 0,5. El pH del semen varía normalmente en un rango muy estrecho (7,2 - 8,0), pocos son los trastornos capaces de alterarlo.

Se ha sugerido que un pH elevado (> 8) puede considerarse un signo de infección seminal si se asocia a otros síntomas y signos de sospecha, mientras que un pH

disminuido ($< 7,2$) se observa cuando existe un déficit de la función de las vesículas seminales.

2.12.6. Concentración espermática

La concentración espermática (ESPZ /ml) es una de las pruebas de análisis seminal más importante. Existe una variabilidad muy grande en la concentración de un eyaculado a otro, siendo importante conocer el número de espermatozoides por eyaculado, ya que de este parámetro depende el número de hembras a inseminar. La concentración puede calcularse por varios métodos a partir de una muestra de semen. Entre estos métodos se destaca la espectrofotometría, la colorimetría, la citometría de flujo y el uso de la cámara para recuento celular como las de Bürker, Neubauer o Thoma (Woelders, 1990; Hafez; Hafez, 2000; Noakes *et al.*, 2001).

La espectrofotometría es un método indirecto, capaz de medir la luz monocromática absorbida por las partículas en suspensión o los espermatozoides. La medición de la densidad óptica de la muestra es comparada frente a una curva estándar patrón previamente validada. Esta comparación permite conocer el número de espermatozoides (Woelders, 1990; Noakes *et al.*, 2001). El método de citometría de flujo tampoco es realmente un método directo. Sin embargo, puede determinar el número de partículas por unidad de volumen, aunque no puede asegurar que todas estas partículas sean realmente espermatozoides (Woelders, 1990). En eyaculados de conejo esta técnica puede inducir a error debido a la gran cantidad de impurezas que presenta el semen (González-Urdiales; 2002).

El método más difundido es la utilización de la cámara de recuento celular. Este análisis se lleva a cabo mediante conteo en un microscopio óptico con el que se examina la muestra de semen previamente diluida con soluciones fijadoras (formaldehído, cloraceno, etc.). Los preparados se mezclan cuidadosamente y se cuentan en el microscopio óptico con un aumento de 100X o 400X, empleando por comodidad un contador manual. El conteo se puede realizar de varias maneras; contando todos los espermatozoides que se encuentran dentro de todos los cuadrados de la cámara o contando aquellos que están en los cuadrados externos y centrales (Figura 6). Se cuentan ambos hemicámaras del hemocitómetro y finalmente se calcula el promedio. Este método es económico y fácil de llevar a cabo (Hafez; Hafez, 2000), si bien el número de células contadas puede ser superior al de otros métodos (Woelders, 1990).

Los resultados obtenidos en la cámara de recuento celular presentan mayor coeficiente de variación (12,3%) que en el espectrofotómetro (2,9%) y que en la citometría de flujo (2,3%), lo cual ha llevado a afirmar que el espectrofotómetro y la citometría de flujo son las técnicas más precisas para el recuento espermático (Paulenz; Hofmo; 1996).

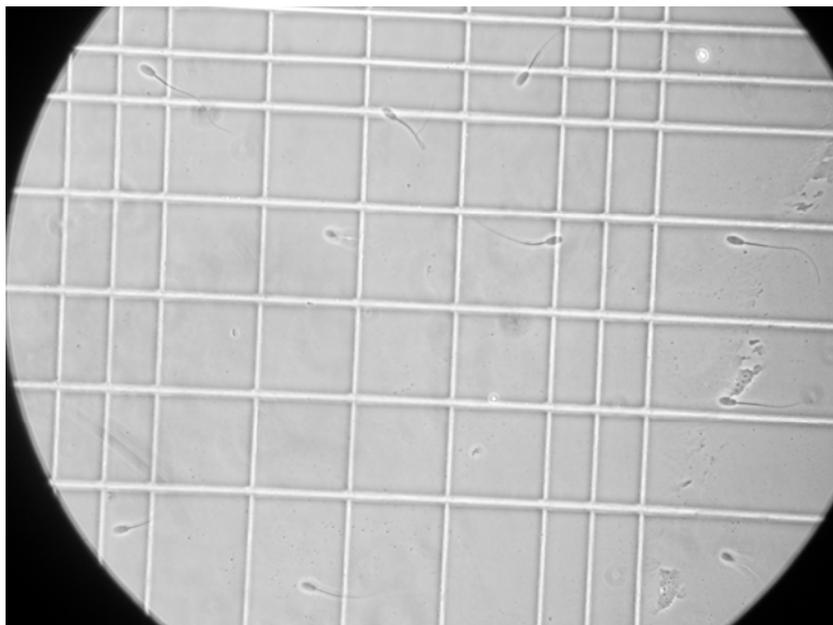


Figura 6. Foto de la Cámara de Thoma

La determinación de la concentración espermática por medio de estas cámaras tiene un considerable error que varía en relación directa con la reducción de la superficie considerada en el recuento. El error aumenta con la concentración de la muestra (cuando el volumen de semen en la dilución representa más del 7 o 10%). Si además se emplean cubreobjetos no calibrados éste puede ser mayor aún.

La determinación en cámara, bajo competentes condiciones de uso y con personal experimentado presenta una alta repetibilidad ($R = 0,989$). Posteriores estudios indicaron que la variación podía ser significativamente menor (Coeficiente de variación, $CV = 12,3\%$), indicando que la exactitud de la determinación varía con los laboratorios y el operador.

2.12.7. Total de espermatozoides (Concentración X Volumen)

El simple cálculo matemático de realizar el producto de la concentración por el volumen del eyaculado determina el número total de espermatozoides (ESPZ) de un eyaculado.

2.12.8. Viabilidad espermática - Integridad de la membrana espermática (Eosina-Nigrosina)

La integridad de la membrana espermática ha sido uno de los parámetros más estudiados, por su rol clave en la función del espermatozoide. De hecho, el estado de la membrana espermática marca la integridad morfológica y funcional de la célula (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1997). La evaluación morfológica se realiza usando la óptica de contraste diferencial de interferencia o de Nomarski, la óptica de contraste de fase o las tinciones supravitales como el verde rápido/eosina, la eosina/azul de anilina, el azul tripán/Giemsa o el amarillo de naftol/eritrosina. También el examen a través de la microscopía electrónica de transmisión o de barrido ha sido valiosa para determinar aspectos de integridad espermática (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2001). Sin embargo, la mayor parte de estas técnicas aportan sólo información estructural parcial, y suelen ser tediosas y costosas. Además, aún cuando algunas técnicas morfológicas informan de los daños de la membrana plasmática, estos resultados no siempre están correlacionados con la fertilidad del semen, a menos que el daño que presenten los espermatozoides sea muy importante (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2001). De hecho, posiblemente la tinción más utilizada es la eosina-nigrosina (Figura 7).



Figura 7: Tinción de eosina nigrosina en espermatozoide de carnero.

Esta técnica tiñe de color rosado aquellos espermatozoides que presentan una membrana alterada, mientras que los espermatozoides vivos se observan de color blanco sobre un fondo púrpura. Uno de los primeros autores que utilizó la eosina como colorante vital fue Murosoff en 1930 (García-Artiga *et al.*, 1994).

Posteriormente, son numerosos los trabajos de investigación que determinan las diferencias entre los espermatozoides viables y no viables dentro de un eyaculado utilizando esta tinción, conjuntamente con otras técnicas (Bamba, 1988).

2.13. Congelación del semen

La congelación del semen se realiza con el fin de preservar el material seminal para su utilización posterior. Para realizar la congelación del semen es necesario cubrir diversas etapas, como ser la dilución, la reducción de temperatura, la deshidratación intracelular, la congelación propiamente dicha y la descongelación de las células espermáticas para corroborar su viabilidad luego de la exposición a todo el proceso. Todo este conjunto de procesos, técnicamente es denominado criopreservación y representa una interrupción artificial del progreso de los ESPZ en las etapas de maduración y fertilización poseyaculación (Watson, 1995).

El primero que estudió el efecto de la temperatura por debajo de 0 °C sobre la viabilidad espermática fue Spallanzani en el año 1776 (Salamon; Maxwell, 1995). En el siglo XIX investigadores como Prévost (1840), De Quatrefages (1853), Mantegazza (1866), Schenk (1870) y Davenport (1897) experimentaron exponiendo espermatozoides a temperaturas entre 0°C y -30°C (Salamon; Maxwell, 1995). Ya en el siglo XX, en el año 1938, Jahnel demostró que el semen de humano podía ser congelado en hielo seco (-79 °C), nitrógeno líquido (-196 °C) o helio líquido (-296 °C) y logró mantener la motilidad espermática por más de 40 días luego de la congelación (Salamon; Maxwell, 1995).

El avance sobre congelación de semen de ovino ocurrió a fines de los años 1940 y la década del '50, destacándose el éxito de la congelación de semen de los mamíferos a partir del descubrimiento de las propiedades crioprotectoras del glicerol (Polge *et al.*, 1949) y el nacimiento de los primeros corderos a partir de inseminaciones con semen congelado en hielo seco (Smirnov, 1949; citado por Salamon; Maxwell, 1995)

La formulación de medios de dilución y crioprotectores que proporcionen la mejor sobrevivencia espermática posdescongelación y por lo tanto garanticen la fertilidad, es el sentido de la búsqueda actual de los investigadores.

Entre el año 1972 donde Salamon y Visser describieron el método de congelación de semen ovino en pastillas y la época actual, ha habido desarrollo de protocolos que abarcaron todos los aspectos de la criopreservación de ESPZ ovinos. Se elaboraron nuevos métodos de refrigeración (Fernández Abella *et al.*, 2001), de congelación

(Ollero *et al.*, 1998; D'Alessandro; Martemucci, 2001; Anel *et al.*, 2003), de descongelación (Holt; North, 1984), nuevos diluyentes (Fiser *et al.*, 1987; Upreti *et al.*, 1997; Paulenz *et al.*, 2003, Aisen *et al.*, 2005) y nuevos crioprotectores (Hellemann; Jara, 1997) como también se estudió el efecto del medio de incubación (Ashworth *et al.*, 1994; Martí *et al.*; 2003) y de las distintas temperaturas de congelación (Colas, 1975; Byrne *et al.*, 2000; Bag *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2003; Yániz *et al.*, 2005) y de descongelación (Söderquist *et al.*, 1997) sobre algunos parámetros de calidad y fertilidad de los ESPZ sometidos a todo el proceso de congelación y descongelación. A pesar de que algunos de estos investigadores obtuvieron mejores resultados, en realidad no ha habido muchas modificaciones a la metodología propuesta por Salamon y Visser (1972).

La base de los métodos usados corrientemente en la criopreservación de diferentes células y tejidos contempla una combinación de la velocidad de enfriamiento óptima y la adición de crioprotectores químicos.

2.13.1. Tasa de dilución

Las tasas de dilución que se utilizan para congelar semen ovino equivalen de 2 a 5 veces (v/v) dependiendo de la concentración espermática/ml deseada (Evans; Maxwell, 1990). En la mayoría de los protocolos de congelación, el enfriamiento se realiza en un solo paso, donde el semen diluido es enfriado gradualmente (0,2 °C/min.) desde 32 hasta 5°C. Una vez alcanzada esa temperatura, se agrega el glicerol a la muestra diluida, la cual debe permanecer a 5°C por un período de 2 h aproximadamente para su equilibramiento, previo a su envasado. Para el semen ovino se utiliza entre el 4 - 6% de glicerol en el diluyente (v/v) (Watson, 1995). Luego de este período y una vez comprobada la motilidad espermática, se confeccionan las pastillas o las pajuelas, para su posterior conservación directamente en N₂ líquido.

2.13.2. El proceso

La criopreservación del semen incluye una disminución y luego interrupción temporaria del metabolismo de las células espermáticas sometidas a bajas temperaturas, con el objeto de prolongar la vida desde que se obtiene el eyaculado hasta el momento de su utilización en inseminación o de la fertilización (Yoshida, 2000). Un ciclo de criopreservación óptimo debería conservar por tiempo ilimitado a la célula y preservar la mayoría de las células con integridad estructural y funcional,

asegurando su capacidad fertilizante después del proceso de descongelación (Watson, 1995).

Los ESPZ del ovino generalmente son más sensibles al daño físico y el nivel de daño es más intenso si se compara con aquellos del bovino (Salamon; Maxwell, 2000).

2.13.3. Diluyentes

Los diluyentes para la conservación del semen de ovino en estado líquido pueden ser sintéticos o naturales. Los primeros, generalmente contienen una fuente energética, un buffer o regulador de pH y un crioprotector.

Los diluyentes naturales utilizados son la leche de vaca entera o descremada, en polvo o tratada a muy alta temperatura (UHT) o la yema de huevo, éstos generalmente actúan como protectores de membrana. Para la congelación del semen los diluyentes utilizados deben contener elementos que contribuyan a disminuir el daño a las células durante el proceso de enfriado (Tabla 4).

Tabla 4: Principales componentes de los diluyentes para la congelación del semen

Elementos	Función
Lactosa, glucosa , rafinosa, fructosa, trehalosa, sacarosa	Fuentes de energía
Glicerol, etilenglicol, DMSO, polietilenglicol	Crioprotectores
Citrato de sodio, ácido cítrico	Balance Mineral
TRIS, TES	Buffer y regulación de pH
Leche descremada, yema de huevo	Protectores de membrana
Penicilina, estreptomina , gentamicina, lincomicina	Antibióticos

2.13.4. Crioconservantes.

Entre los crioconservantes debemos diferenciar los protectores endocelulares y los de membrana. Entre los primeros se encuentran los denominados crioprotectores, que a su vez se pueden clasificar, según su capacidad para penetrar las membranas celulares, en penetrantes y no penetrantes. Entre los penetrantes se encuentran el glicerol, el etilenglicol, el polietilenglicol y el DMSO (Dimetil Sulfoxido). Entre los no penetrantes, se encuentran la glucosa, la sacarosa, la galactosa, la polivinilpirrolidona y el alcohol polivinílico.

La capacidad para evitar los efectos de los cambios de temperatura que experimentan las células durante el proceso de congelación y descongelación, los cambios de volumen de la célula, la formación de hielo endocelular y los cambios en la cinética de la membrana plasmática son las propiedades que debe reunir una sustancia crioprotectora.

Para la congelación del semen de carnero, el glicerol agregado al diluyente en un solo paso a 30°C o en dos pasos, en concentraciones del 6 al 8 %, es el crioprotector más frecuentemente utilizado por los investigadores. La proporción en la que será utilizado en el diluyente dependerá de las tasas de enfriamiento y congelación, teniendo especial cuidado de su efecto tóxico en concentraciones altas (Fahy, 1986; citado por Salamon; Maxwell. 1995).

Salamon; Maxwell, (1995 y 2000) también citan al DMSO, usado en concentraciones entre 1,5 y 5%, al etilenglicol usado en concentraciones entre el 1,5 y el 3,5%, albúmina, propanodiol, adonitol, compuestos poliméricos, surfactantes, aloe vera y otros como agentes crioprotectores, usados solos o combinados con resultados diversos.

La trehalosa es un disacárido de la glucosa que ha sido incorporada al diluyente de semen protegiendo a los ESPZ de varias especies, durante el proceso de enfriamiento. Utilizada en el diluyente para criopreservar semen de ovino y luego de una inseminación se obtuvieron entre el 45-47% de corderos destetados. (Aisen *et al.*, 2002). Las propiedades antioxidantes de la trehalosa sobre los fosfolípidos de membrana fueron comprobadas por (Aisen *et al.*, 2005) cuando fue adicionada al diluyente, lo que permite pensar su acción protectora sobre la membrana plasmática.

En cuanto a los protectores de membrana el diluyente natural más utilizado es la leche (entera, descremada, en polvo) de vaca, la que debe calentarse a 92-95 °C durante 8-10 minutos para desactivar los factores tóxicos de su fracción proteica (lactenina). La leche UHT constituye la alternativa para utilizarla directamente como diluyente debido a su esterilidad.

La yema de huevo es el componente más utilizado para proteger la membrana de los ESPZ contra el choque térmico por frío y se la incluye en los diluyentes para criopreservación del semen. Watson (1981b) concluyó que los fosfolípidos de la fracción lipoproteica de baja-densidad de la yema de huevo proporcionan protección a la membrana espermática aunque discute la efectividad de su efecto protector en todas las especies (Watson, 1995). Esta fracción sirve para solubilizar los lípidos y unirlos a la membrana celular. Salamon y Maxwell, (2000) postulan que actuaría a nivel de la membrana plasmática de los ESPZ previniendo la pérdida de lípidos de la misma durante el choque térmico por frío.

En los últimos tiempos han aparecido en el mercado internacional medios de dilución definidos que no contienen proteínas de origen animal, atribuyéndoles ventajas frente a los preparados artesanales, por contar con una mejor

estandarización y estar sanitariamente libres de contaminantes, además de la posibilidad de usarlos sin el agregado de antibióticos y que permiten una mejor visualización al microscopio óptico del semen diluido con estos productos. Estos diluyentes fueron ampliamente utilizados en el bovino, con resultados en la criopreservación semejantes a los diluyentes que incluyen yema de huevo. En ovinos, Meque (2004) utilizó un diluyente a base de leche de soja obteniendo buenos resultados equivalentes en la refrigeración de semen ovino.

2.13.5. Curva de enfriado

Las características biofísicas y bioquímicas de la membrana plasmática de los ESPZ difieren entre las especies y entre los individuos de una misma especie. Los ESPZ de los mamíferos son muy sensibles al enfriamiento desde la temperatura corporal hasta el punto de congelación del agua (Parks, 1997). Un protocolo de criopreservación que contemple la integridad estructural sin producir daños a los ESPZ es inexistente. Durante el proceso de enfriado y posterior congelación, los ESPZ son expuestos a estrés osmótico durante la entrada y/o salida de los crioprotectores, a la toxicidad de los mismos, a la formación de cristales de hielo intra y extracelular, a alteraciones en la estructura y función de la membrana plasmática y eventualmente a la pérdida y desintegración del acrosoma.

El enfriamiento trae aparejado un proceso de adaptación del espermatozoide a la sobrevivencia con un metabolismo reducido (Salamon; Maxwell, 2000). El enfriamiento del semen desde 37 hasta 5°C produce un tipo de alteración específica relacionada con transiciones de fase de lípidos de la membrana plasmática y es muy diferente de aquella causada por congelación y descongelación, la cual incluye cambios mecánicos y osmóticos (Ollero et al., 1998).

El enfriamiento produce un aumento en el número de ESPZ muertos, aunque de menor magnitud que la congelación y descongelación posterior; sin embargo, permite obtener tasas de fertilidad aceptables cuando el semen es depositado por la vía cervical y cuando no se superan las 24 h del enfriado después de la eyaculación. Luego de este período, la fertilidad se reduce (Maxwell; Salamon, 1993; citados por Maxwell; Evans, 2000).

El enfriamiento muy rápido entre los 32 y 0 °C del semen de ungulados, induce estrés, el cual puede resultar letal en algunas células. La tasa de enfriamiento y el rango de temperatura es directamente proporcional al grado de estrés que se provoca (Watson, 1981a).

El enfriamiento previo a la congelación, establece la necesidad de un cuidadoso manejo para evitar la aparición del fenómeno conocido como choque térmico por frío ("cold shock"). Este fenómeno afecta en forma variable a las diferentes especies y se denomina así al daño que exhiben las células espermáticas ante la rápida disminución de la temperatura en un rango que oscila entre los 32 y los 0°C. Los ESPZ experimentan una mayor pérdida de la integridad de membrana y de la funcionalidad al ser rápidamente enfriados en un rango desde 20 a 0°C (Watson, 1995). La mayor severidad de los efectos negativos se observa en un rango entre los 12 a 2°C (Watson, 1981a), aunque Drobnis *et al.* (1993) sostienen que el principal cambio de fase ocurre entre los 15 a 5 °C.

Debido a que probablemente se produzcan cambios en el orden de los constituyentes de la membrana, el choque térmico por frío produce daño en las membranas celulares y alteración en su función metabólica (Parks, 1997). Los efectos del estrés térmico por frío producen una pérdida de selectividad en la permeabilidad de la membrana y ultraestructuralmente, se manifiestan por una disrupción de la membrana acrosomal (Medeiros *et al.*, 2002). Por ello, la tasa o velocidad de descenso de temperatura no debe exceder 0,5°C/min en la etapa de que va desde los 32° hasta 15°C (enfriamiento primario). Entre los 15 y 5°C (enfriamiento secundario) es aconsejable una pérdida promedio de alrededor de 0,2°C/min lo que permite lograr todo el proceso (incluye enfriamiento primario y secundario) en 1,5 - 2 horas.

2.13.6. Equilibramiento

Es la etapa en la cual el espermatozoide debe permanecer en contacto con el glicerol previo a la congelación y tiempo en el cual penetrará en la célula para establecer una concentración intra y extracelular balanceada (Salamon; Maxwell, 2000). Para el cumplimiento del fenómeno descrito anteriormente, el semen diluido y enfriado a 5°C es mantenido a esa temperatura durante un período de 2 a 3 horas, para continuar con la acción del glicerol y la estabilización térmica de todo el sistema (semen + diluyentes).

2.13.7. Congelación propiamente dicha

Cuando las células son conservadas por debajo de los 0°C, se producen efectos relacionados con la formación de cristales de hielo y el aumento de la presión osmótica, que repercuten principalmente sobre la estructura de su membrana

plasmática. Mazur (1984) expuso que el daño primario sobre la membrana plasmática ocurre durante los procesos de congelación y descongelación entre los -15 y -60 °C. También sostuvo que a -196 °C hay insuficiente energía térmica para la ocurrencia de reacciones bioquímicas. Se cree que la tasa óptima en la fase de enfriamiento final (proceso de congelación) entre los -5 y -45°C está entre los 10 y 80°C/min. No obstante, existen interacciones con la tasa de recalentamiento y con la composición del diluyente (Watson, 1995).

La naturaleza de las lesiones primarias sufridas por las células durante la congelación y la descongelación es desconocida, a pesar que la membrana plasmática a menudo es considerada como el sitio primario de daño por congelación (McGann *et al.*, 1988). Las alteraciones en las asociaciones lípido-lípido y lípido-proteína requeridas para el funcionamiento normal de las membranas, en las etapas de enfriamiento y calentamiento de las células, estarían reorganizando los lípidos y en ese momento están muy comprometidas (Parks ; Graham, 1992).

El daño primario que sufren las células por congelación se debe a una disrupción de la membrana plasmática debida al estrés térmico, mecánico, químico y osmótico ejercido sobre la misma (Mazur, 1984). También, este autor sostiene que el daño primario se debe a la relación entre la deshidratación celular y a la formación de hielo intracelular, ambos fenómenos difícilmente se puedan aislar y ocurren simultáneamente. También puede ocurrir estrés osmótico endocelular, formación de cristales de hielo en el medio extracelular, cambio de fase líquida cristalina a una fase de gel, generación de una estructura de tipo hexagonal en la membrana, adición de otros lípidos no constituyentes de la membrana, (Quinn, 1989; Parks; Graham, 1992; Müller *et al.*, 1999).

El estrés de la membrana espermática puede continuar por debajo de los 0°C ya que los cambios de fase no son completados a esa temperatura. Incluso, durante el enfriamiento lento, los cambios de temperatura inducen estrés sobre las membranas. Según Watson (2000), el daño de membrana resulta de una sucesión de eventos de separación de fases en la bicapa lipídica.

La membrana plasmática y la membrana acrosomal son más sensibles que la membrana nuclear y que la perteneciente a la parte locomotora (pieza intermedia) del espermatozoide. Por su parte, la membrana acrosomal externa es más vulnerable que su contraparte interna. La arquitectura mitocondrial posdescongelación es alterada, aunque las fibrillas y filamentos del flagelo espermático no muestran cambios. (Salamon; Maxwell, 2000). Los efectos de la criopreservación resultan, en general, en

una “menor aptitud fertilizante” en comparación con los ESPZ frescos de un eyaculado.

2.14. Evaluación del semen congelado

Los aspectos de funcionalidad espermática más fácilmente examinados incluyen: la motilidad espermática, la integridad de la membrana plasmática, acrosomal y mitocondrial, la posibilidad de comprobar la reacción acrosómica y más recientemente se incluyen pruebas de condensación de la cromatina nuclear.

2.14.1. Descongelación.

Los diferentes mecanismos de descongelación han sido descritos por Salamon; Maxwell (1995). Durante el proceso de congelación y descongelación, la fase de calentamiento es tan importante como la de enfriamiento. Los ESPZ que sobreviven al enfriamiento a -196°C aún deben enfrentar el calentamiento y la descongelación y atravesar por segunda vez, la zona de temperatura crítica (-60 a -15°C) (Salamon; Maxwell, 2000).

La temperatura adecuada para la descongelación del semen depende del método de envasado del mismo. En ovinos la descongelación se debe realizar entre 38 y 42°C en semen congelado en pajuelas y 37°C para el caso de semen congelado en pastillas pudiendo realizarse tanto en solución como en tubo seco.

A pesar de que Salamon; Maxwell (2000) observaron mejores tasas de motilidad espermática posdescongelación a 75°C durante 15 segundos respecto de 37°C durante 1 minuto, resulta más seguro descongelar semen alrededor de los 37°C para evitar la exposición celular a temperaturas no fisiológicas que puedan ser fatales para las mismas.

2.14.2. Redilución

Los ESPZ congelados en pastillas pueden ser descongelados utilizando soluciones en proporciones no mayores a 3 veces su volumen congelado, siempre y cuando se piense utilizarlo en inseminación. En investigación se han probado numerosos medios de dilución dependiendo de los fines evaluativos a los que se expone las muestras. Algunos ejemplos son el citrato de sodio al 2,92%, solución isotónica (Harrison; Vickers, 1990).

2.14.3. Motilidad Individual.

La evaluación de la motilidad espermática es ampliamente utilizada para la evaluación del semen congelado y luego descongelado, siendo la forma más sencilla de precisar en forma aproximada la supervivencia espermática posdescongelación (Evans; Maxwell, 1990). D'Alessandro; Martemucci, (2001) sostienen que la motilidad espermática a 37°C e integridad del acrosoma, representan la calidad del semen desde el punto de vista de la funcionalidad celular.

Otra forma de evaluación es la citometría de flujo, siendo frecuentemente utilizada como alternativa a la microscopía, no obstante esta última es esencial para la evaluación de los detalles de estructura celular (Holt, 2000).

En promedio, entre el 40-50% de la población espermática no sobrevive a la criopreservación, incluso usando protocolos optimizados, y además, la población sobreviviente se encuentra alterada (Watson, 2000). A pesar que una alta proporción de ESPZ congelados conservan su motilidad posdescongelación (40-60%), la proporción de células con motilidad progresiva se encuentra reducida (Maxwell y Watson, 1996) y aproximadamente el 20-30% permanecen biológicamente intactos (Salamon; Maxwell, 2000).

2.14.4. Estado del acrosoma.

El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación y esta importancia hace que convenga realizar una valoración específica del mismo. En un espermatozoide que tenga el acrosoma en perfectas condiciones se pueden distinguir tres regiones claramente diferenciadas en la cabeza: la zona acrosomal, con su borde apical, la zona postacrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas. Las muestras seminales con alta proporción de acrosomas alterados o ausentes suelen tener una fertilidad baja. Para determinar el estado del acrosoma se han usado desde hace mucho tiempo diferentes tinciones. Entre éstas tenemos la tinción de Giemsa (Watson, 1975), la eosina fast green (Wells; Awa, 1970), la eosina/nigrosina (Bamba, 1988), las dobles y triples tinciones basadas en la combinación de azul tripán con otros colorantes (Talbot; Chacon, 1981; Vázquez *et al.*, 1992; Rodríguez-Gil *et al.*, 1994) y tinciones comerciales como el Spermac (Oettlé, 1986). También se han utilizado anticuerpos acrosomales específicos marcados con fluorescencia (Blach *et al.*, 1988). Sin embargo, la manera más rápida de determinar el estado del acrosoma en aquellas especies donde el espermatozoide es lo suficientemente grande como para permitirlo, es fijar la muestra en una solución de glutaraldehído y seguidamente visualizar de

forma directa la estructura acrosomal en un microscopio con contraste de fase. Con este sistema se observa un borde apical nítido que se corresponde con el acrosoma, así como las posibles alteraciones del mismo. El estado del acrosoma también puede ser evaluado mediante el empleo de lectinas, que, junto con el yoduro de propidio, permiten estudiar el proceso de reacción acrosómica. Las lectinas también se han venido utilizando desde hace más de una década debido a su capacidad de adherirse a las glicoproteínas específicas del acrosoma, permitiendo así un adecuado estudio de su funcionalidad (Cross; Meizel, 1989). Estas técnicas han sido validadas para semen equino (Farlin et al., 1992; Casey et al., 1993; Meyers et al., 1995); ovino (Maxwell; Johnson, 1997) y de verraco (Vázquez et al., 1996).

2.14.5. Actividad bioquímica de la membrana plasmática

La membrana espermática es una estructura dinámica que participa en el transporte de moléculas. Estas funciones permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio circundante, proporcionando así un sistema molecular para el reconocimiento del oocito (Hammerstedt *et al.*, 1990). La evaluación de la integridad de membrana constituye una información importante en la evaluación de la fertilidad del macho (Jeyendran et al., 1984). Esta integridad es fundamental para el metabolismo espermático y para una adecuada capacitación y reacción acrosómica, garantizando la fertilidad del macho (Yanagimachi, 1993). La funcionalidad espermática puede ser probada a través de la resistencia osmótica que ha generado gran interés por su simplicidad y su valor predictivo. Drevius; Eriksson (1966) demostraron la capacidad del espermatozoide de toro, conejo y hombre para captar agua en un medio hiposmótico. Estos autores observaron que la hinchazón osmótica está asociada con el enrollamiento de la cola del espermatozoide, que se desdobra cuando la célula es colocada nuevamente en un medio isoosmótico. Estos cambios fueron confirmados por otros autores que relacionaron este fenómeno con la capacidad funcional de la membrana del espermatozoide humano, observando una alta correlación entre la capacidad de hinchamiento del espermatozoide humano en un medio hiposmótico y su capacidad de penetración en oocito de hámster libre de zona pelúcida (Foote; Bredderman, 1969; Mahi; Yanagimachi, 1973; Jeyendran *et al.*, 1984). Dentro de las pruebas desarrolladas a partir de este fenómeno se destacan dos: el test de endósmosis y el test de resistencia osmótica.

El test de endósmosis (Hypoosmotic Swelling test, HOST) consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que

causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo. Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe de estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. La entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentarán cambios en la forma del flagelo (Pérez-Llano *et al*, 1998c). Los valores obtenidos en esta prueba se correlacionan con otros parámetros de calidad seminal, como la motilidad, la viabilidad o la morfología. Esta prueba se ha aplicado en el semen del hombre (Zaneveld Jeyendran, 1990; Jeyendran *et al*, 1992; Van den Saffele *et al*, 1992), del toro (Correa; Zavos, 1994; Correa *et al*, 1997), del perro (Kumi-Diaka, 1993; Kumi-Diaka; Badtram, 1994; Rodríguez-Gil *et al*, 1994; Sánchez *et al*, 2002), del padriño (Von Buiten *et al*, 1989; Caiza de la Cueva., 1997 a y b) y del verraco (Vázquez *et al*, 1996; Vázquez *et al*, 1997b; Pérez Llano *et al*, 1998 a y b). Por otra parte, presenta una elevada correlación con el test de penetración en ovocito de hámster en semen humano (Jeyendran *et al*, 1984). En humanos se ha encontrado una correlación elevada entre los resultados de HOST y los obtenidos en fecundación *in vitro* (Van der Ven *et al*, 1986). En cerdos, si la presión osmótica es demasiado baja, la membrana plasmática se rompe y el flagelo aparece de nuevo recto, por lo que se confundiría con un espermatozoide que aún no ha reaccionado (Pérez-Llano *et al*, 1998b). En esta especie, el HOST detecta una subpoblación de espermatozoides “no viables” que no reacciona al test, siendo así una prueba más sencilla a la hora de evaluar la viabilidad que la tinción de eosina-nigrosina o las tinciones fluorescentes (Pérez-Llano *et al*, 2003). En la especie humana, el HOST parece ser un buen método predictivo de la capacidad fecundante *in vitro* e *in vivo* del semen (Check *et al*, 1989; Zaneveld; Jeyendran, 1990; Verheyen *et al* 1997), sin embargo, no todos los autores avalan estos resultados (Rogers; Parker, 1991).

En los espermatozoides funcionalmente alterados no se produce la captación selectiva de agua de forma adecuada, alcanzándose así un equilibrio pasivo entre los medios intra y extracelular que no provoca cambios morfológicos apreciables. Por otra parte, el hinchamiento de las células se puede provocar mediante otras vías distintas al descenso de la osmolaridad del medio que rodea a las mismas. Soluciones isosmóticas de solutos polares como el glicerol, pueden provocar el hinchamiento celular debido a la capacidad de estas sustancias de arrastrar agua cuando atraviesan la membrana celular, alterando así el equilibrio de las presiones osmóticas internas y

externas (Hammerstedt *et al*, 1990). De esta manera, las alteraciones celulares atribuidas al glicerol, parecen estar más relacionadas con un shock osmótico que con la toxicidad química (Watson, 1979; Critser *et al*, 1988; Frim; Mazur, 1983; Gao *et al*, 1992). A pesar de todo ello, todavía existe un gran desconocimiento sobre los mecanismos moleculares específicos que el espermatozoide utiliza para reaccionar frente a un medio hiposmótico.

El test de resistencia osmótica está basado en el porcentaje de espermatozoides que presentan alteración estructural a nivel del acrosoma, luego de incubarlos en un medio hiposmótico (Schilling *et al*, 1984; 1986; Tamuli; Watson, 1992; Correa; Zavos, 1994; Gil *et al*, 2000). Esta prueba se denomina test de resistencia osmótica (ORT) y presenta una correlación negativa con la capacidad fecundante del espermatozoide (Schilling; Vengust, 1985; Schilling *et al*, 1986). Además, existe una variante de esta prueba, denominada ORT corto (ORTC), en donde el período de incubación se redujo a 5 minutos, de manera de facilitar el uso en investigación o centros de producción (Pérez-Llano *et al*, 1998 c), lográndose similares resultados.

2.14.6. Sobrevivencia espermática

La viabilidad espermática puede determinarse por otras técnicas, además de la eosina-nigrosina. Actualmente se están utilizando también diversas tinciones fluorescentes, las cuales presentan una mayor precisión en el estudio de las características de la membrana espermática (Harkema; Boyle, 1992; Magistrini *et al*, 1997). Así, se ha utilizado ampliamente el diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) y el yoduro de propidio (PI), con estas técnicas se visualizan los espermatozoides funcionales de color verde frente a los espermatozoides muertos que se observan de color naranja. El fundamento de esta prueba consiste en que la CFDA se hidrolisa por la acción de la esterasa intracelular, con la consecuente liberación de la carboxifluoresceína. Ésta es retenida en la célula si las membranas están intactas y emite fluorescencia verde (células viables) cuando es excitada con luz UV. En cambio el PI entra solamente a las células con membrana dañada, uniéndose con el ADN del núcleo y emitiendo una fluorescencia roja (células no viables).

2.14.7. Actividad Mitocondrial

La actividad mitocondrial usando marcadores fluorescentes fue estudiada por Garner *et al*, (1997), Windsor (1997), Thomas *et al*, (1998), Nagy *et al*, (2003). Entre los *marcadores* utilizados se encuentran la Rhodamina 123 (RH 123), que es un

compuesto catiónico que tiene la capacidad de atravesar las membranas y unirse a las mitocondrias (Windsor; White, 1993; Chem, 1988; Al-Rubeai *et al*, 1993). La actividad mitocondrial de los espermatozoides congelados y luego descongelados se puede determinar a través de un test que emplea la coloración de Rhodamina 123 (Rh 123) en combinación con yoduro de propidio (PI) (Grasa *et al*, 2004). El fundamento de esta prueba consiste en que la Rh 123 es un fluorocromo lipofílico y de naturaleza catiónica que se acumula selectivamente en el interior de las mitocondrias activas, atraídas por el potencial de membrana mitocondrial, generando fluorescencia verde a nivel de la porción intermedia de los espermatozoides (Rh+). Los espermatozoides que no emiten fluorescencia a este nivel, se consideran como no reactivos (Rh-).

Evenson *et al*, (1982) probaron simultáneamente la viabilidad de los ESPZ y la actividad mitocondrial usando el fluorocromo bromuro de etidio o yoduro de propidio en combinación con la rhodamina 123. Posteriormente Magistrini *et al*, (1997) confirmaron que puede usarse para probar la viabilidad de los ESPZ congelados. El PI entra en las células con membranas dañadas, uniéndose al ADN del núcleo y emitiendo una fluorescencia roja (células no viables).

2.15. Cinética espermática

Los ESPZ de mamíferos adquieren la capacidad de movimiento durante el transporte por el epidídimo. La motilidad flagelar es estimulada tras la eyaculación, modulándose durante el tránsito a través del tracto reproductivo de la hembra (Davis; Siemers, 1995). El tránsito de los ESPZ a través del tracto genital de la hembra implica cambios secuenciales importantes en los patrones de motilidad espermática. Estos cambios reflejan modificaciones en la actividad metabólica de los ESPZ, puesto que la motilidad es la principal causa del consumo energético espermático (Roldan *et al*, 1998). Por lo tanto, en un eyaculado fértil debe existir un alto porcentaje de ESPZ capaces de llevar a cabo estos cambios de motilidad. La profundización en los estudios sobre el control de la motilidad es importante para llevar a cabo un buen diagnóstico de la capacidad fecundante de un eyaculado (Katz; Overstreet, 1980).

Hasta hace pocos años, el estudio de la motilidad espermática se hacía exclusivamente mediante métodos subjetivos semicuantitativos. Estos métodos evalúan el porcentaje de espermatozoides móviles, así como el tipo de movimiento que presenta la media de una población espermática (Vázquez *et al*, 1997a). Estas medidas ofrecen una descripción general de la motilidad espermática, pero la exactitud

y precisión están limitadas por las condiciones del sistema de medida y por la destreza del observador (Deibel *et al*, 1976). A pesar de ello, la valoración subjetiva de la motilidad por personas experimentadas es de gran valor, debido a que la información se presenta de forma inmediata al tiempo que es un método económico y fácil en su ejecución (Davis; Siemers, 1995). El análisis de la motilidad *de visu* a campo o en el laboratorio, es el método más usado hoy en día para la evaluación de la motilidad. No obstante, hay que ser conciente que la subjetividad del método puede llevar a la obtención de resultados dispares para una misma muestra (Vázquez *et al*, 1997a).

Los primeros intentos de objetivizar el movimiento espermático se basaron en exposiciones fotográficas múltiples o en video-micrografías. Estos métodos son tediosos, largos y costosos, por lo que hoy en día no son de elección (Boyers *et al*, 1989). Sin embargo, la aparición de los sistemas informatizados de digitalización de imágenes abrió un nuevo campo en el estudio de la motilidad de los espermatozoides. Estos sistemas, denominados genéricamente CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), han automatizado y simplificado el proceso. El análisis computarizado de la motilidad fue propuesto por primera vez en 1979 (Dott; Foster, 1979) y es usado actualmente en centros de investigación en espermatología y en centros de reproducción. Las imágenes obtenidas permiten evaluar varios parámetros, incluyendo concentración, morfología y movimiento espermático. El CASA establece, de una manera efectiva medidas cuantitativas del movimiento individual de los espermatozoides (Mortimer, 2000). Con este tipo de análisis se espera obtener medidas correctas de la motilidad espermática que proporcionen información precisa acerca del estado funcional del axonema y de las membranas espermáticas.

Cuando el análisis se hace en condiciones óptimas, las medidas detalladas de la motilidad proporcionan información que predicen la función espermática (Davis; Siemers, 1995). La exactitud de los valores obtenidos por técnicas cinemáticas está limitada por factores técnicos y biológicos. La interpretación de los datos es dependiente del conocimiento que se tenga de las condiciones del análisis (Mortimer, 2000 y 2002).

2.15.1. El equipo y los parámetros que mide

Los sistemas automáticos de medición se basan en la captura sucesiva de imágenes de espermatozoides en movimiento a través de un microscopio. Estas imágenes se digitalizan identificando las células espermáticas que contienen la primera imagen. Luego se procede al seguimiento de estas células en imágenes

sucesivas y al establecimiento de las trayectorias definitivas. Las trayectorias se procesan matemáticamente, obteniendo así resultados numéricos precisos (Krause, 1995). Los parámetros determinados para cada espermatozoide son: la velocidad del movimiento en base a varios descriptores, la trayectoria que realiza la cabeza del espermatozoide y la frecuencia de los cambios de dirección que ésta realiza (Serres *et al*, 1984). Los descriptores del movimiento espermático obtenidos en el CASA han sido descritos por Boyers *et al*, (1989). Actualmente, también existen en el mercado varios tipos de equipos de CASA que capturan el movimiento espermático y lo analizan, tanto a tiempo real como de manera diferida, aportando un gran volumen de información.

De una manera global, este último sistema consta de un microscopio con contraste de fase conectado a una platina atemperada que permite mantener las muestras a 37°C, una cámara de vídeo de alta resolución conectada a un monitor y un software de análisis de imágenes por computadora (Figura 8).



Figura 8. Componentes del sistema CASA

La muestra de semen es previamente diluída en un medio adecuado, con el microscopio a 100-200 aumentos y su sistema de video se procede a la captura de imágenes. La información es guardada hasta su análisis y luego de ser procesada, es transferida a un procesador matemático que fragmenta la motilidad espermática en diversas variables de la motilidad individual que caracterizan la linealidad, la angularidad del movimiento espermático y el desplazamiento de la cabeza del espermatozoide.

El sistema CASA (Hamilton Thorne, IVOS Versión 10, CASA, Berkley, CA, USA) utilizado en esta tesis, describe más de 11 parámetros de motilidad (Tabla 5), y la

captura de las imágenes se basa en el análisis de fotografías de alta resolución, digitalizadas y tomadas en un tiempo de procesamiento de 5 segundos por muestra. Se han comparado datos utilizando diferentes sistemas disponibles en el mercado y se ha demostrado que no hay muchas diferencias en los resultados (Verstegen *et al*, 2002). En cambio, se han encontrado grandes diferencias entre los operadores y la metodología de preparación de la muestra a analizar (Verstegen *et al*, 2002).

Tabla 5. Parámetros de motilidad que se evalúan mediante CASA.

Abreviatura	Castellano	Unidad
MT	ESPZ móviles	%
MP	ESPZ móviles progresivos	%
VAP	Velocidad promedio	$\mu\text{m}/\text{seg}$
VSL	Velocidad lineal	$\mu\text{m}/\text{seg}$
VCL	Velocidad curvilínea	$\mu\text{m}/\text{seg}$
ALH	Amplitud lateral	$\mu\text{m}/\text{seg}$
BCF	Frecuencia del movimiento del flagelo	Hz/seg
STR	Porcentaje de rectilinealidad	%
LIN	Porcentaje de linealidad	%
ELO	Porcentaje de elongación	%
AREA	Área recorrida	μm^2

2.15.2. Factores que afectan la motilidad espermática medida por CASA

Como se ha descrito anteriormente, existen una serie de factores biológicos y técnicos que afectan a los resultados presentados por el CASA. Según Verstegen *et al*, (2002), entre los principales factores de los que depende el resultado final, están la temperatura del semen, el volumen analizado, el tipo de cámara utilizada, el tiempo que transcurre entre la descongelación y el análisis, la concentración espermática de la muestra, el diluyente utilizado, posibles patologías existentes, el tipo de objetivo utilizado y la iluminación del microscopio, los valores de configuración asociados al CASA y el área de las partículas analizadas.

2.15.3. Aplicación del CASA.

La existencia de ESPZ con características funcionales y de motilidad diferentes dentro de un eyaculado es un fenómeno bien conocido (Chang; Hunter, 1975; Bedford, 1983; Renard *et al*, 1996; Holt, 1996; Abaigar *et al*, 1999 y 2001; Rigau *et al*, 2001). El papel que puedan tener los grupos de ESPZ con características de motilidad similares, en la calidad seminal global de un eyaculado, no ha sido bien estudiado hasta el momento. Parece evidente que, cambios entre las proporciones de diversas subpoblaciones

dentro de un mismo eyaculado ha de tener consecuencias en la calidad total. El principal problema que existe para el estudio de estas subpoblaciones es su caracterización, puesto que, hasta el momento, no existen herramientas suficientemente eficaces para ello (Quintero-Moreno *et al*, 2003). Esta situación ha cambiado con la aparición de los sistemas CASA, los cuales permiten diferenciar a los espermatozoides de una manera individual por sus características de motilidad, siempre y cuando se asuma que la motilidad individual es una de las características importantes que definen la funcionalidad de un espermatozoide (Rodríguez-Gil, 2000).

La importancia real de estudiar los espermatozoides en un eyaculado, no como un conjunto homogéneo, sino como el resultado de la combinación de diversas subpoblaciones heterogéneas, no es evidente a simple vista. Continúa siendo más simple trabajar con resultados medios de los valores obtenidos en la población entera, pero existe una razón muy importante que explica la necesidad de estos estudios. La consecuencia de ello es que, la aplicación de unos tratamientos estadísticos basados en asumir que las poblaciones espermáticas son homogéneas, tal y como se hace rutinariamente, implicará una pérdida considerable de información revelante, ya que quizás sólo una parte de la población espermática será realmente fecundante (Quintero-Moreno *et al*, 2003).

Por lo tanto, si esta subpoblación predominante no es demasiado grande, sus características se verán totalmente enmascaradas por el resto de la población si los resultados son tratados de una manera global dentro del eyaculado. Este hecho quizás explique fenómenos como la poca validez que tiene el estudio de la motilidad global de un eyaculado en algunas especies. Técnicas como el CASA pueden permitir el reconocimiento de estas subpoblaciones marcadoras de la calidad seminal, y de esta manera, el estudio concreto de las células seguramente mejorará la capacidad de diagnóstico del análisis seminal (Rodríguez-Gil, 2000).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de trabajo

Los experimentos se realizaron en las instalaciones del Grupo de Biotecnología de la Reproducción (EEA Balcarce, INTA), ubicadas en el kilómetro 73,5 de la Ruta Nacional 226, partido de Balcarce en la Provincia de Buenos Aires, Argentina (37°45' latitud sur, 58°18' longitud oeste).

3.2. Época del año

El trabajo se desarrolló entre el 21 de Diciembre de 2005 y el 20 de Diciembre de 2006.

3.3. Datos meteorológicos y ambientales

Durante la época del año en que se realizó el trabajo, se registraron las temperaturas mínimas, máximas y medias, humedad relativa, radiación solar, precipitaciones, datos que fueron provistos por la estación meteorológica de la EEA INTA Balcarce y los horarios de salida y de entrada del sol y horario de inicio del crepúsculo civil matutino y de finalización del crepúsculo civil vespertino provistos por el Servicio Nacional de Hidrografía Naval.

3.4. Animales.

Se utilizaron cinco carneros adultos de raza Pampinta ($\frac{3}{4}$ *Öst-Friesisches Milchschaaf* : $\frac{1}{4}$ *Corriedale*) y seis carneros adultos de raza Corriedale, de 4 a 6 años de edad.

3.5. Alimentación

Los animales permanecieron en condiciones de pastoreo y corral. Desde las 08:00 AM hasta las 04:00 PM pastorearon diariamente una pradera compuesta por Festuca alta (*Festuca arundinacea*, Schreb) y Trébol Blanco (*Trifolium repens*). Posteriormente se ubicaron en corrales donde se alimentaron *ad libitum* con silo de planta entera de maíz desde la 04:00 PM hasta las 08:00 AM del día siguiente.

3.6. Sanidad y manejo

Antes de iniciar el ensayo, a todos los animales se les extrajo sangre para análisis de *Brucella ovis* y *Brucella melitensis*. También se implementó un programa de

seguimiento y control preventivo de parásitos internos y externos. Se realizaron extracciones de heces para control de HPG (huevos de parásitos por gramo de materia fecal) cada 45 días y en el caso necesario se instrumentó el plan antiparasitario correspondiente. Al inicio de cada estación los animales fueron esquilados y despezñados.

3.7. Mediciones sobre los animales

3.7.1. Peso vivo

Los animales fueron pesados individualmente cada catorce días, con una báscula electrónica con capacidad para 1500 Kg y sensibilidad de ± 100 g. A la misma se le adaptó un brete con piso, de manera tal que los animales entraran en él por sus propios medios. Todas las pesadas se realizaron a las 9:00 AM, después de haber permanecido la noche encerrados, con ración y agua a voluntad.

3.7.2. Condición corporal

Se determinó utilizando la técnica de palpación sobre las vértebras lumbares, aplicándose subjetivamente la escala de 0 al 5 (sensibilidad $\pm 0,5$) propuesto por Jefferies (1961) y adaptada por Russel (1969). Esta determinación se realizó cada 14 días.

3.7.3. Circunferencia escrotal

Se utilizó un escrotímetro metálico y se midió la circunferencia (cm) de ambos testículos en el ecuador testicular, cada catorce días.

3.7.4. Prueba de capacidad de servicio

Una vez por mes, los carneros fueron evaluados para determinar su libido utilizando ovejas ovariectomizadas. Cada carnero fue expuesto a tres ovejas simultáneamente durante 20 minutos, registrándose el número de montas y el número de cópulas completas (Holmes, 1986).

3.7.5. Testosterona plasmática

La sangre se extrajo de la vena yugular en tubos heparinizados que inmediatamente fueron centrifugados a 600 xg durante 10 minutos. El plasma obtenido fue almacenado a $- 20$ °C hasta la determinación de testosterona (ng/ml). Estos

muestreos se realizaron cada 14 días. Se utilizó la técnica de RIA y todas las muestras fueron procesadas por duplicado con un coeficiente de variación intra-ensayo menor al 8 % para concentraciones comprendidas entre 0,2 y 16 ng/ml.

3.8. Obtención y valoración del semen:

3.8.1. Colecta de semen

Se colectaron 2 eyaculados por carnero con intervalo de 1 hora, dos veces por semana, durante seis semanas continuas dentro de cada estación. Para ello se utilizó vagina artificial (41 °C) y tubos graduados precalentados a 30 °C. Como súcubo para la extracción fue utilizada una oveja ovariectomizada. La recolección se realizó después de cinco minutos de pre-excitación y de una falsa monta previa. El tubo con el semen recién extraído fue inmediatamente transferido al laboratorio y colocado a Baño María (BM) a 32 °C para su evaluación.

3.8.2. Evaluación de semen

Con el propósito de valorar cuali - cuantitativamente a los eyaculados de los carneros Corriedale y Pampinta, se efectuaron las siguientes técnicas y procesos.

3.8.2.1. Volumen

Se determinó por observación directa en el tubo colector graduado en décimas de ml. El volumen de cada eyaculado fue medido inmediatamente después de extraído.

3.8.2.2. pH

Para cada eyaculado, una gota de 5 µl de semen se colocó sobre una tira de papel indicador de pH de 0,5 cm de largo, durante 1 minuto, y se determinó su valor por comparación colorimétrica con el patrón impreso (Neutralit® Merck pH 5,5 a 9,0; sensibilidad 0,5).

3.8.2.3. Motilidad de masa microscópica

Se colocó una gota de semen de 5 µl sobre un portaobjetos precalentado sobre platina térmica a 37 °C. Se utilizó microscopio óptico con un aumento de 100x para la observación del semen en "gota gruesa". La medición de la motilidad masal se realizó subjetivamente usando la escala que a continuación se detalla:

0- Ausencia de ESPZ móviles.

1- Algunos ESPZ se mueven en su sitio.

- 2- Presencia de ESPZ mótils, pero insuficiente cantidad como para formar ondas.
- 3- Presencia de ondas o remolinos muy lentos
- 4- Las ondas o remolinos se forman rápidamente.
- 5- Velocidad de formación de ondas extremadamente alta.

3.8.2.4. Concentración espermática en millones de ESPZ por ml ($\times 10^6$ ESPZ/ml)

Una muestra de 5 μ l de semen se diluyó en 4 ml de solución fisiológica formolada 1‰ (Solución N° 1, ver apéndice), lográndose una dilución de 1:800, procediéndose luego a llenar la cámara para hemocitometría (Cámara de Thoma). Los ESPZ fueron observados y contados en un microscopio con contraste de fase a 400x, en 5 de los cuadrados mayores, equivalentes a 80 de los cuadrados menores. Luego se aplicó la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} & \text{N}^\circ \text{ de ESPZ contados} \times \text{dilución (800)} \times 4000 \\ & = \frac{\text{N}^\circ \text{ de ESPZ contados} \times \text{dilución (800)} \times 4000}{80 \text{ (N}^\circ \text{ cuadrados menores)}} = \text{N}^\circ \text{ ESPZ / mm}^3 \\ & = \text{N}^\circ \text{ ESPZ / mm}^3 \times 1000 = \text{N}^\circ \text{ ESPZ} \times 10^6 \text{ / ml de semen} \end{aligned}$$

3.8.2.5. Total de espermatozoides por eyaculado ($\times 10^6$ ESPZ/eyac.)

El número total de espermatozoides se calculó como producto del volumen \times la concentración.

3.8.2.6. Motilidad individual progresiva y vigor

El porcentaje de ESPZ con motilidad progresiva, se determinó diluyendo una gota de 5 μ l de semen con dos gotas de 5 μ l de una Solución de citrato de sodio 2,92 %, con pH 6,7-6,9 (Solución N° 2, ver apéndice) sobre un portaobjetos colocado sobre platina térmica (37 °C) y cubierto con cubreobjeto. La observación se realizó con un aumento de 400x. El valor de la motilidad progresiva se expresó en porcentaje. Para la valoración del vigor (intensidad del movimiento) se utilizó una escala subjetiva de 0 (inmotilidad) a 5 (motilidad individual vigorosa).

3.8.2.7. Viabilidad espermática y determinación de la relación vivos/muertos

El semen se coloreó con la técnica convencional de coloración vital de eosina/nigrosina. Una gota de 5 μ l de semen se mezcló con 20 μ l de Solución de eosina G (Solución N° 3, ver apéndice) y 40 μ l de Solución de nigrosina (Solución N°

4, ver apéndice) sobre un portaobjetos precalentado a 37 °C, y luego de 30 segundos se realizó un frotis que se secó al aire y fue observado con un aumento de 400x. Por cada frotis se contaron 200 espermatozoides como mínimo, en campos tomados al azar. Los espermatozoides que absorbieron el colorante eosina (color rosa) fueron considerados muertos. Se estableció la relación entre el número de vivos y el número de muertos llevándola a valores en porcentajes.

3.8.2.8. Morfología espermática

La determinación de las anomalías espermáticas, se realizó sobre el frotis descrito en el punto anterior. Se la expresa como el porcentaje de ESPZ que presentaron anomalías/ESPZ normales. Se observó con un aumento de 400x y se contaron 100 células como mínimo, en sucesivos campos al azar, cuantificándose las células normales y anormales y el tipo de anomalía presente. Las categorías de anomalías observadas fueron: acrosoma dañado o desprendido, microcéfalos o macrocéfalos, decapitados, implantación anormal de la parte intermedia, presencia de gota citoplásmica y colas defectuosas (torcidas, cortadas, etc.).

3.9. Congelación del semen

Para la congelación del semen se siguió el protocolo de Maxwell (1986). Se procesaron los eyaculados que presentaron un volumen $\geq 0,6$ ml; una motilidad de masa microscópica ≥ 4 y una motilidad individual progresiva $\geq 70\%$. En cada día de recolección se conformó un pool de semen de cada raza para su congelación. Cada pool estuvo formado por alícuotas de 500 μ l del primer eyaculado de cada carnero si cumplió con dichos requisitos mínimos.

Posteriormente, se determinó la concentración espermática de cada pool de semen ajustándola a 500×10^6 ESPZ/ml con el agregado de diluyente para congelación (solución N° 5 ver apéndice). El semen diluido fue enfriado desde 32 °C hasta 5 °C en aproximadamente 2 horas (tasa de descenso térmico $< 0,3$ °C/min) y se mantuvo a 5 °C durante 3 horas (equilibrio térmico). Luego se procedió a la confección de pastillas (pellets), descargando alícuotas de 150 μ l del semen diluido sobre pocillos previamente marcados en la superficie de un bloque de hielo seco (-79 °C). Transcurridos 5 minutos, las pastillas fueron introducidas y sumergidas en un recipiente con N₂ líquido (-196 °C). Finalmente, se depositaron en un envase plástico (gobelet) identificado para almacenarlas en un termo con N₂ líquido hasta su

evaluación. Por cada sesión de congelación se elaboraron 30 pastillas, con aproximadamente de 75×10^6 ESPZ totales cada una. Durante todo el año de trabajo se congeló semen en 19 sesiones de cada raza (38 en total), 4 de ellas en verano, 5 en otoño, 5 en invierno y 5 en primavera.

3.10. Descongelación y evaluación del semen congelado/descongelado

Por razones operativas se procedió a descongelar y evaluar el semen en 5 sesiones. En cada sesión de descongelación se incluyeron muestras de las 4 estaciones para cada raza.

Para minimizar las eventuales variaciones entre pastillas se descongelaron juntas 3 pastillas de cada muestra. Para ello, en un tubo de vidrio se colocaron previamente 1,8 ml de Solución Isotónica (Solución N° 6, ver apéndice) en BM a 37°C. Luego se extrajeron las pastillas del N₂ líquido y se incorporaron a la solución isotónica (obteniéndose un volumen final de 2,25 ml). El conjunto fue homogenizando suavemente. De este modo el semen quedó descongelado en proporción 1:5. Todo el proceso se repitió en 3 oportunidades (Figura 9).

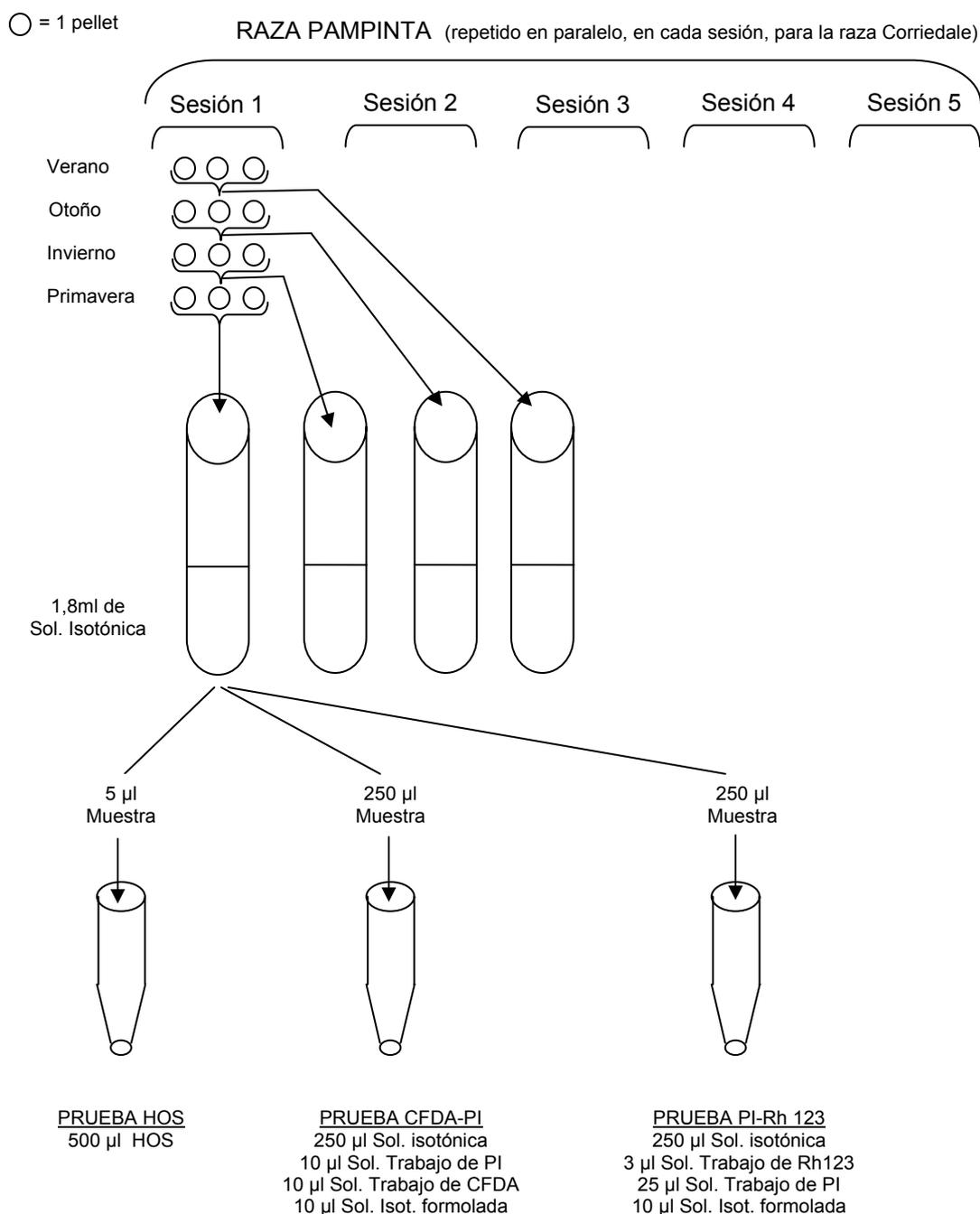
Sobre este semen congelado/descongelado, se efectuaron las siguientes evaluaciones:

3.10.1. Test de termorresistencia

Transcurridos 5 minutos desde la descongelación se procedió a realizar la valoración de la motilidad individual progresiva y el vigor, registrándose este momento como hora 0 y luego repitiendo ambas mediciones a las 2 horas. Cinco µl de la muestra descongelada se colocaron sobre un portaobjetos ubicado sobre platina térmica (37 °C) y cubierto con cubreobjeto. La observación se realizó con un aumento de 400x. La medición se realizó en forma subjetiva expresándose la motilidad individual progresiva en porcentaje y el vigor aplicando la escala de 0 (inmóvil) a 5 (motilidad vigorosa).

3.10.2. Actividad bioquímica de la membrana plasmática

Para el estudio de la funcionalidad de la membrana plasmática se utilizó un método basado en el descrito por Jeyendran *et al.*, (1984) para la especie humana, adaptado

Figura 9: Esquema del procedimiento realizado en la descongelación

al estudio de semen de ovino por García Artiga *et al*, (1994) y frecuentemente denominado Prueba Hipoosmótica (Prueba HOS; Hypoosmotic Swelling Test). La prueba se basa en el aumento de volumen que experimentan las células espermáticas que tienen su membrana intacta, al ser sometidas a un choque osmótico. Diluyendo una muestra en un medio hipotónico, la cola de los ESPZ experimentan aumento de

volumen intracelular, debido a entrada de agua a la célula, lo cual provoca la expansión de las membranas en un intento de las mismas por resistir la diferencia de presión osmótica entre el medio intra y extracelular. De ese modo, la relación entre superficie y volumen celular se reduce, lo cual se traduce en un enrollamiento del flagelo del espermatozoide.

La prueba HOS se realizó incubando en BM a 37 °C, durante 30 minutos una alícuota (5 µl) de la muestra de espermatozoides descongelados, diluyéndola en 500 µl de un medio hipoosmótico ajustado a 100 mOsm/l (Solución N° 7, ver apéndice). Transcurrido ese tiempo, la reacción fue detenida usando 100 µl de solución HOS Formol (Solución N° 8, ver apéndice). La determinación se realizó por recuento celular, para la cual se colocó una gota (5 µl) entre porta y cubreobjetos, y se determinó el porcentaje de células “positivas” (espermatozoides con flagelo enrollado o hinchado = HOS+) usando un microscopio óptico con contraste de fase (400x), y contando al menos 200 células. Se consideraron negativos los ESPZ en los que el flagelo permaneció recto o sólo curvado en forma de látigo.

3.10.3. Sobrevivencia espermática

Para el estudio de la sobrevivencia espermática se realizó una prueba que utiliza la doble coloración con diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e ioduro de propidio (PI) adaptada a partir de lo descrito por Harrison y Vickers (1990) y modificado por Azerêdo *et al*, (2001). El fundamento de esta prueba consiste en la eventual hidrólisis del CFDA por la estearasa intracelular, con la consecuente liberación de la carboxifluoresceína. Esta última es retenida en la célula si las membranas están intactas y emite fluorescencia verde (células viables) cuando es excitada con luz UV. El PI entra en las células con membrana dañada, uniéndose con el ADN del núcleo y emitiendo una fluorescencia roja (células no viables). La prueba se realizó en tubo Eppendorf de 1,5 ml de capacidad, al cual se le colocaron 250 µl de solución isotónica (Solución N° 6, ver anexo), en BM a 37 °C. Luego se le agregaron 250 µl de la muestra de semen descongelado diluido 1:5 (según se explicó en el punto 3.10.) lográndose una dilución 1:10 y una concentración de 50×10^6 espermatozoides/ml. Seguidamente, se agregó 10 µl de la solución de trabajo de CFDA (Solución N° 9, ver apéndice) y esta mezcla se incubó durante 15 minutos. Posteriormente, se agregaron 10 µl de la solución de trabajo de PI (Solución N° 10, ver apéndice) dejando incubar otros 15 minutos y finalmente se detuvo la reacción agregando 10 µl de una solución isotónica formolada (Solución N° 11, ver apéndice) dejando incubar por otros 5 minutos. La

muestra fue retirada del BM para ser almacenada al abrigo de la luz y la temperatura ambiente. La observación se realizó en un microscopio de epifluorescencia a 400x usando un filtro de 380-420 nm (Microscopio Nikon Eclipse TE 300, óptica Plan flúor ELWD 40X C y filtro UV-2A). Se colocó una alícuota de 5 μ l entre porta y cubreobjetos donde se contó un mínimo de 200 células y se establecieron los porcentajes de ESPZ viables y no viables.

Todo este proceso se realizó al resguardo de la luz directa, y el tiempo transcurrido desde el final de la incubación hasta la observación al microscopio no fue superior a las 3 h.

3.10.4. Actividad Mitocondrial

Para determinar la actividad mitocondrial de los ESPZ congelados/descongelados se realizó un test que emplea la coloración de Rhodamina 123 (Rh 123) en combinación con ioduro de propidio (PI), adaptado de Grasa *et al*, (2004). El fundamento de esta prueba consiste en que la Rh 123 (fluorocromo lipofílico y de naturaleza catiónica) se acumula selectivamente en el interior de las mitocondrias activas, atraídas por el potencial de membrana mitocondrial, generando fluorescencia verde a nivel de la porción intermedia de los espermatozoides (Rh+). Los espermatozoides que no emiten fluorescencia a este nivel, se consideran como no reactivos (Rh-). Por otro lado, el PI entra en las células con membranas dañadas, uniéndose al ADN del núcleo y emitiendo una fluorescencia roja (células no viables). Los ESPZ viables no se tiñen con el PI y sus cabezas emiten una fluorescencia verde de menor intensidad que la porción intermedia. Del resultado de la acción de ambos colorantes se realizó una adaptación de la interpretación descrita por Grasa *et al*, (2004), identificándose los patrones definidos en el Tabla 6.

Tabla 6: Patrones de viabilidad celular y funcionalidad de mitocondrias.

Interpretación	PI	Rh 123
Viables con Mitocondria Funcional	-	+
Viables con Mitocondria No funcional	-	-
No viables con Mitocondria No funcional	+	-

Esta prueba se realizó en un Eppendorf de 1,5 ml, al cual se le colocaron 250 μ l de solución isotónica (Solución N° 6, ver anexo), en BM a 37 °C. Luego se agregaron 250 μ l de la muestra de semen descongelado diluido 1:5, (según se explicó en el punto 3.9), lográndose una dilución 1:10 y una concentración de 50×10^6 espermatozoides/ml.

Luego se agregaron 3 μl de la solución de trabajo de Rh 123 (Solución N° 12, ver anexo) y esta mezcla se incubó durante 15 minutos. Posteriormente, se agregaron 25 μl de la solución de trabajo de PI (Solución N° 10, ver anexo) dejando incubar otros 15 minutos y finalmente se detuvo la reacción agregando 10 μl de una solución isotónica formolada (Solución N° 11, ver anexo) dejando incubar otros 5 minutos y luego las muestras se retiraron del BM para ser almacenadas al abrigo de la luz y la temperatura ambiente. La observación se realizó en microscopio de epifluorescencia a 400x usándose un filtro de 520-545 nm (Microscopio Nikon Fluophot). Se colocó una muestra de 5 μl entre porta y cubreobjetos, donde se contaron un mínimo de 200 células, estableciéndose los porcentajes de células Rh+ y Rh-.

Todo este proceso se realizó al resguardo de la luz directa y el tiempo transcurrido desde el final de la incubación hasta la observación al microscopio no fue superior a las 3 h.

3.11. Evaluación de la cinética espermática

Con el propósito de establecer objetivamente la cinética espermática se realizó la evaluación por medio del programa CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). El semen congelado fue trasladado en un termo con N₂ líquido al Centro Genético La Eolia S.A. situado en la ciudad de Marcos Paz (Provincia de Buenos Aires). En el laboratorio del Centro de Inseminación de esta institución se procedió a realizar la valoración de la calidad seminal del semen congelado/descongelado.

3.11.1. Descongelación de las muestras

Las muestras se descongelaron al azar, en una solución semejante a la de congelación, pero sin glicerol ni yema de huevo. Para cada muestra se colocaron 450 μl de esta solución en tubos de vidrio, en BM a 37 °C, para luego incorporar la pastilla extraída del N₂ líquido, lográndose una dilución 1:4.

3.11.2. Cuantificación en el equipo CASA

Se colocó una alícuota de 20 μl de la muestra diluida en la cámara del equipo (Hamilton Thorne, IVOS Versión 10, CASA, Berkley, CA, USA), procediéndose a determinar automáticamente 11 diferentes variables de cinética espermática (ver 3.12.4), para luego imprimir los resultados. Las 38 sesiones de congelación fueron repetidas al azar para su procesamiento en 3 oportunidades.

3.12. Diseño experimental y análisis estadísticos

3.12.1. Evaluación de las variables físicas, capacidad de servicio y testosterona

El estudio se realizó usando un diseño completamente aleatorizado. El modelo para todas las variables respuesta incluyeron los efectos fijos de estación, raza y su interacción, y como efecto aleatorio al carnero dentro de raza. Se utilizó el PROC MIXED del SAS. Los datos de la variable número de montas y concentración de testosterona plasmática no presentaron una distribución normal, por lo que fue necesario transformarlos por el log10. Las medias marginales se compararon mediante el test de Tukey-Kramer y el nivel de significación establecido fue del 5%.

El modelo matemático lineal fue:

$$Y_{ijk} = \mu + E_i + R_j + C_k (R_j) + (ER)_{ij} + \xi_{ijk}$$

Y_{ijk} = observación de la variable respuesta

μ = media general

E_i = efecto de la i-ésima estación del año

R_j = efecto de la j-ésima raza

$C_k (R_j)$ = efecto del k-ésimo carnero (dentro de raza)

$(ER)_{ij}$ = efecto de la interacción de la i-ésima estación con la j-ésima raza

ξ_{ijk} = error experimental sobre el cual se debe cumplir la validez de los supuestos que permiten el análisis de varianza, es decir normalidad, homogeneidad de varianza e independencia.

Las variables dependientes en el modelo matemático fueron:

- peso (Kg)
- condición corporal (escala 1 -5)
- circunferencia escrotal (cm)
- capacidad de servicio (Nº de montas y Nº de cópulas completas)
- testosterona plasmática (ng/ml)

3.12.2. Evaluación del semen fresco

El estudio se efectuó usando un diseño completamente aleatorizado. Para todas las variables respuesta se incluyeron los efectos fijos de estación, raza, orden de eyaculación y su interacción y como efecto aleatorio al carnero dentro de raza. Para los análisis estadísticos se utilizó el PROC MIXED del SAS. Por no presentar una distribución normal los datos porcentuales fueron transformados por el arcsen \sqrt{x} . Las

medias se compararon mediante el test de Tukey-Kramer y el nivel de significación establecido fue del 5%. El modelo matemático lineal fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + E_i + R_j + S_l + C_k(R_j) + (ER)_{ij} + \varepsilon_{ijkl}$$

Y_{ijkl} = observación de la variable respuesta

μ = media general

E_i = efecto de la i-ésima estación del año

R_j = efecto de la j-ésima raza

S_l = efecto de la l-ésimo eyaculado

$C_k(R_j)$ = efecto del k-ésimo carnero (dentro de raza)

$(ER)_{ij}$ = efecto de la interacción de la i-ésima estación con la j-ésima raza

ε_{ijkl} = error experimental sobre el cual se debe cumplir la validez de los supuestos que permiten el análisis de varianza, es decir normalidad, homogeneidad de varianza e independencia.

Las variables dependientes en el modelo matemático fueron:

- volumen (ml)
- motilidad de masa microscópica (escala 0 a 5)
- pH (escala 1-14, sensibilidad 0,5)
- porcentaje de ESPZ con motilidad progresiva (%)
- vigor (escala 0 a 5)
- concentración espermática (Nº de ESPZ/ml)
- Nº total de ESPZ por eyaculado (Volumen x Concentración)
- porcentaje de ESPZ vivos (%)
- porcentaje de ESPZ normales (%)

3.12.3. Evaluación del semen congelado / descongelado

El estudio se realizó bajo un diseño completamente aleatorizado.

El modelo estadístico para todas las variables respuesta incluyó los efectos fijos de estación, raza y su interacción. Se utilizó el PROC GLM del SAS. Los datos porcentuales fueron transformados por el $\arcsen \sqrt{x}$ por no presentar una distribución normal. Las medias se compararon mediante el test de Tukey-Kramer y el nivel de significación establecido fue del 5%.

El modelo matemático lineal fue:

$$Y_{ij} = \mu + E_i + R_j + (ER)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} = observación de la variable respuesta

μ = media general

E_i = efecto de la i-ésima estación del año

R_j = efecto de la j-ésima raza

$(ER)_{ij}$ = efecto de la interacción de la i-ésima estación con la j-ésima raza

ξ_{ij} = error experimental sobre el cual se debe cumplir la validez de los supuestos que permiten el análisis de varianza, es decir normalidad, homogeneidad de varianza e independencia.

Las variables dependientes en el modelo matemático fueron:

- porcentaje de ESPZ con motilidad progresiva a la hora 0 y hora 2 (%)
- vigor a la hora 0 y hora 2 (escala 0 a 5)
- porcentaje de ESPZ vivos (%) a la hora 0
- porcentaje de ESPZ viables (% HOS+) a la hora 0
- porcentaje de ESPZ viables (%CFDA+) a la hora 0
- porcentaje de ESPZ con mitocondria funcional (% Rh+) a la hora 0

3.12.4. Evaluación de la cinética espermática del semen congelado / descongelado por medio de CASA

El estudio se efectuó bajo un diseño completamente aleatorizado. El modelo estadístico para todas las variables respuesta incluyó los efectos fijos de estación, raza, y su interacción y como efecto aleatorio, la repetición dentro de estación y raza. Se utilizó el PROC MIXED del SAS. Por no presentar una distribución normal los datos porcentuales fueron transformados por el $\arcsen \sqrt{x}$. Las medias se compararon mediante el test de Tukey-Kramer y el nivel de significación establecido fue del 5%.

El modelo matemático lineal fue:

$$Y_{ij} = \mu + E_i + R_j + (ER)_{ij} + \xi_{ij}$$

Y_{ij} = observación de la variable respuesta

μ = media general

E_i = efecto de la i-ésima estación del año

R_j = efecto de la j-ésima raza

$(ER)_{ij}$ = efecto de la interacción de la i-ésima estación con la j-ésima raza

ξ_{ij} = error experimental sobre el cual se debe cumplir la validez de los supuestos que permiten el análisis de varianza, es decir normalidad, homogeneidad de varianza e independencia.

Las variables dependientes en el modelo matemático se observan en el Tabla 7:

Tabla 7: Variables registradas en la evaluación por CASA

Abreviatura	Inglés	Castellano	Unidad	Forma de obtención
MT	Motility	ESPZ mótils	%	Conteo y relación
MP	Motility Progressive	ESPZ mótils progresivos	%	Conteo y relación
VAP	Velocity Average Path	Velocidad promedio	µm/seg	Mediciones
VSL	Velocity Straight-line	Velocidad lineal	µm/seg	Mediciones
VCL	Velocity Curvi-linear	Velocidad curvilínea	µm/seg	Mediciones
ALH	Lateral Amplitude Head	Amplitud lateral	µm/seg	Mediciones
BCF	Beat-cross frequency	Frecuencia del movimiento del flagelo	Hz/seg	Conteo
STR	Straightness	Porcentaje de Rectilinealidad	%	$=(VSL / VAP) \times 100$
LIN	Linearity	Porcentaje de linealidad	%	$=(VSL / VCL) \times 100$
ELO	Elongation	Porcentaje de elongación	%	Medición y relación
AREA	Area	Área recorrida	µm ²	Superficie

Para todos los casos, las estaciones del año consideradas fueron:

21/06 al 20/09 = Invierno

21/09 al 20/12 = Primavera

21/12 al 20/03 = Verano

21/03 al 20/06 = Otoño

El verano tardío (mes de febrero hasta el 21 de marzo) y el otoño fueron considerados como estación reproductiva. En cambio, el invierno y la primavera fueron considerados como estación no-reproductiva.

4. RESULTADOS

4.1. Datos meteorológicos.

Se registraron valores de temperaturas medias mayores a 15 °C en verano y primavera, mientras que en otoño e invierno dichas temperaturas estuvieron por debajo de ese valor. La temperatura máxima promedio se registró en verano y la mínima se registró en invierno. La humedad relativa promedio osciló entre 74,0 y 80,4 % no observándose grandes variaciones entre los promedios de estaciones. Las precipitaciones acumuladas por estación mostraron un mayor registro en el verano y el menor en otoño (Tabla 8).

Tabla 8: Temperatura, humedad relativa, evapotranspiración diaria, radiación, horas luz (promedio) y precipitación acumulada por estación del período 21/12/05 al 20/12/06

Estación	Temperatura			Humedad Relativa %	ETP mm día ⁻¹	Radiación Mj m ⁻² día ⁻¹	Horas Luz h día ⁻¹ (*)	Precipitaciones mm
	Máxima °C	Mínima °C	Media °C					
Verano	25,5	13,0	19,2	75,4	3,8	20,2	14:41	314,9
Otoño	18,3	7,1	12,7	79,7	1,7	9,1	11:29	79,4
Invierno	14,7	4,3	9,5	80,4	1,4	8,3	11:26	148,2
Primavera	22,6	9,5	16,1	74,0	3,8	18,8	14:36	225,6

ETP = Evapotranspiración

Datos proporcionados por la Estación Agrometeorológica de la EEA INTA Balcarce

(*) Datos proporcionados por Servicio Nacional de Hidrografía Naval

La radiación promedio por estación fue menor a 10 Mj m⁻² día⁻¹ en otoño e invierno mientras que en primavera y verano esos valores prácticamente se duplicaron.

Los mayores registros de evapotranspiración diaria promedio se observaron en primavera y verano mientras que el menor se observó en invierno.

La cantidad de horas luz promedio por estación se calculó como la diferencia en horas de los registros entre el crepúsculo civil vespertino y el crepúsculo civil matutino, observándose que los valores promedio de hora de luz de la primavera y el verano fueron de 14:30 h día⁻¹, mientras que en el otoño e invierno esos registros fueron de 11:30 h día⁻¹. En la figura 10, se observa la evolución diaria de luz, determinada por la diferencia entre ambos crepúsculos. En este gráfico además pueden observarse las horas de diferencia entre la salida y la puesta del sol diaria.

La mayor cantidad de horas luz se registró al inicio del verano (15:51 h/día) y la menor al inicio del invierno (10:31 h/día). Esta disminución de las horas luz, marca la reducción en el fotoperíodo que determina el comienzo de la estación sexual de los ovinos.

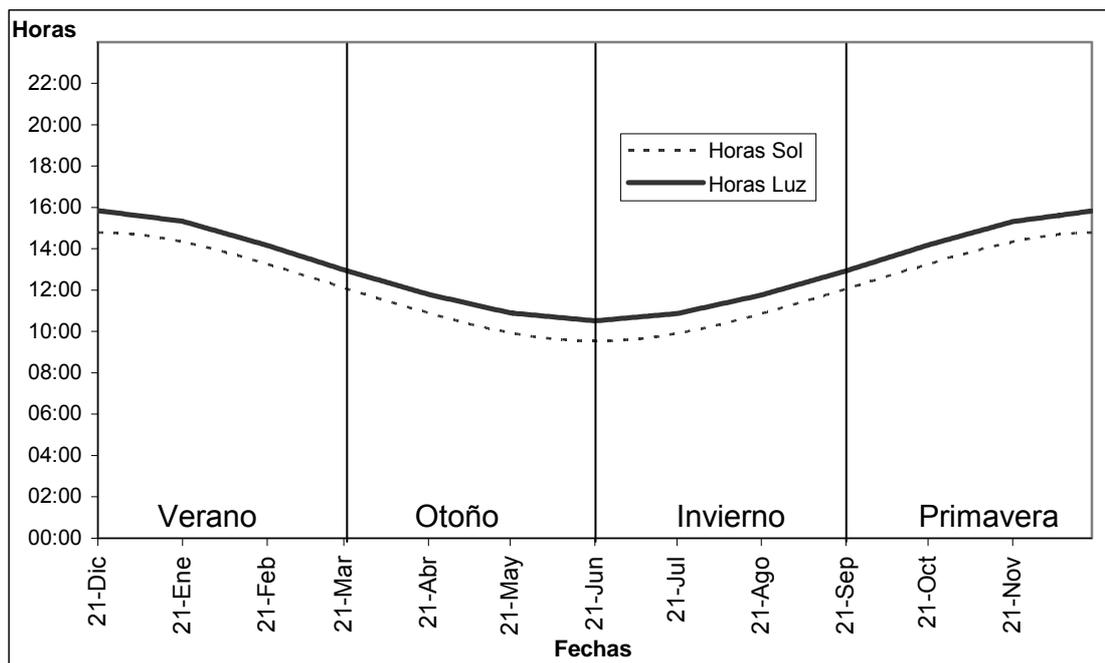


Figura 10: Horas de luz y horas de sol por día en Balcarce, en el período dic. 2005 a dic. 2006

En los siguientes apartados se informan los resultados obtenidos en las etapas evaluadas durante el año de duración del trabajo. Cabe aclarar que inicialmente se contó con 11 animales y se finalizó con 10, debido a la muerte de 1 carnero de raza Pampinta ocurrida a principios de la estación de invierno. Por tal motivo, en los diferentes cuadros, se aclara el número de determinaciones realizado por estación y raza.

4.2. Variables estudiadas sobre los animales.

En la etapa de registro de variables físicas y determinación de concentración de testosterona plasmática se observaron los resultados que se presentan en la Tabla 9. Al analizar la información, no se observó interacción significativa entre estación y raza para ninguna de las variables.

El efecto de la estación resultó significativo para el peso vivo, la condición corporal, la circunferencia escrotal y la concentración de testosterona plasmática. Los animales presentaron su mayor peso vivo en verano y primavera, y el menor en invierno. La condición corporal de primavera fue significativamente mayor que la observada en las demás estaciones, mientras que la menor circunferencia escrotal fue observada durante el invierno y la primavera.

Tabla 9: Variables físicas y testosterona plasmática (Media \pm ES) por estación y raza

VARIABLES FÍSICAS	ESTACIÓN				RAZA	
	VERANO n=66	OTOÑO N=66	INVIERNO n=60	PRIMAVERA n=60	CORRIEDALE n=144	PAMPINTA n=108
Peso Vivo (Kg)	97,2 \pm 2,4a	92,6 \pm 2,3ab	87,3 \pm 2,4b	96,2 \pm 2,1a	82,6 \pm 1,5b	104,1 \pm 1,7a
Condición corporal (1-5)	2,7 \pm 0,1b	2,7 \pm 0,1b	2,6 \pm 0,1b	3,1 \pm 0,1a	2,9 \pm 0,1a	2,6 \pm 0,1b
Circunferencia escrotal (cm)	35,3 \pm 0,4a	34,1 \pm 0,5ab	33,1 \pm 0,5b	32,1 \pm 0,4b	32,8 \pm 0,3b	34,4 \pm 0,4a
Testosterona ng/ml (*)	8,3 \pm 0,6a	5,0 \pm 0,4b	2,7 \pm 0,5c	2,3 \pm 0,4c	3,9 \pm 0,3	5,3 \pm 0,4

Valores con letras distintas en las filas dentro de estación y de las razas difieren significativamente ($p < 0,05$)

(*) Datos que no poseen distribución normal, y fueron transformados a \log_{10} .

La concentración de testosterona plasmática fue mayor en verano y otoño, diferenciándose entre ambos períodos mientras que en invierno y primavera fue marcadamente más baja.

El efecto de raza resultó significativo para el peso vivo, la condición corporal y la circunferencia escrotal. El mayor tamaño corporal que caracteriza a los carneros Pampinta se vio reflejado en la diferencia del peso vivo y de la circunferencia escrotal. Sin embargo, la raza Corriedale presentó la condición corporal más alta.

Los resultados de las pruebas de capacidad de servicio se observan en la Tabla 10. Al analizar la información no se observó interacción significativa entre estación y raza para ninguna de las variables.

Tabla 10: Capacidad de servicio (Media \pm ES) de carneros Corriedale y Pampinta en verano, otoño, invierno y primavera

VARIABLE	ESTACIÓN				RAZA	
	VERANO n=33	OTOÑO n=33	INVIERNO n=30	PRIMAVERA n=30	CORRIEDALE n=72	PAMPINTA n=54
Nº Montas (20 minutos) (*)	5,1 \pm 1,4	10,4 \pm 1,8	9,7 \pm 2,5	5,8 \pm 0,9	8,7 \pm 1,2a	6,8 \pm 1,3b
Nº Cópulas completas (20 minutos)	2,4 \pm 0,2b	3,4 \pm 0,3a	2,0 \pm 0,2b	2,4 \pm 0,2b	2,6 \pm 0,2	2,5 \pm 0,2

Valores con letras distintas en las filas dentro de estación y de raza difieren significativamente ($p < 0,05$)

(*) Datos que no poseen distribución normal fueron transformados a \log_{10} .

No se observaron diferencias entre estaciones en el número de montas, sin embargo el efecto de estación resultó significativo para el Nº de cópulas completas. El mayor número de cópulas completas se registró en el otoño.

El efecto de la raza resultó significativo solamente para el N° de montas, siendo la raza Corriedale la que tuvo el mayor N° de montas.

Se realizaron análisis de correlación simple entre las variables analizadas y los resultados se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11: Correlaciones entre las variables analizadas para carneros Corriedale y Pampinta

Variable		Corriedale					
		Peso	CC	CE	Montas	Cca	Test
Peso	r		0,52	0,34	-0,10	0,05	0,09
	p		<,0001	<,0001	0,2105	0,5141	0,3095
Condición corporal (CC)	r	0,08		0,13	0,08	0,08	0,03
	p	0,4323		0,124	0,3555	0,3713	0,7179
Circunferencia escrotal (CE)	r	0,47	-0,11		0,05	0,13	0,32
	p	<,0001	0,2399		0,5725	0,1314	<,0001
N° de montas (Montas)	r	0,06	0,01	0,18		0,16	-0,24
	p	0,505	0,9049	0,0552		0,0599	0,0044
N° de cópulas completas (Cca)	r	0,12	-0,23	-0,02	0,20		-0,03
	p	0,224	0,0159	0,8163	0,0361		0,7364
Testosterona (Test.)	r	0,43	-0,14	0,63	0,06	0,10	
	p	<,0001	0,1391	<,0001	0,5169	0,2732	
		Pampinta					

El peso presentó una correlación positiva significativa con la circunferencia escrotal para las dos razas; esto significa que a medida que aumentó el peso de los carneros la circunferencia escrotal aumentó. El peso tuvo además una correlación positiva significativa en la raza Corriedale con la condición corporal, es decir a medida que se incrementó el peso también se incrementó la condición corporal, en cambio en la raza Pampinta no fue significativa.

Por otro lado en la raza Pampinta, el peso tuvo una correlación positiva significativa con la concentración de testosterona plasmática, es decir que a medida que se incrementó el peso se incrementó la concentración de testosterona plasmática, sin embargo, en la raza Corriedale esta correlación no fue significativa.

En ambas razas la circunferencia escrotal tuvo una correlación positiva significativa con la concentración plasmática de testosterona. Se observó una correlación positiva en la raza Pampinta del N° de montas con el N° de cópulas completas, es decir que al incrementarse el N° de montas aumentó el N° de cópulas completas, mientras que en la raza Corriedale sólo se observó una tendencia en ese sentido.

Entre las correlaciones negativas significativas, se destaca en la raza Pampinta, la condición corporal con el N° de cópulas completas. Por otro lado en la raza Corriedale, el aumento del N° de montas se correspondió con una disminución de la concentración

de testosterona plasmática. Finalmente el incremento de circunferencia escrotal en la raza Pampinta presentó una tendencia a incrementar el N° de montas.

A pesar que, desde el punto de vista estadístico no es necesario mostrar el comportamiento de cada variable debido a que no hubo interacción entre ellas, los gráficos siguientes muestran cómo fue el comportamiento biológico y puede brindar un panorama más claro de las variables según las estaciones del año y la raza.

4.2.1. Peso vivo

En la Figura 11 puede observarse la evolución estacional del peso vivo por raza, de los carneros que intervinieron en la prueba.

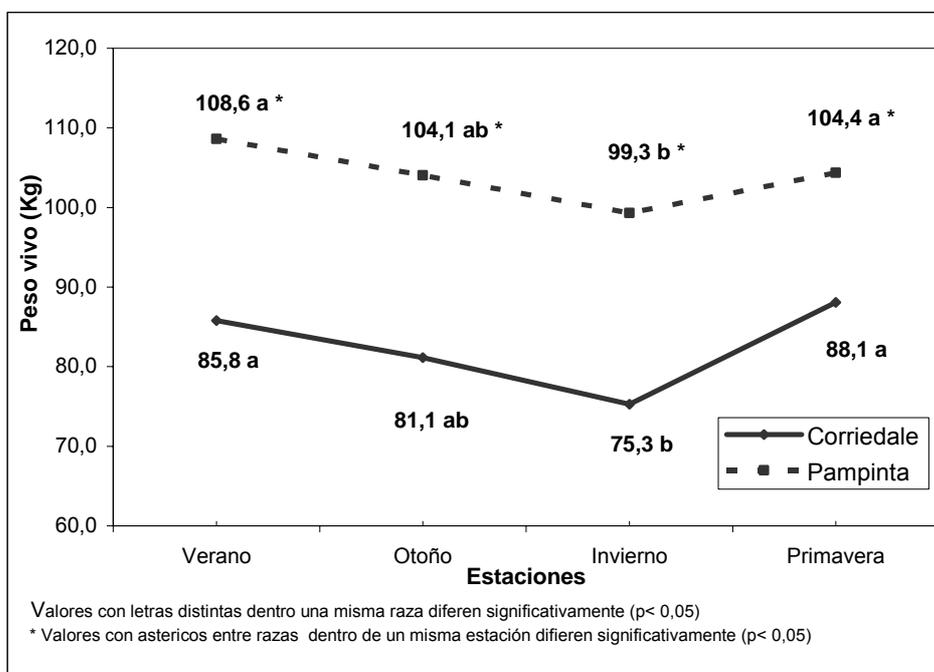


Figura 11: Peso vivo promedio en carneros Corriedale y Pampinta según las estaciones del año

En ambas razas la variación entre estaciones fue muy leve, con la excepción del invierno donde se obtuvo el menor registro, sin embargo, la diferencia entre razas se mantuvo en todas las estaciones, siendo el peso vivo menor en invierno y mayor en verano. El mayor tamaño corporal de la raza Pampinta fue determinante en las diferencias observadas.

4.2.2. Condición corporal.

En la Figura 12 puede observarse la evolución estacional de los valores promedio de condición corporal por raza, de los carneros que intervinieron en la prueba.

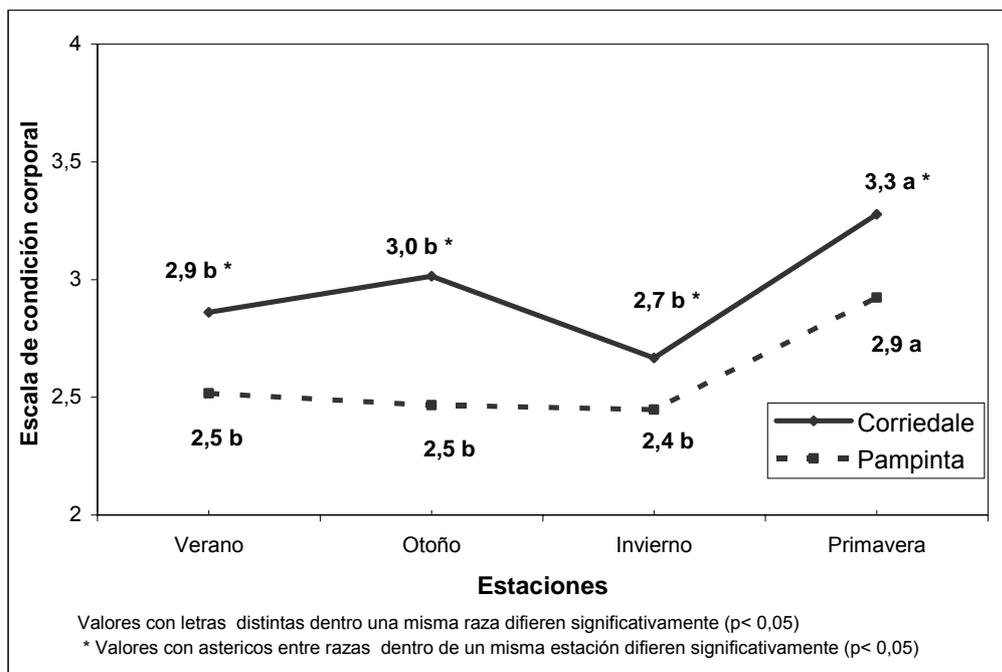


Figura 12: Condición corporal promedio en carneros de razas Corriedale y Pampinta según las estaciones de año

La condición corporal de la raza Corriedale tuvo una marcada disminución en el invierno, siendo similar entre las demás estaciones. La raza Pampinta tuvo una evolución similar en las estaciones de verano, otoño e invierno con un mejoramiento importante en primavera. Sin embargo, las diferencias entre ambas razas a favor de la Corriedale se mantuvieron en todas las estaciones.

La menor condición corporal de la raza Pampinta se atribuye a la conformación más magra de la raza. El estado nutricional de los animales observado a través del seguimiento de las variables peso vivo y condición corporal reflejó un comportamiento paralelo en ambas razas, y las diferencias entre ellas se deben atribuir exclusivamente a las diferencias de tamaño corporal y de conformación intrínseca de cada raza.

4.2.3. Circunferencia escrotal.

En la Figura 13 puede observarse la evolución estacional de los promedios de circunferencia escrotal por raza, de los carneros que intervinieron durante el periodo de la prueba.

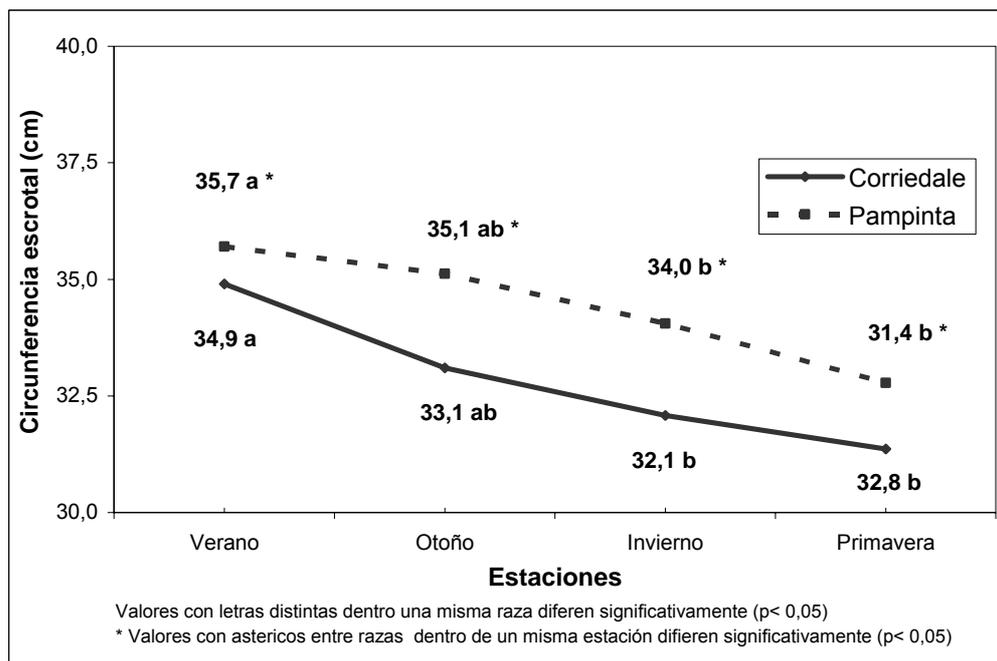


Figura 13: Circunferencia escrotal promedio en carneros de razas Corriedale y Pampinta según las estaciones del año

La circunferencia escrotal por estaciones en ambas razas, tuvo un comportamiento similar. En verano y otoño se encontraron los mayores valores, disminuyendo en el invierno y primavera, manifestándose un importante efecto de la época reproductiva.

Las diferencias entre razas se mantuvieron durante todas las estaciones.

4.2.4. Capacidad de servicio

La prueba de capacidad de servicio permitió observar el comportamiento reproductivo (libido) y el funcionamiento de los aparatos reproductor y locomotor de los carneros de ambas razas y sus eventuales variaciones durante el paso de las estaciones. A efecto de cuantificar el comportamiento reproductivo, se evaluaron dos variables que se presentan a continuación:

4.2.4.1. Número de Montas

En la Figura 14 puede observarse la evolución estacional del número promedio de montas por raza, de los carneros que intervinieron en la prueba.

El número de montas en ambas razas tuvo un comportamiento semejante en todas las estaciones, incrementándose en otoño e invierno y disminuyendo en primavera y verano. La diferencia entre razas podría significar un mayor entusiasmo (mayor libido) de los carneros Corriedale o bien una menor habilidad para la cópula de la raza Corriedale requiriendo más intentos de montas en cada eventual cópula.

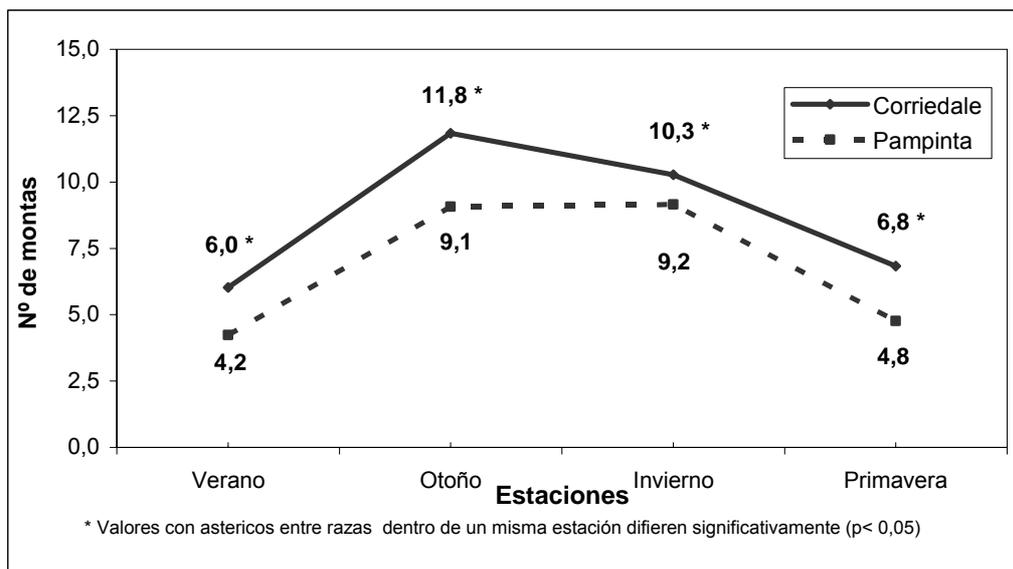


Figura 14: N° de montas promedio en una prueba a corral durante 20 minutos, en carneros de razas Corriedale y Pampinta según las estaciones del año

4.2.4.2. Cópulas completas

En la Figura 15 puede observarse la evolución estacional del número promedio de cópulas completas por raza, de los carneros que intervinieron en la prueba.

La cantidad de cópulas completas en ambas razas se mantuvo sin grandes variaciones estacionales en invierno, primavera y verano, pero en otoño hubo un aumento significativo. Entre razas no existieron diferencias, aunque la tendencia general fue un mayor número de cópulas completas para los carneros Corriedale.

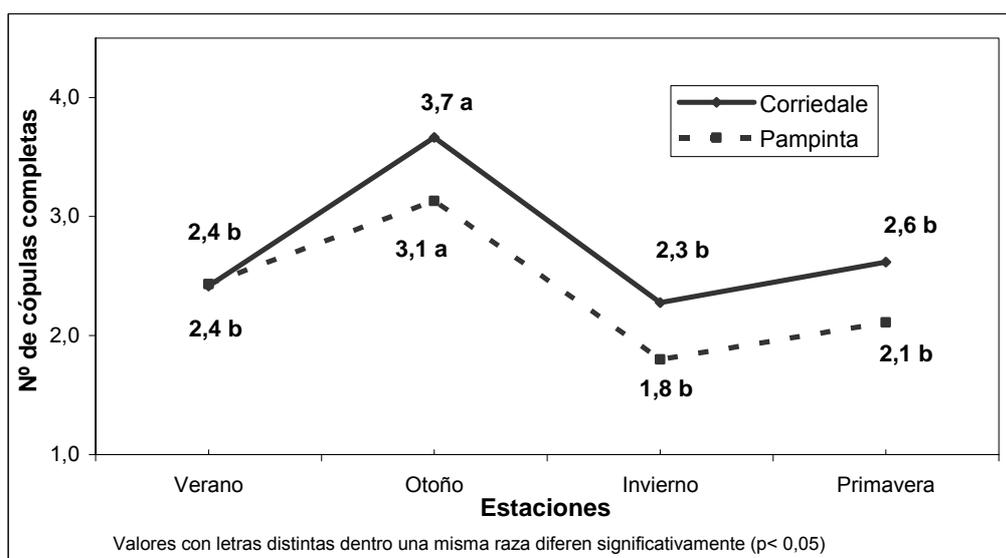


Figura 15: N° de Cópulas completas promedio en una prueba a corral durante 20 minutos, en carneros de razas Corriedale y Pampinta según las estaciones del año

4.2.5. Testosterona sanguínea.

En la Figura 16 puede observarse la evolución estacional de los valores promedio de concentración plasmática de testosterona por raza, de los carneros que intervinieron en la prueba.

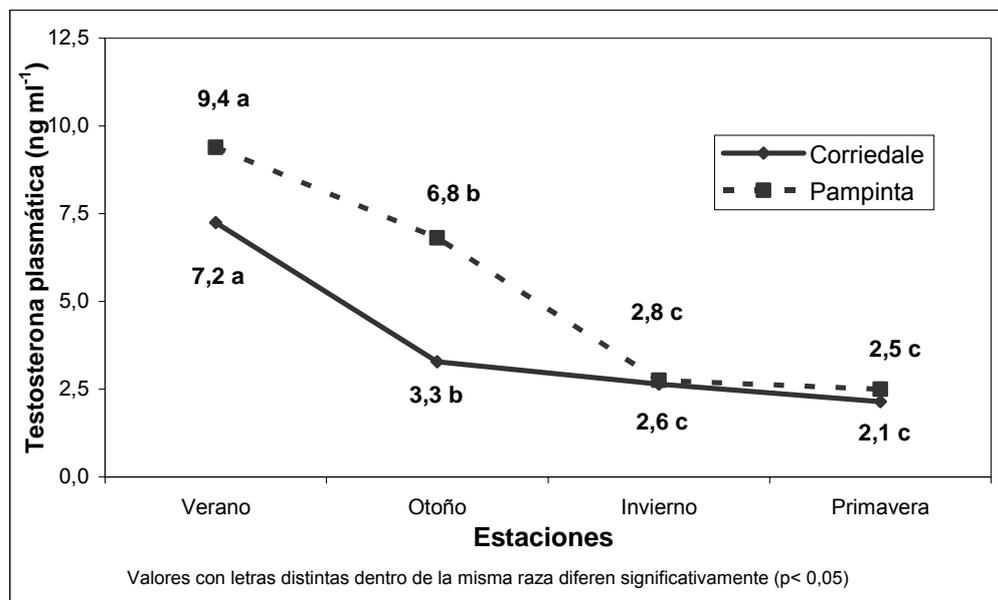


Figura 16: Concentración promedio de testosterona plasmática en carneros de razas Corriedale y Pampinta según las estaciones del año

La concentración plasmática de testosterona de ambas razas fue más elevada durante la estación reproductiva (verano – otoño), cayendo luego a valores basales, no

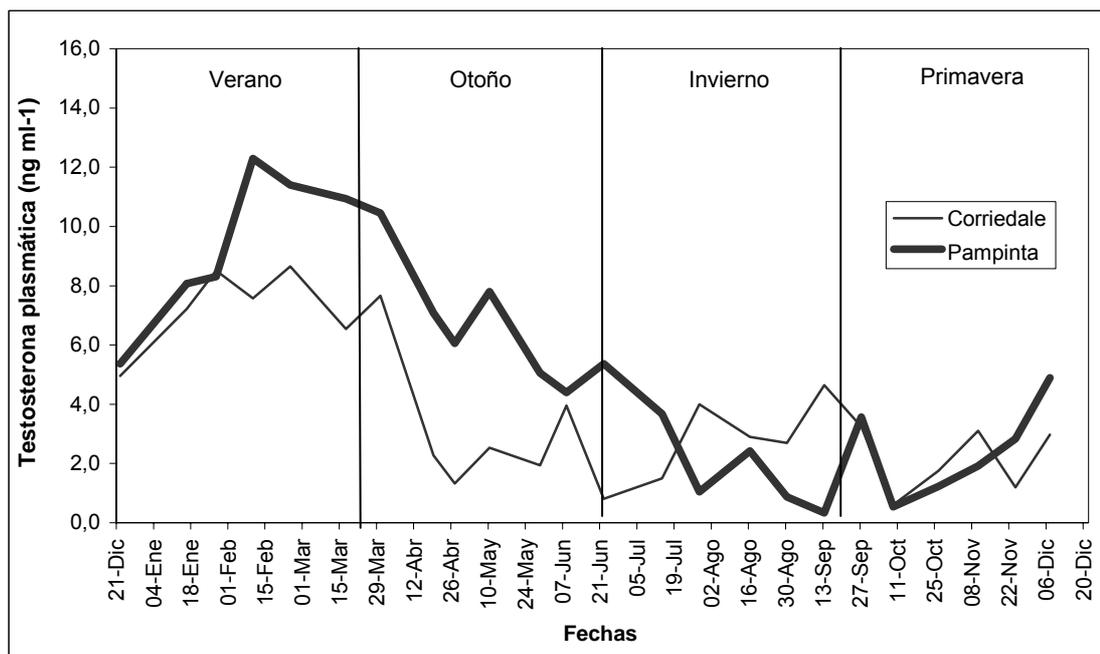


Figura 17: Evolución anual de la concentración plasmática de testosterona, promedio de cada fecha de extracción, en carneros de razas Corriedale y Pampinta

obstante, no se observaron diferencias importantes entre razas. En la Figura 17 se observa la evolución de la concentración plasmática de testosterona, promedio de cada extracción por raza.

La raza Pampinta, en toda la estación reproductiva y hasta principios del invierno mostró una tendencia de concentración más elevada que en la raza Corriedale, aunque sin diferir estadísticamente entre ambas razas. Durante el resto del invierno y la primavera, los niveles de testosterona plasmática se encontraron en niveles basales en ambas razas, no evidenciando tendencia alguna.

4.3. Semen colectado y eficiencia

La información de los eyaculados colectados durante el año de trabajo, se presentan en la Tabla 12. Durante la realización del trabajo se procesaron 436 eyaculados.

Tabla 12: Eyaculados obtenidos y aprobados para congelación por estación y por raza

Estación	VERANO		OTOÑO		INVIERNO		PRIMAVERA		Totales o Promedios
	Corriedale	Pampinta	Corriedale	Pampinta	Corriedale	Pampinta	Corriedale	Pampinta	
Eyaculados obtenidos	61	46	67	59	59	50	47	47	436
Eyaculados aprobados para congelación	54	41	62	56	34	35	29	30	341
% Eyaculados aprobados por estación y por raza	88,5% a	89,1% a	92,5% a	94,9% a	57,6% e	70,0% b	61,7% c	63,8% c	78,2%
% Eyaculados aprobados por estación	88,8% a		93,7% a		63,3% b		62,8% b		

Valores con distintas letras en las filas difieren significativamente ($p < 0,05$)

Los mayores porcentajes de eyaculados aprobados para congelación se obtuvieron en las estaciones de verano y otoño en las razas Corriedale y Pampinta.

Los carneros de la raza Pampinta tuvieron mayor porcentaje de eyaculados aprobados en todas las estaciones, en relación a la raza Corriedale; aunque fueron significativamente diferentes sólo en invierno.

4.4. Evaluación del semen fresco

Los 436 eyaculados colectados en ambas razas durante el año de trabajo, fueron evaluados y los resultados se presentan en la Tabla 13. La interacción estación por raza no fue significativa para ninguna de las variables analizadas. Las interacciones entre estación por secuencia de eyaculación y raza por secuencia de eyaculación no fueron consideradas. Los valores promedio para las variables volumen (**VOL**), total de espermatozoides (**TESPZ**), motilidad progresiva (**MP**), vigor y porcentaje de espermatozoides normales (**PEN**) fueron mayores en verano y otoño (estación reproductiva), independientemente de la raza considerada. El pH disminuyó desde el otoño hacia el verano. No se observaron diferencias significativas entre estaciones en la motilidad masal (**MM**), en la concentración de espermatozoides (**CONC**) y en el porcentaje de espermatozoides vivos (**PEV**), independientemente de la raza considerada.

Tabla 13: Valores promedio (\pm ES) de parámetros seminales de careros Corriedale y Pampinta por estación y secuencia de eyaculación

Parámetros seminales	ESTACIÓN				RAZA		EYACULADO	
	VERANO n=107	OTOÑO n=126	INVIERNO n=109	PRIMAVERA n=94	CORRIEDALE n=234	PAMPINTA n=202	1º n=225	2º n=211
Vol (ml)	1,0 \pm 0,1a	1,0 \pm 0, 1a	0,8 \pm 0, 1b	0,7 \pm 0, 1b	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1a	0,8 \pm 0,1b
MM (0-5)	4,4 \pm 0,1	4,3 \pm 0,1	4,2 \pm 0,2	4,2 \pm 0,1	4,3 \pm 0,1	4,3 \pm 0,1	4,2 \pm 0,1b	4,3 \pm 0,1a
pH	7,5 \pm 0,1c	8,2 \pm 0,1a	7,9 \pm 0,1b	7,9 \pm 0,1ab	8,0 \pm 0,1a	7,8 \pm 0,1b	7,8 \pm 0,1b	7,9 \pm 0,1a
CONC (10 ⁹ ESPZ/ml)	3,8 \pm 0,1	3,8 \pm 0,1	4,0 \pm 0,2	4,2 \pm 0,2	3,5 \pm 0,1b	4,3 \pm 0,1a	4,1 \pm 0,9a	3,7 \pm 0,9b
TESPZ (10 ⁹ ESPZ/eyac)	4,0 \pm 0,1a	3,9 \pm 0,2a	3,3 \pm 0,3b	3,0 \pm 0,1b	3,0 \pm 0,1b	4,1 \pm 0,1a	3,9 \pm 0,1a	3,2 \pm 0,1b
MP (%) (*)	82,1 \pm 1,5a	79,8 \pm 0,8a	74,0 \pm 2,0ab	72,7 \pm 1,7b	77,3 \pm 1,1	77,0 \pm 1,2	76,9 \pm 0,9	77,4 \pm 0,9
Vigor (0-5)	4,4 \pm 0,1a	4,4 \pm 0,1a	4,1 \pm 0,1ab	3,9 \pm 0,1b	4,2 \pm 0,1	4,2 \pm 0,1	4,1 \pm 0,1	4,2 \pm 0,1
PEV (%) (*)	79,9 \pm 1,2	79,1 \pm 0,8	75,4 \pm 2,1	82,2 \pm 1,3	79,4 \pm 1,0	78,8 \pm 1,1	78,2 \pm 0,8b	80,1 \pm 0,8a
PEN (%) (*)	94,1 \pm 0,5a	94,5 \pm 0,8a	83,5 \pm 2,8b	84,0 \pm 2,2b	91,2 \pm 1,3a	87,3 \pm 1,4b	89,0 \pm 1,0	89,5 \pm 1,0

abc valores con letras distintas en las filas dentro de estación, raza y orden de eyaculación difieren significativamente ($p < 0,05$)

(*) datos transformados por el $\arcsen \sqrt{x}$.

La raza Pampinta mostró mayor concentración espermática y total de ESPZ, en cambio la raza Corriedale tuvo un mayores pH y porcentaje de espermatozoides normales, independientemente de la estación del año considerada. En las demás variables no se encontraron diferencias significativas por efecto de raza.

En el 1º eyaculado se observó mayor volumen, concentración de ESPZ y total de ESPZ, en cambio el 2º eyaculado presentó mayor motilidad masal, pH y mayor porcentaje de vivos. No hubo diferencias significativas en motilidad progresiva, vigor y porcentaje de ESPZ normales.

Se realizaron las correlaciones por raza entre los factores circunferencia escrotal y concentración de testosterona con las variables seminales, cuyos resultados se observan en la Tabla 14.

Tabla 14: Correlaciones entre factores por raza

VARIABLES		CORRIEDALE							
		Vol	Mot	pH	Conc	MP	Vigor	Vivos	Normal
Volumen (Vol)	r		0,07	-0,19	0,16	0,24	0,30	-0,04	0,12
	p		0,521	0,096	0,157	0,030	0,007	0,720	0,295
Motilidad Masal (Mot)	r	-0,16		-0,40	0,43	0,53	0,72	0,39	0,17
	p	0,1779		0,0002	<.0001	<.0001	<.0001	0,0003	0,137
pH	r	-0,09	-0,29		-0,47	-0,46	-0,40	-0,34	-0,09
	p	0,4593	0,0135		<.0001	<.0001	0,0002	0,002	0,447
Concentración (Conc)	r	-0,16	0,27	-0,35		0,49	0,44	0,15	0,07
	p	0,1916	0,0260	0,0029		<.0001	<.0001	0,181	0,553
Motilidad Progresiva (MP)	r	0,05	0,62	-0,35	0,19		0,78	0,14	0,17
	p	0,7044	<.0001	0,0032	0,1163		<.0001	0,209	0,137
Vigor	r	0,15	0,62	-0,07	0,18	0,65		0,30	0,19
	p	0,214	<.0001	0,5599	0,135	<.0001		0,007	0,088
Espz Vivos (Vivos)	r	-0,15	0,51	-0,13	0,07	0,49	0,39		-0,049
	p	0,2289	<.0001	0,2989	0,5875	<.0001	0,0008		0,6681
Espz Normales (Normal)	r	-0,03	0,30	-0,05	0,17	0,20	0,25	0,27	
	p	0,8263	0,0113	0,6738	0,1627	0,0950	0,0396	0,0224	
		PAMPINTA							

Entre las correlaciones más importantes se observó en la raza Pampinta, que la motilidad masal tuvo una correlación positiva significativa mayor a 0,5 con motilidad progresiva, vigor y porcentaje de ESPZ vivos, mientras que con la concentración de ESPZ y el porcentaje de ESPZ Normales fue de menor magnitud; es decir que el aumento de motilidad masal fue correspondido con el aumento de las variables mencionadas.

En la raza Corriedale se destaca la correlación positiva significativa mayor a 0,5 de la motilidad masal con la motilidad progresiva y vigor.

En ambas razas, el vigor y la motilidad progresiva tuvieron una alta correlación positiva significativa, es decir, que a medida que la motilidad progresiva aumentó, también aumentó el vigor.

Sabiendo que, desde el punto de vista estadístico no es necesario mostrar el comportamiento de cada variable, debido a que no hubo interacción, entre ellas, los gráficos siguientes muestran cómo fue el comportamiento biológico y puede brindar un panorama más claro de las variables según las estaciones del año por raza y orden de eyaculación.

4.3.1. Volumen

En la Figura 18 se observa la evolución estacional de los valores promedio de volumen del eyaculado por raza, de los carneros que intervinieron en la prueba.

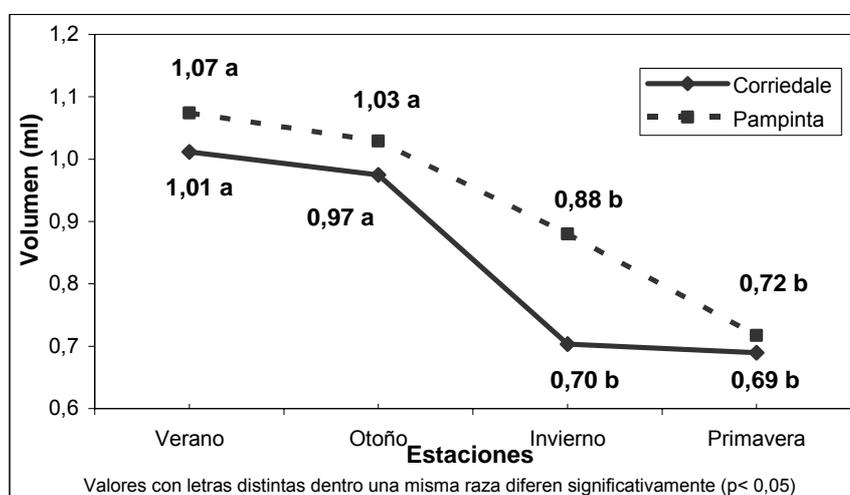


Figura 18: Volumen promedio del eyaculado de carneros Corriedale y Pampinta según las estaciones del año

El volumen del eyaculado de ambas razas fue mayor en verano y otoño. La raza Pampinta tuvo un volumen de eyaculación mayor en todas las estaciones aunque esta diferencia no fue significativa.

En la Figura 19 se observa la evolución estacional de los valores promedio del volumen del eyaculado por secuencia de eyaculación, de los carneros que intervinieron en la prueba.

El volumen de ambos eyaculados fue mayor en verano y otoño. Las diferencias de volumen entre eyaculados se observaron en todas las estaciones, siendo siempre mayor el 1°.

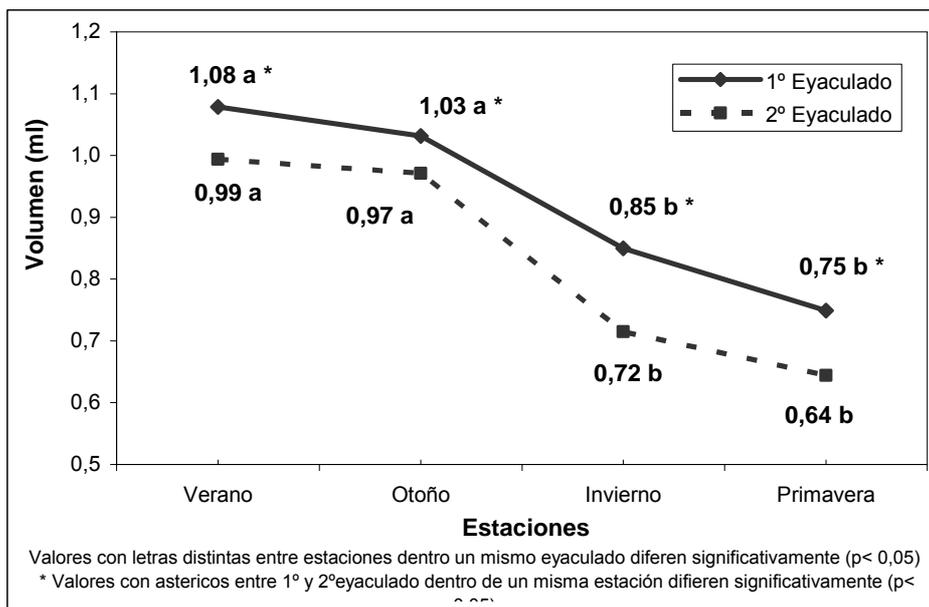


Figura 19: Volumen promedio del eyaculado, de carneros Corriedale y Pampinta, de acuerdo al orden de eyaculación, según las estaciones del año

4.3.2. Motilidad de masa microscópica

En la Figura 20 se observa la evolución estacional de los promedio de motilidad masal por raza, de los carneros que intervinieron en la prueba.

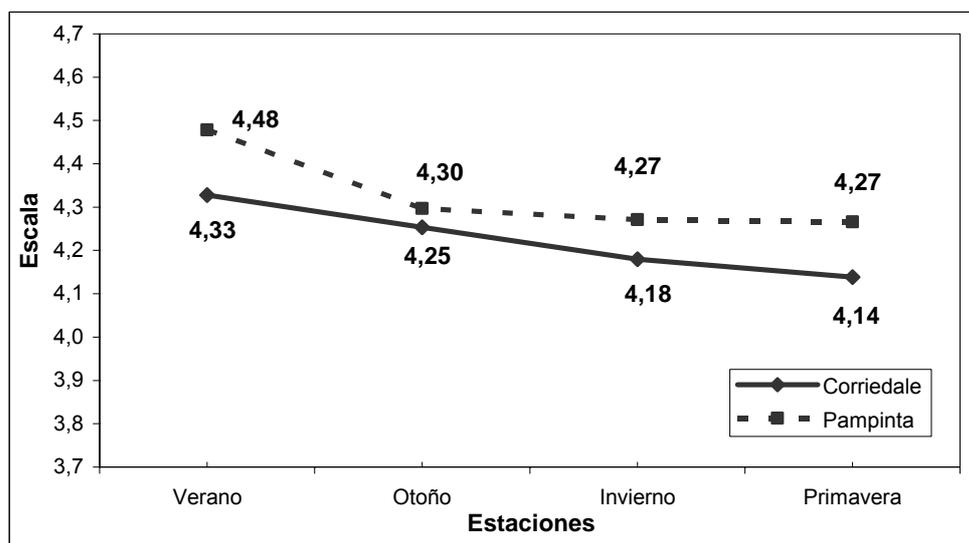


Figura 20: Motilidad masal promedio, de carneros Corriedale y Pampinta según las estaciones del año

Puede observarse que la motilidad masal del eyaculado de la raza Pampinta fue mayor en todas las estaciones.

En el Figura 21 se observa la evolución estacional de los valores promedio de motilidad masal por secuencia de eyaculación, de los carneros que intervinieron en la prueba.

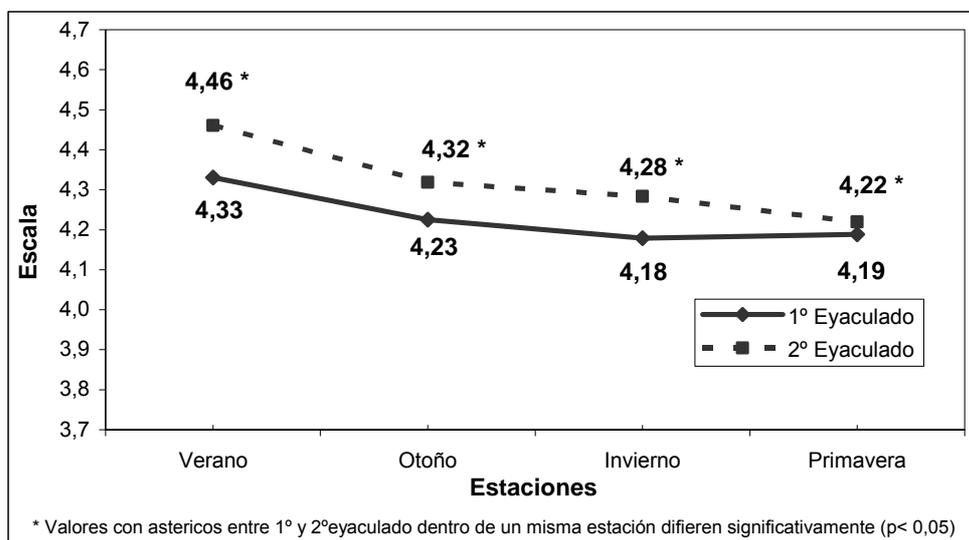


Figura 21: Motilidad masal promedio, de acuerdo al orden de eyaculación de carneros Corriedale y Pampinta, según las estaciones del año

La motilidad masal de ambos eyaculados no tuvo apreciables diferencias entre estaciones, apenas se esboza un leve descenso desde el verano hacia la primavera.

En general puede apreciarse una diferencia entre el 1° y el 2° eyaculado, donde la motilidad fue mayor en el 2° eyaculado en todas las estaciones.

4.3.3. pH

En la Figura 22 se observa la evolución estacional de los valores promedio de pH

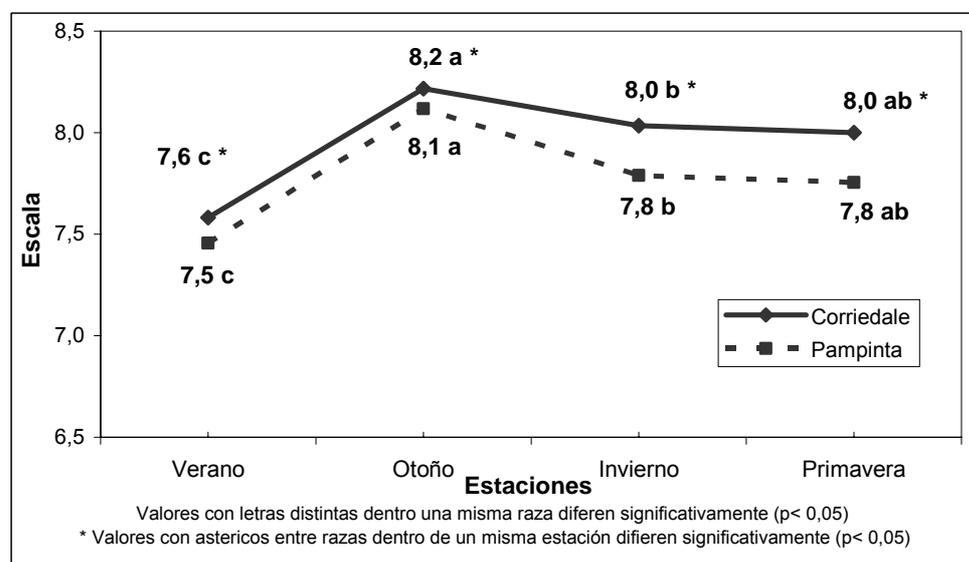


Figura 22: pH promedio, de carneros Corriedale y Pampinta según las estaciones del año

por raza, de los carneros que intervinieron en la prueba.

La figura muestra que los eyaculados de la raza Corriedale fueron algo más alcalinos en todas las estaciones.

En la Figura 23 se observa la evolución estacional de los valores promedio del pH del semen según secuencia de eyaculación, de los carneros que intervinieron en la prueba.

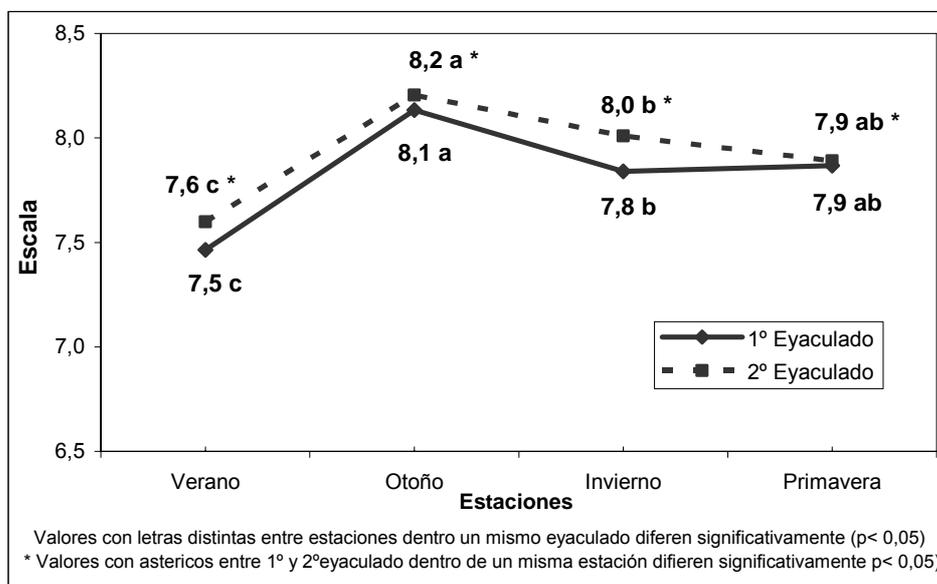


Figura 23: pH promedio del eyaculado de acuerdo al orden de eyaculación de carneros Corriedale y Pampinta, según las estaciones del año

Puede observarse que el 2º eyaculado tendió a ser más alcalino que el 1º eyaculado en todas las estaciones.

En ambas figuras puede observarse que en el otoño, el pH fue mayor que en las demás estaciones.

4.3.4. Concentración espermática

En la Figura 24 se observa la evolución estacional de los valores promedio de la concentración del eyaculado por raza, de los carneros que intervinieron en la prueba.

La raza Pampinta presentó eyaculados más concentrados en todas las estaciones.

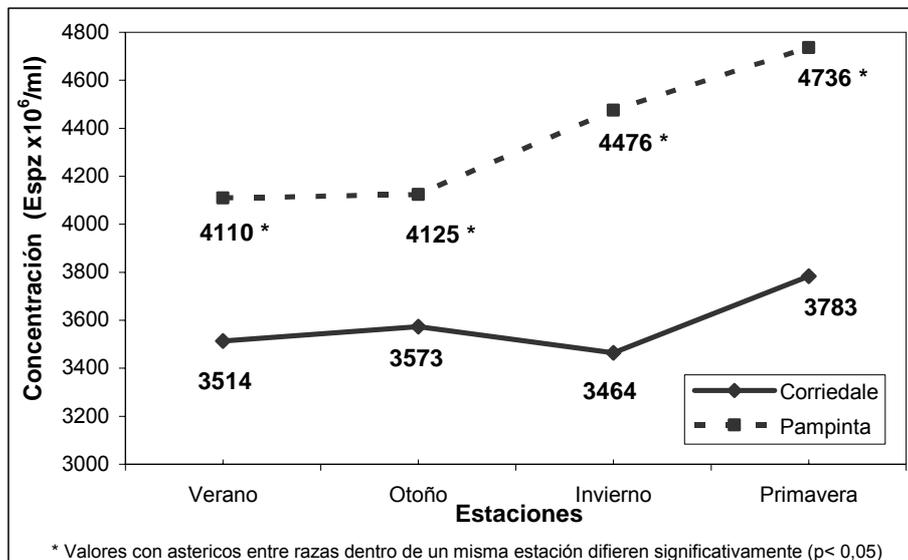


Figura 24: Concentración de Espz/ml del eyaculado, de carneros Corriedale y Pampinta según las estaciones del año

En la Figura 25 se observa la evolución estacional de los valores promedio de concentración del eyaculado según secuencia de eyaculación, de los carneros que intervinieron en la prueba.

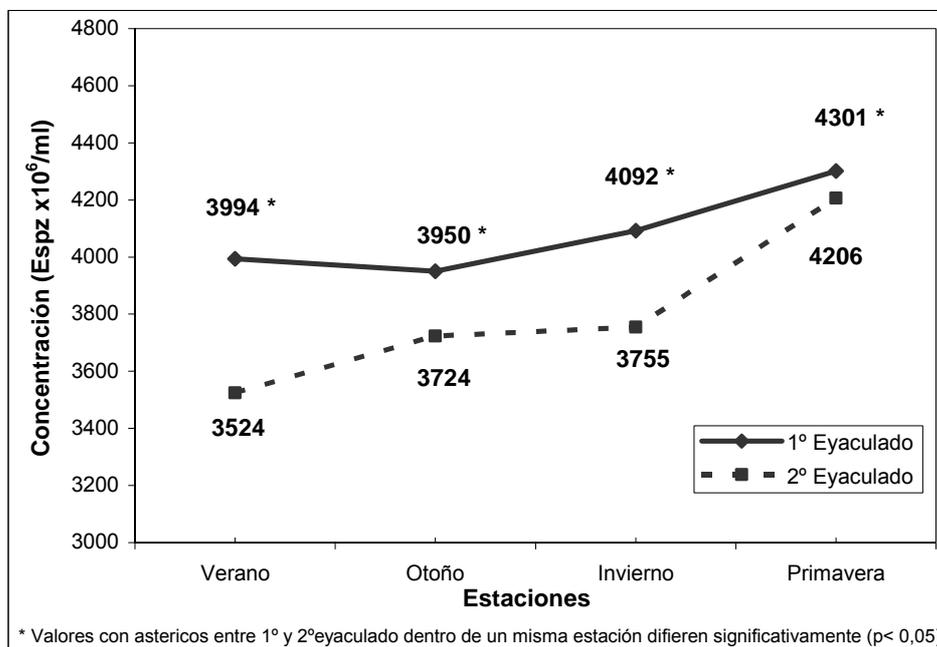


Figura 25: Concentración de Espz/ml promedio del eyaculado de acuerdo al orden de eyaculación de carneros Corriedale y Pampinta, según las estaciones del año

La concentración del 1º eyaculado fue mayor para ambos eyaculados en todas las estaciones. En ambos gráficos puede observarse que, los eyaculados de la primavera

resultaron más concentrados que los del resto del año aunque no difirieron significativamente.

4.3.5. Total de ESPZ por eyaculado

El total de ESPZ de un eyaculado surge del producto de la concentración por el volumen del mismo.

En la Figura 26 se observa la evolución estacional de los valores promedio del total de ESPZ por raza, de los carneros que intervinieron en la prueba.

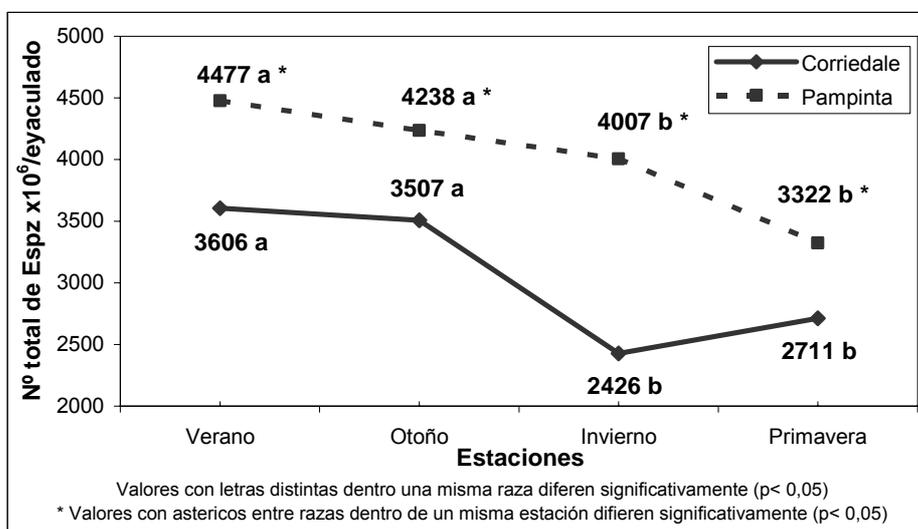


Figura 26: Nº total de Espz por eyaculado, de carneros Corriedale y Pampinta según las estaciones del año

La raza Pampinta tuvo un total de ESPZ por eyaculado mayor que la Corriedale en todas las estaciones.

En la Figura 27 se observa la evolución estacional de los valores promedio del total de ESPZ por eyaculado, por orden de eyaculación, de los carneros que intervinieron durante en la prueba.

Se observa que el total de ESPZ del 1º eyaculado fue mayor en todas las estaciones.

Puede verse en ambos gráficos, que el total de ESPZ por eyaculado fue mayor en verano y otoño (estación reproductiva).

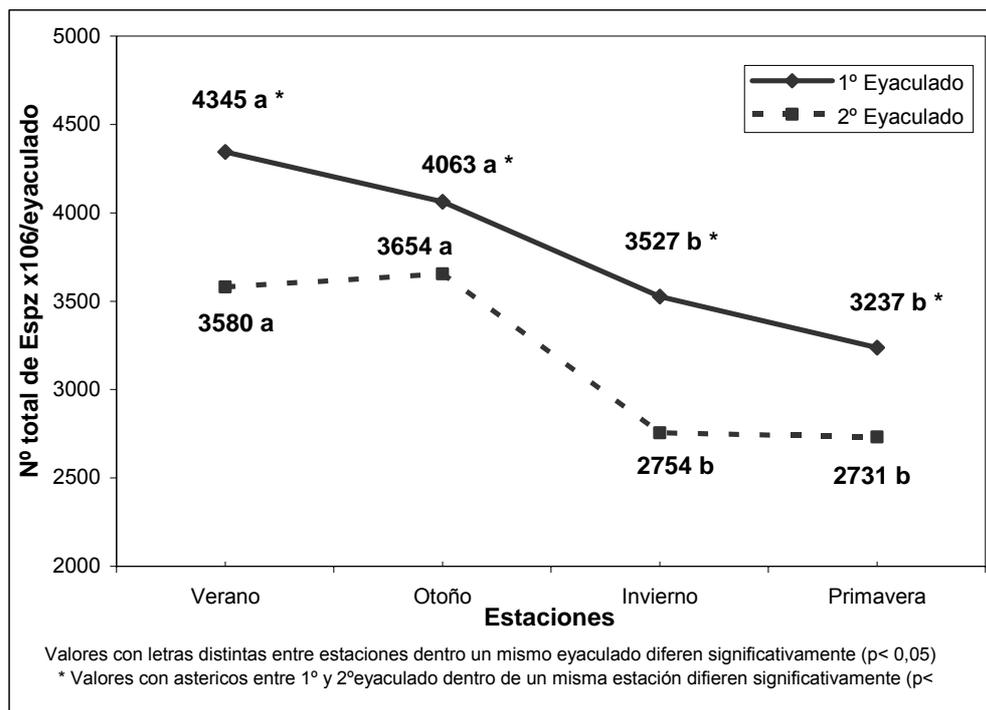


Figura 27: Total de Espz promedio del eyaculado, de acuerdo al orden de eyaculación de carneros Corriedale y Pampinta según las estaciones del año

4.3.6. Motilidad progresiva

En el Figura 28 se observa la evolución estacional de los promedios de motilidad progresiva por raza, de los carneros que intervinieron durante el periodo de la prueba.

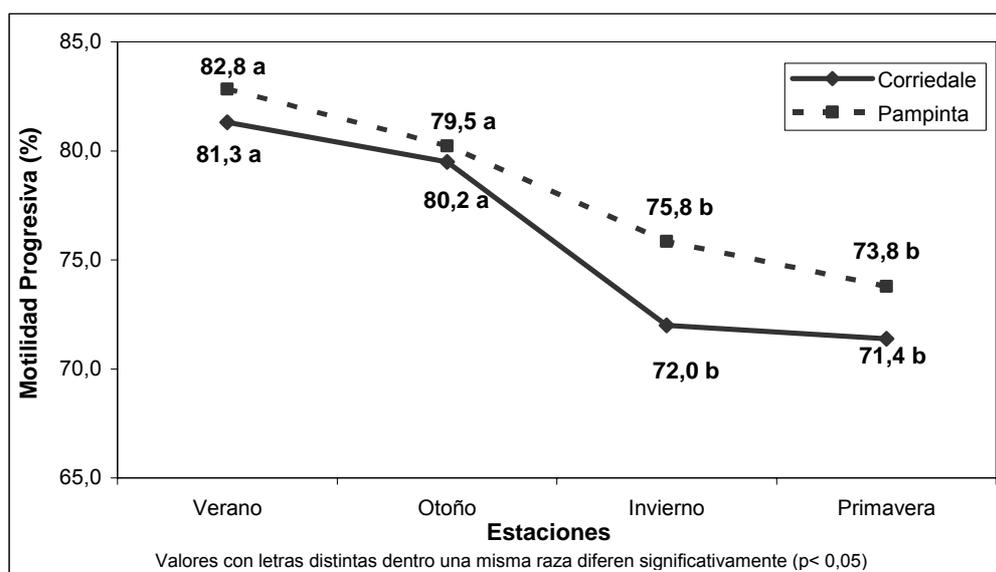


Figura 28: Motilidad progresiva (%) promedio, de carneros Corriedale y Pampinta según las estaciones del año

Se observa que la motilidad progresiva de la raza Pampinta fue mayor en todas las estaciones, aunque no se registraron diferencias significativas.

En la Figura 29 se observa la evolución estacional de los valores promedio de motilidad progresiva por orden de eyaculación, de los carneros que intervinieron en la prueba.

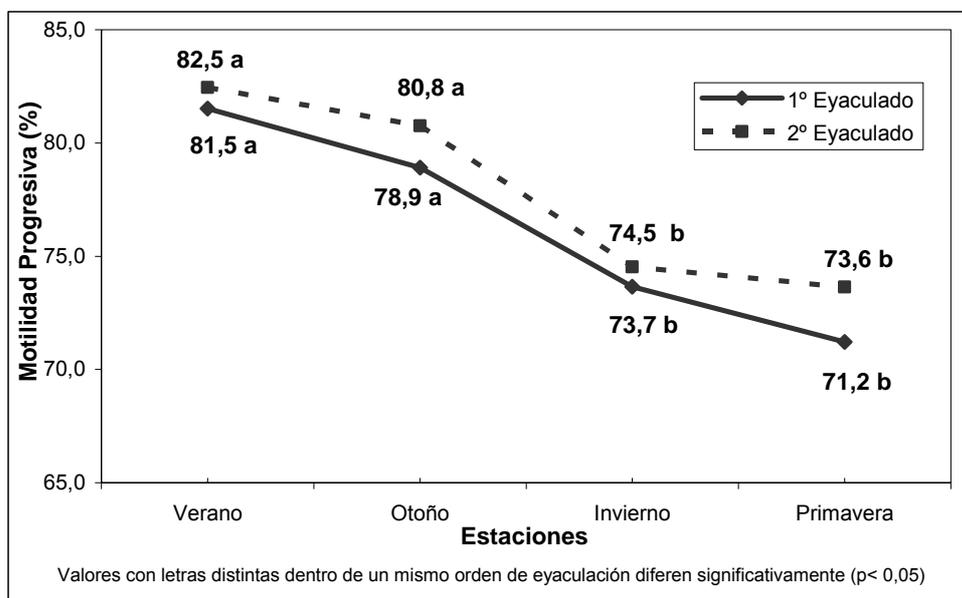


Figura 29: Motilidad progresiva (%) promedio del eyaculado, de acuerdo al orden de eyaculación de carneros Corriedale y Pampinta según las estaciones del año

La motilidad progresiva fue mayor en verano y otoño. En todas las estaciones el 2º eyaculado tendió a tener una mayor motilidad progresiva. En ambos gráficos, puede observarse que la motilidad progresiva fue mayor en verano y otoño.

4.3.7. Vigor

En la Figura 30 se observa la evolución estacional de los valores promedio de vigor espermático por raza, de los carneros que intervinieron en la prueba.

El vigor en la raza Pampinta fue levemente mayor en todas las estaciones.

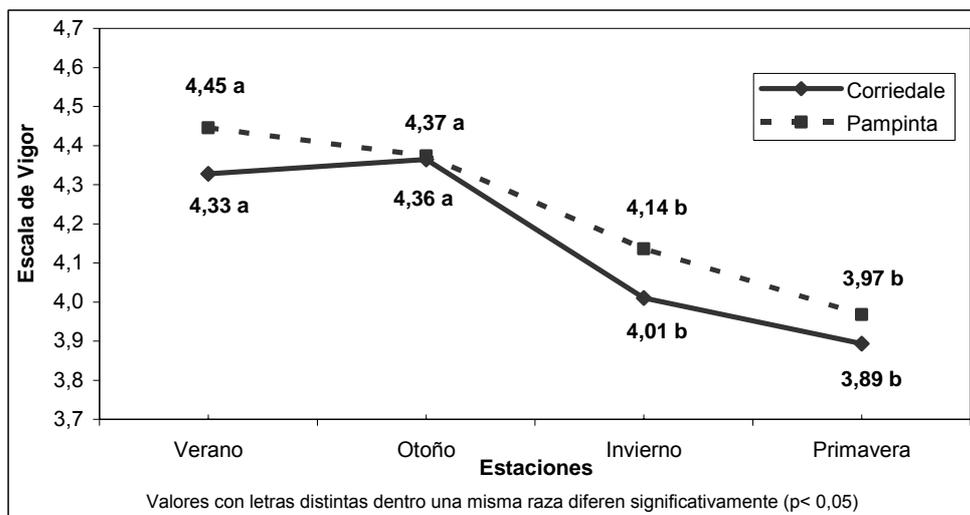


Figura 30: Vigor promedio, de acuerdo a la raza de carneros Corriedale y Pampinta según las estaciones del año

En la Figura 31 se observa la evolución estacional de los valores promedio del vigor por orden de eyaculación, de los carneros que intervinieron en la prueba.

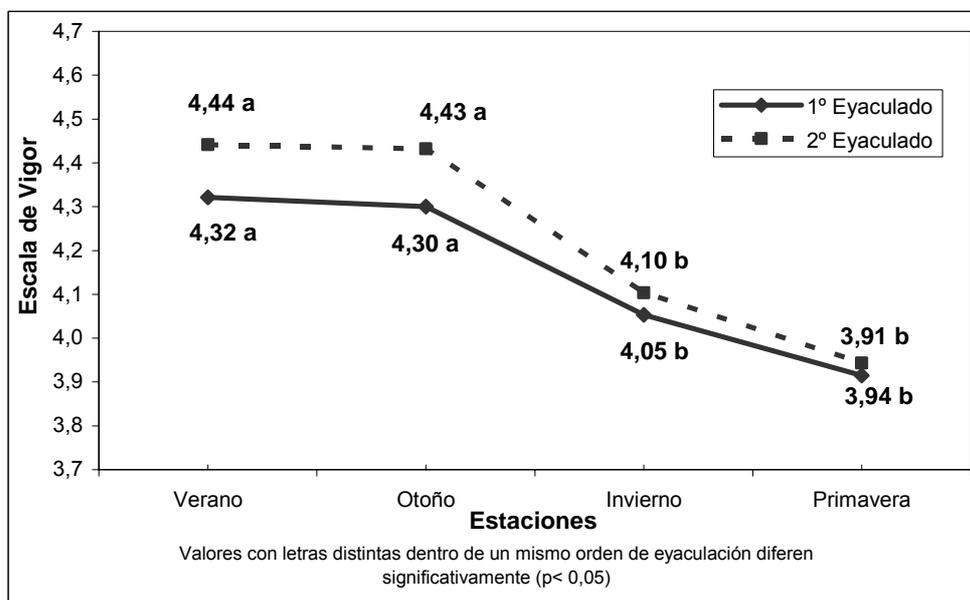


Figura 31: Vigor promedio del eyaculado de acuerdo al orden de eyaculación de carneros Corriedale y Pampinta según las estaciones del año

Los ESPZ del 2° eyaculado tuvieron mayor vigor en todas las estaciones. En ambos gráficos puede observarse que los valores de vigor espermático fueron más altos en la estación reproductiva (verano y otoño) y que fueron disminuyendo hacia la estación no reproductiva.

4.3.8. Viabilidad espermática y determinación de la relación vivos / muertos

En la Figura 32 se observa la evolución estacional de los porcentajes promedio de ESPZ vivos por raza, de los carneros que intervinieron en la prueba.

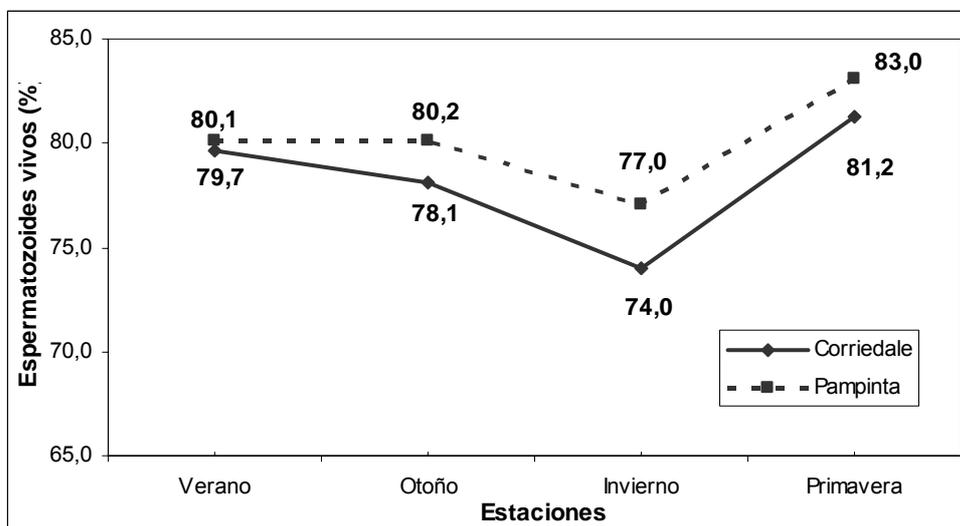


Figura 32: Espermatozoides vivos (%), de carneros Corriedale y Pampinta según las estaciones del año

La raza Pampinta tuvo con respecto al Corriedale una leve diferencia a su favor en el porcentaje de ESPZ vivos en todas las estaciones, aunque no se diferenció significativamente.

En la Figura 33 se observa la evolución estacional de los porcentajes promedio de ESPZ vivos por orden de eyaculación, de los carneros que intervinieron en la prueba.

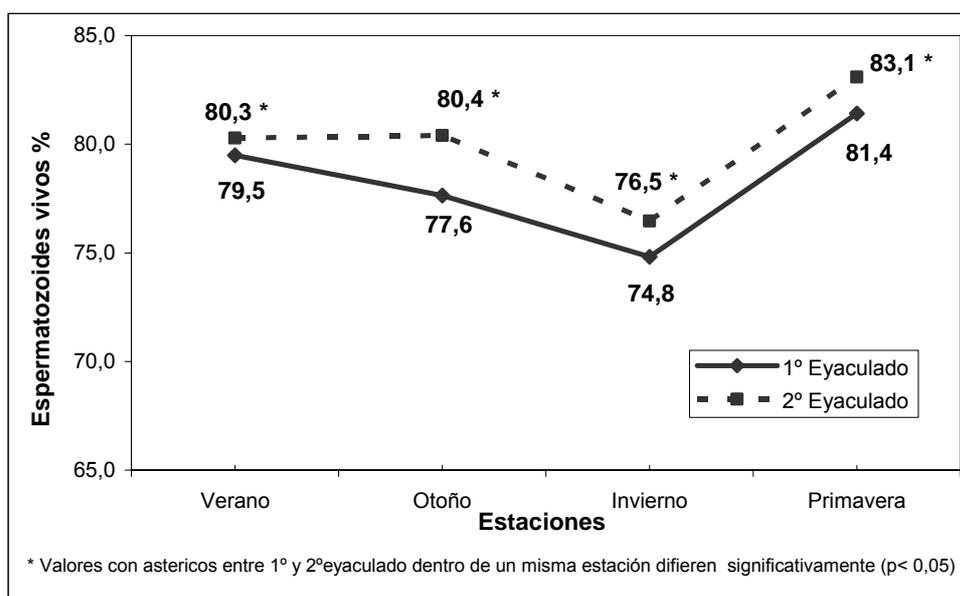


Figura 33: Espermatozoides vivos (%) del eyaculado, de acuerdo al orden de eyaculación de carneros Corriedale y Pampinta, según las estaciones del año.

El porcentaje de espermatozoides vivos del 2º eyaculado fue mayor en todas las estaciones, registrándose valores similares para cada una de ellas.

En ambos gráficos, se evidencia una tendencia a disminuir el porcentaje de células vivas desde la primavera hacia el invierno.

4.3.9. Morfología espermática

En la Figura 34 se observa la evolución estacional de los porcentajes promedio de ESPZ normales por raza, de los carneros que intervinieron en la prueba.

El porcentaje de ESPZ normales fue mayor en la raza Corriedale y las diferencias entre estaciones, fueron más evidentes, lográndose porcentajes mayores en la estación reproductiva.

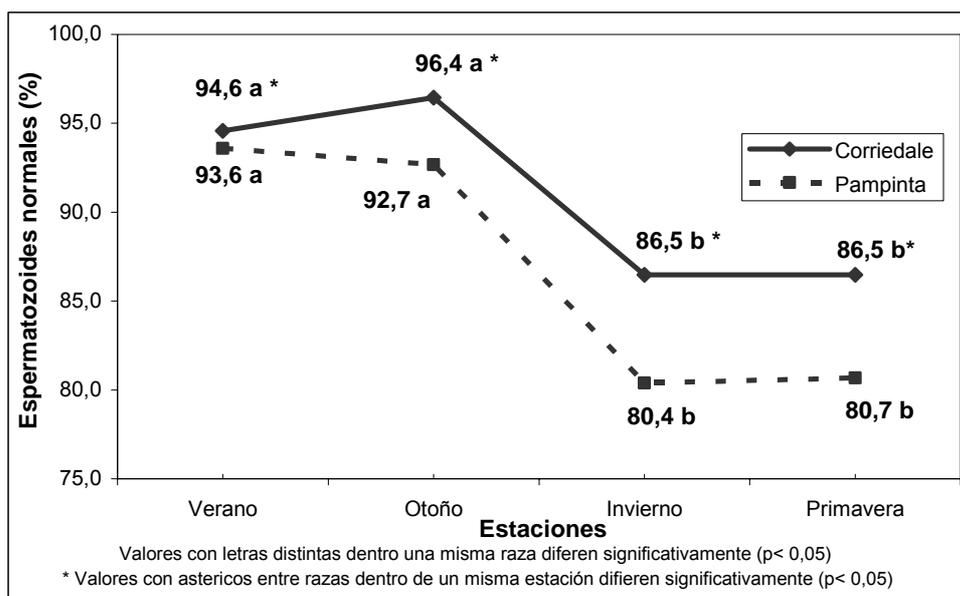


Figura 34: Medias de espermatozoides normales (%), de acuerdo a la raza de carneros Corriedale y Pampinta según las estaciones del año

En la Figura 35 se observa la evolución estacional de los porcentajes promedio de ESPZ normales por orden de eyaculación, de los carneros que intervinieron en la prueba.

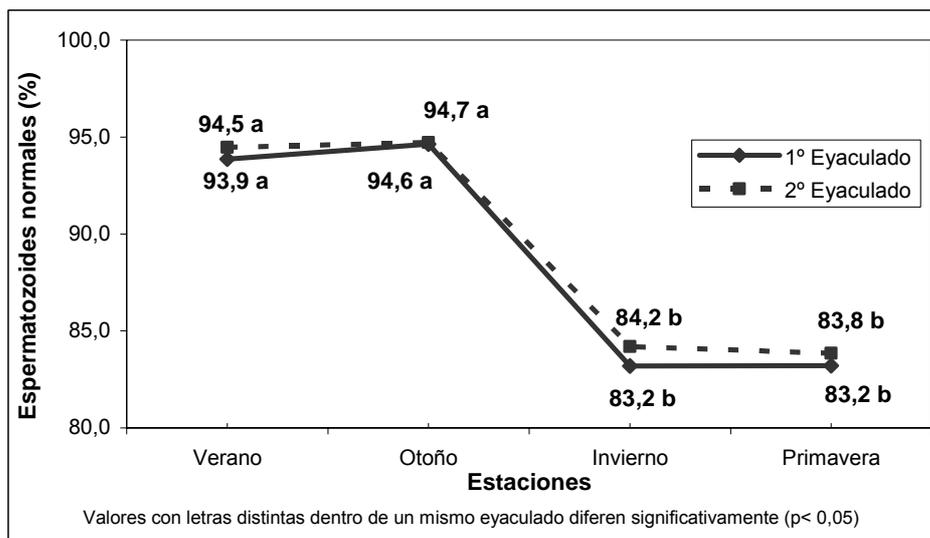


Figura 35: Porcentaje de espermatozoides normales (%) del eyaculado, de acuerdo al orden de eyaculación de carneros Corriedale y Pampinta según las estaciones del año

El porcentaje de ESPZ normales marcó una tendencia muy leve a ser mayor para el 2° eyaculado, no alcanzando a diferenciarse significativamente. Fue más importante la variación entre estaciones, observándose mayores porcentajes de ESPZ normales en la estación reproductiva (verano – otoño).

4.3.9.1 Anormalidades morfológicas espermáticas.

En la Tabla 15 se muestra la frecuencia de las anormalidades morfológicas encontradas en las 436 muestras procesadas.

Tabla 15: Anormalidades morfológicas mas frecuentemente observadas (%)

Anormalidades	Estaciones				Raza	
	Verano n=107	Otoño n=126	Invierno n=109	Primavera n=94	Corriedale n=234	Pampinta n=202
Gota citoplasmática (*)	2,06±0,2c	1,85±0,3c	9,06±0,8a	6,70±0,8b	3,29±0,32b	6,97±0,62a
Colas cortadas, torcidas, dobladas y espiraladas (*)	1,56±0,3c	1,27±0,1c	4,05±0,6b	6,84±1,0a	2,48±0,37b	4,44±0,47a
Acrosoma replegado o desprendido (*)	1,02±0,2	0,85±0,1	1,22±0,2	1,23±0,2	1,33±0,2	0,73±0,1
ESPZ decapitados (*)	0,95±0,1	0,90±0,1	2,03±0,3	1,49±0,3	1,30±0,14	1,39±0,22
ESPZ macro o microcéfalos (*)	0,2±0,05	0,14±0,04	0,1±0,04	0,1±0,03	0,15±0,03	0,15±0,03
Mala implantación de la parte intermedia (*)	0,02±0,01	0	0	0,03±0,02	0,02±0,010	0,01±0,005
Pieza intermedia dañada (*)	0,01±0,01	0	0,02±0,02	0	0	0,02±0,01
Totales (*)	5,8±0,5b	5,0±0,4b	16,5±1,2a	16,4±1,3a	8,6±0,6b	13,7±0,9a

Valores con letras distintas en las filas dentro de estación y raza difieren significativamente ($p < 0,05$)

(*) datos transformados por el $\arcsen \sqrt{x}$.

En ambas razas se destaca el incremento de anomalías morfológicas espermáticas en la estación no reproductiva y especialmente de la presencia de gotas citoplasmáticas y de colas con diferentes tipos de anomalías; sin embargo, al comparar el efecto de raza, se observa que el semen de la raza Pampinta tuvo mayores porcentajes ESPZ con anomalías de cola y presencia de gotas citoplasmáticas que el de la raza Corriedale.

4.4. Evaluación de semen descongelado

En la evaluación del semen descongelado se procesaron 114 muestras, correspondiendo 57 de ellas a la raza Corriedale e igual cantidad a la raza Pampinta.

Como fue señalado en el ítem 3.9., estas muestras correspondían a 15 pools de semen congelado por cada raza para cada estación a excepción de la muestra del verano en que se dispuso de 12 pools por raza, donde se procesaron solamente 24 muestras incluyendo ambas razas. El motivo de esta asimetría se debió a cuestiones logísticas que impidieron realizar las 5 sesiones de congelación programadas en verano.

Al analizar estadísticamente los datos obtenidos en las variables que se midieron, la interacción estación por raza, en ningún caso fue significativa. Los valores medios de las ocho variables estudiadas pueden observarse en la Tabla 16.

Tabla 16: Medias (\pm ES) de las características seminales posdescongelación de semen de carneros

Características seminales	ESTACIÓN				RAZA	
	VERANO n=24	OTOÑO n=30	INVIERNO n=30	PRIMAVERA n=30	CORRIEDALE n=57	PAMPINTA n=57
MP0 (Hora0)	44,2 \pm 1,4 ^{ab}	45,0 \pm 1,2 ^a	39,5 \pm 1,2 ^b	30,8 \pm 1,2 ^c	41,3 \pm 0,9 ^a	38,5 \pm 0,9 ^b
MP2 (Hora2)	32,7 \pm 1,4 ^a	34,2 \pm 1,2 ^a	30,1 \pm 1,2 ^a	24,2 \pm 1,2 ^b	30,6 \pm 0,9	29,9 \pm 0,9
VIG0 (Hora 0)	4,2 \pm 0,1 ^a	4,3 \pm 0,1 ^a	3,4 \pm 0,1 ^b	2,8 \pm 0,1 ^c	3,8 \pm 0,1	3,6 \pm 0,1
VIG2 (Hora 2)	3,2 \pm 0,1 ^a	3,3 \pm 0,1 ^a	2,8 \pm 0,1 ^b	2,1 \pm 0,1 ^c	2,9 \pm 0,1	2,8 \pm 0,1
ACRO-INT (%)(*)	93,3 \pm 0,9	94,0 \pm 0,8	92,3 \pm 0,8	92,6 \pm 0,8	93,6 \pm 0,6	92,5 \pm 0,6
HOS + (%)	35,9 \pm 1,9 ^a	34,9 \pm 1,6 ^a	28,1 \pm 1,6 ^b	23,8 \pm 1,6 ^b	32,0 \pm 1,2	29,3 \pm 1,2
VIABLES (%) (*)	44,2 \pm 2,0 ^a	42,0 \pm 1,8 ^{ab}	36,1 \pm 1,8 ^{bc}	34,9 \pm 1,8 ^c	38,8 \pm 1,3	39,8 \pm 1,3
MIT-FUNC (%)(*)	31,1 \pm 1,7 ^a	30,4 \pm 1,4 ^{ab}	25,1 \pm 1,4 ^b	22,3 \pm 1,4 ^c	25,6 \pm 1,1 ^b	28,8 \pm 1,1 ^a

Valores con letras distintas en las filas dentro de estación y de raza difieren significativamente ($p < 0,05$)

(*) Datos transformados por el $\arcsen \sqrt{x}$, por no presentar distribución normal

En la estación reproductiva (verano-otoño), resultaron mayores los valores de motilidad progresiva a la hora 0 (**MP0**) y a la hora 2 (**MP2**); vigor a la hora 0 (**VIG0**) y a la hora 2 (**VIG2**); porcentaje de ESPZ reaccionados positivamente a la prueba HOS (**HOS+**); porcentaje de ESPZ viables por la prueba de CFDA-PI (**VIABLES**); y

porcentaje de ESPZ con mitocondria funcional (**MIT-FUNC**). No se hallaron diferencias significativas en el estado acrosómico (**ACRO-INT**) debido a efecto de estación.

Cuando el estudio tuvo en cuenta la raza, sólo se observaron diferencias significativas en dos de las variables consideradas. La raza Corriedale mostró mayor motilidad progresiva a la hora 0 (**MP0**), mientras que en el porcentaje de ESPZ con mitocondria funcional (**MIT-FUNC**) la raza Pampinta presentó los valores más altos. En las demás variables no se observaron diferencias significativas.

Sabiendo que, desde el punto de vista estadístico no es necesario mostrar el comportamiento de cada variable, debido a que no hubo interacción entre las variables consideradas, las figuras siguientes muestran cómo fue el comportamiento biológico y puede brindar un panorama más claro de las variables según las estaciones del año por raza y orden de eyaculación.

4.4.1. Motilidad progresiva a la hora 0 y a la hora 2

En la figura 36 se observan los valores promedio de motilidad progresiva a la hora 0 y a la hora 2 por raza, de los pools de semen que fueron evaluados.

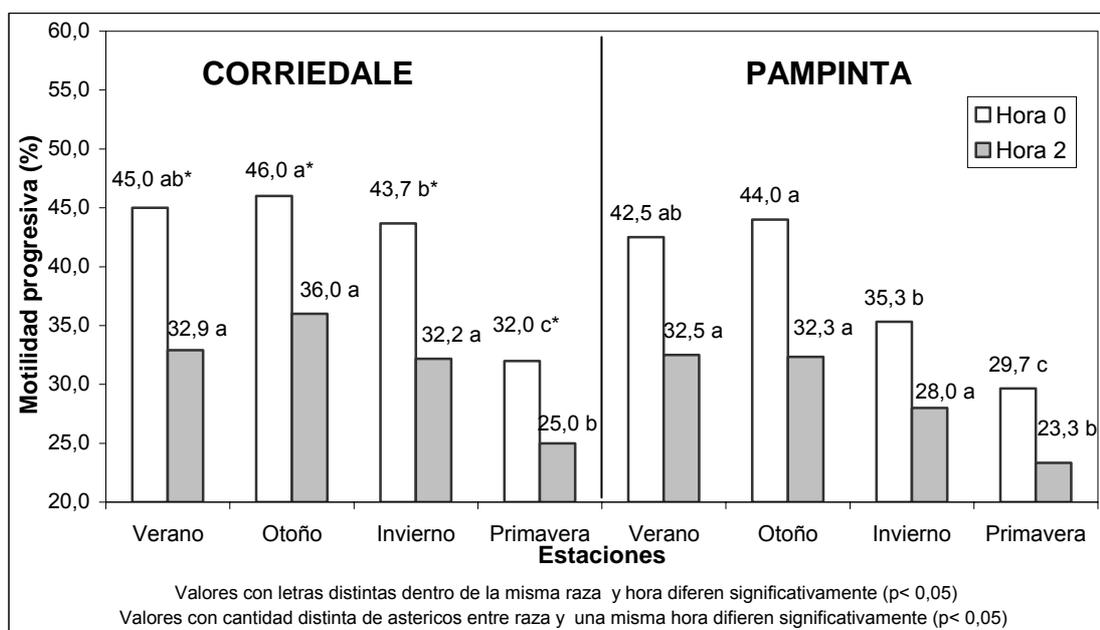


Figura 36: Motilidad progresiva promedio (%) del semen congelado-descongelado a la hora 0 y 2, de carneros Corriedale y Pampinta, de acuerdo a la raza y según las estaciones del año

La motilidad progresiva a la hora 0 fue mayor en todas las estaciones para la raza Corriedale. En ambas razas deben destacarse los altos valores alcanzados en la

estación reproductiva (verano – otoño), pero la raza Corriedale se diferenció claramente de la Pampinta, por el elevado valor de la variable en invierno.

Los valores de la motilidad progresiva a la hora 2 fueron similares entre razas, aunque en todas las estaciones la raza Corriedale tuvo valores superiores aunque no fueron significativos. Se aprecian los valores más altos de otoño, verano e invierno y los más bajos de primavera.

4.4.2. Vigor a la hora 0 y a la hora 2

En la figura 37 se observan los valores promedio de vigor a la hora 0 y a la hora 2 por raza, de los pooles de semen que fueron evaluados.

El vigor a la hora 0 tuvo valores semejantes para ambas razas, aunque la raza Corriedale mostró tendencia a valores levemente más altos en todas las estaciones. Se destacan los valores más altos durante la estación reproductiva.

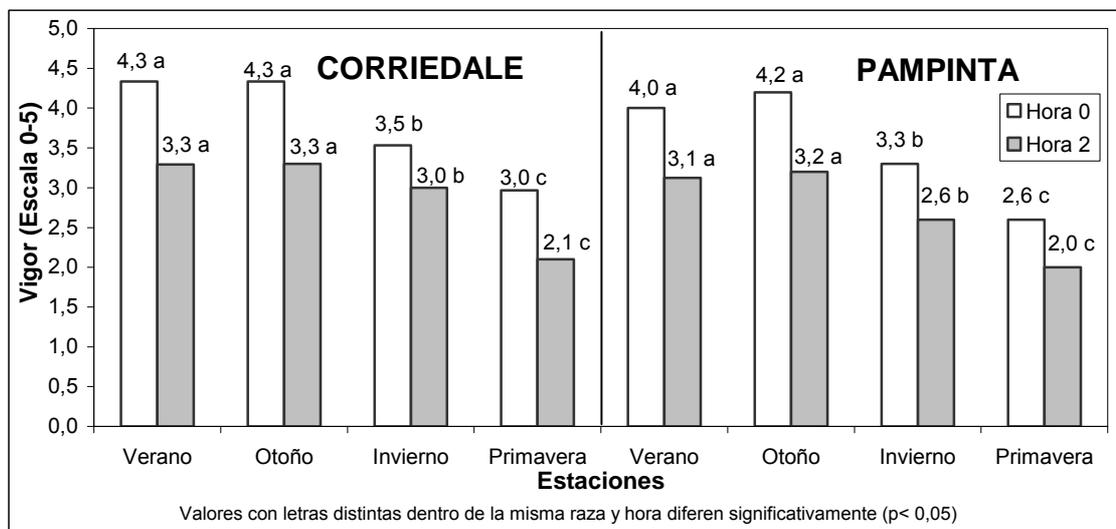


Figura 37: Vigor promedio del semen congelado-descongelado a la hora 0 y 2, de carneros Corriedale y Pampinta, de acuerdo a la raza y según las estaciones del año

Mientras tanto a la hora 2, se observaron valores semejantes entre razas, aunque con tendencia a una leve diferencia en todas las estaciones a favor de la raza Corriedale. Además se aprecian los altos valores en verano y otoño y su pendiente decreciente en invierno y primavera.

4.4.3. Estado del acrosoma

En la Figura 38 se observan el porcentaje promedio de acrosomas intactos por raza, de los pooles de semen que fueron evaluados.

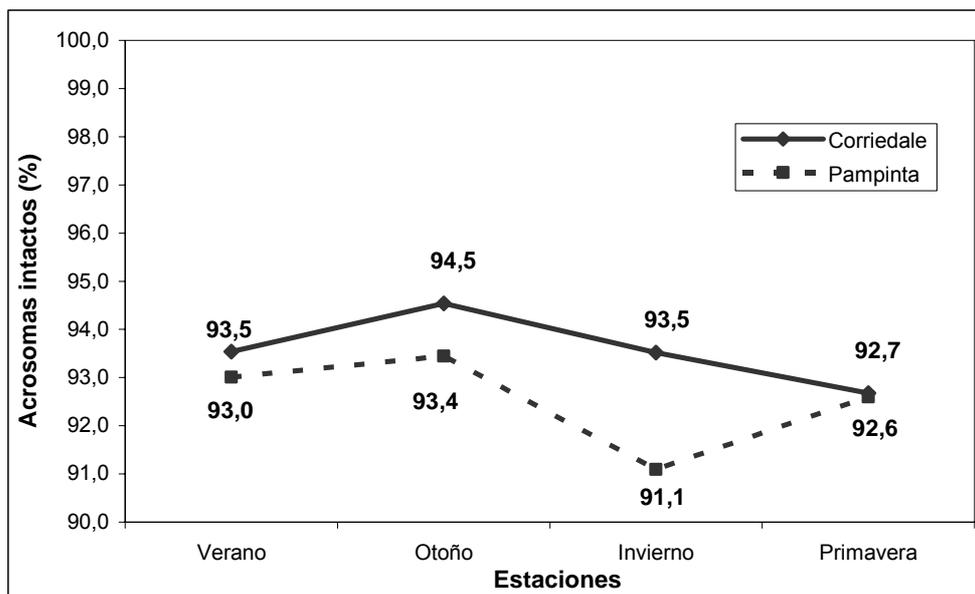


Figura 38: Porcentaje promedio (%) de acrosoma intacto del semen congelado-descongelado, de carneros Corriedale y Pampinta, de acuerdo a la raza y según las estaciones del año

El porcentaje de acrosomas intactos fue levemente superior en la raza Corriedale que en la Pampinta en todas las estaciones y particularmente en invierno, aunque las diferencias no fueron significativas. Entre estaciones tampoco se observaron diferencias significativas, sólo una leve tendencia de valores mayores en otoño.

4.4.4. Actividad bioquímica de la membrana plasmática

En la Figura 39 se observan los porcentajes promedio de ESPZ reaccionados

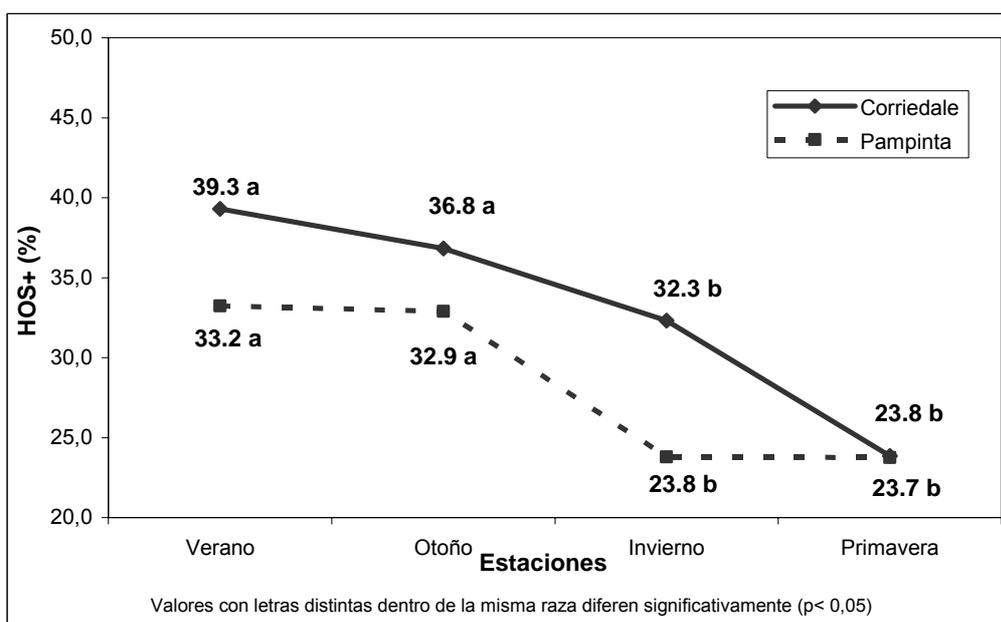


Figura 39: HOS+ promedio (%) del semen congelado-descongelado, de carneros Corriedale y Pampinta, de acuerdo a la raza y según las estaciones del año

positivamente a la prueba HOS por raza, de los pools de semen que fueron evaluados.

El porcentaje de células HOS+ fue mayor para la raza Corriedale en todas las estaciones, aunque las diferencias observadas no alcanzaron a ser significativas. Los valores mayores se registraron en verano y otoño, diferenciándose significativamente de los valores de invierno y primavera.

4.4.5. Sobrevivencia espermática

En la Figura 40 se observa el porcentaje promedio de ESPZ viables determinados por la prueba de tinción vital de CFDA-PI por raza, de los pools de semen que fueron evaluados.

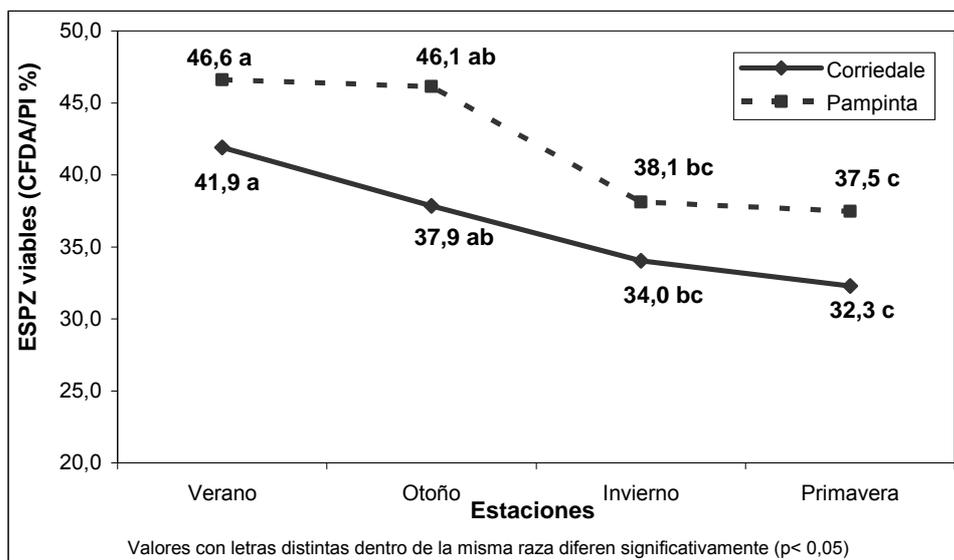


Figura 40: Porcentaje promedio ESPZ viables (%) a la prueba de (CFDA/PI), del semen congelado-descongelado, de acuerdo a la raza según las estaciones del año.

El porcentaje de ESPZ viables tuvo valores superiores para la raza Pampinta en todas las estaciones, aunque no fueron diferentes significativamente. Los valores más altos se registraron en la estación de verano y otoño.

En invierno se registró un valor intermedio que no se diferenció del otoño ni de la primavera. Por otro lado, la primavera registró los valores más bajos, diferenciándose de la estación reproductiva, pero no del invierno.

4.4.6. Actividad Mitocondrial

En la Figura 41 se observa el porcentaje promedio de ESPZ con mitocondrias funcionales por raza, de los pools de semen que intervinieron en la evaluación.

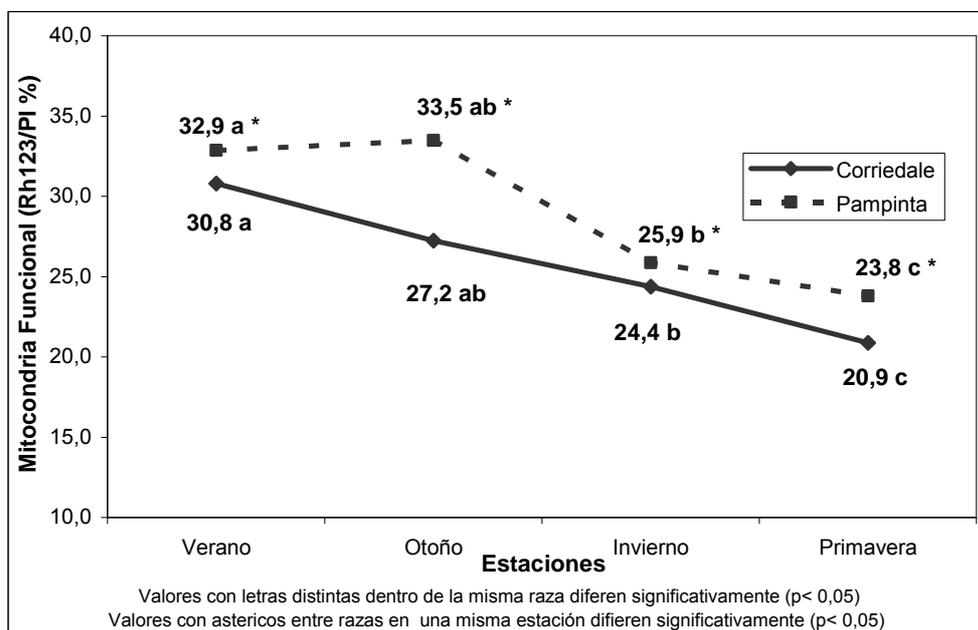


Figura 41: Porcentaje promedio de ESPZ con Mitochondria Funcional (Rh123/PI) (%) del semen congelado-descongelado, de acuerdo a la raza y según las estaciones del año

El porcentaje de ESPZ con mitocondrias funcionales fueron mayores en la raza Pampinta en todas las estaciones, diferenciándose significativamente de los de la raza Corriedale.

En el verano y otoño se registraron los valores más altos en ambas razas, diferenciándose significativamente, de la primavera. El valor intermedio del invierno no alcanzó a ser significativamente diferente del de otoño, aunque si de los de verano y primavera.

4.5. Evaluación de semen congelado-descongelado por medio de CASA

En la evaluación del semen congelado por medio CASA (COMPUTER ASSISTED SPERM ANALYSIS) se procesaron 114 muestras, correspondiendo 57 de ellas a la raza Corriedale e igual cantidad a la raza Pampinta.

Como fue señalado en el ítem 3.9. estas muestras comprendían 15 pools de semen congelado para cada raza para cada estación, a excepción de la del verano en la que se dispuso de 12 pools por raza. El motivo de esta asimetría ya fue explicado en el ítem 4.4.

Se analizaron 11 variables de cada pool. Al analizar estadísticamente los datos obtenidos resultó significativa la interacción estación por raza en 8 de las variables. Fueron ellas: motilidad progresiva (**MP**), velocidad promedio (**VAP**), velocidad

rectilínea (**VSL**), velocidad curvilínea (**VCL**), amplitud lateral (**ALH**), frecuencia de movimientos de la cabeza (**BCF**), porcentaje de rectilinealidad (**STR**) ($STR = VSL \cdot 100 / VAP$) y porcentaje de linealidad (**LIN**) ($LIN = VSL \cdot 100 / VCL$).

Los valores promedio y sus errores estándar pueden observarse en la Tabla 17.

Tabla 17: Características seminales promedio posdescongelación de carneros Corriedale y Pampinta en las 4 estaciones del año

Caract. seminales	CORRIEDALE				PAMPINTA			
	VERANO n=12	OTOÑO n=15	INVIERNO n=15	PRIMAVERA A n=15	VERANO n=12	OTOÑO n=15	INVIERNO n=15	PRIMAVERA =15
MP % (*)	14,1±1,1c	15,5±0,7bc	18,7±1,2a	18,8±1,0a	19,9±0,9a	18,4±0,8a	17,2±0,4ab	17,6±0,6ab
VAP μm/s	71,1±1,7ab	70,8±1,4b	74,7±1,6ab	76,2±1,3a	75,9±3,1a	75,1±1,7ab	72,3±0,8ab	72,8±1,1ab
VSL μm/s	46,9±1,2b	49,6±0,9ab	53,2±1,5a	53,4±1,1a	53,3±2,1a	53,1±1,1a	50,1±0,7ab	51,0±0,7a
VCL μm/s	144,9±3,7ab	132,4±3,3c	142,2±3,3abc	147,7±3,3a	144,7±3,7ab	143,2±3,3ab	137,3±3,3bc	133,8±3,3c
ALH μm	7,7±0,1a	7,8±0,1a	7,8±0,1a	8,2±0,1a	7,7±0,2a	7,9±0,1a	7,8±0,1a	7,6±0,1b
BCF Hz	28,0±0,5bcd	27,2±0,5cd	29,7±0,5a	28,4±0,5ab	27,6±0,5bcd	28,2±0,5abc	27,1±0,5cd	26,7±0,5d
STR % (*)	64,6±0,6c	68,1±0,6ab	69,1±0,6a	67,8±0,6ab	68,0±0,6ab	68,4±0,6ab	66,9±0,6ab	66,8±0,6b
LIN % (*)	34,3±0,5c	38,7±0,7a	38,3±0,4a	36,9±0,3b	37,6±0,6ab	37,9±0,4ab	37,4±0,3ab	38,3±0,3a

Valores con letras distintas en las filas difieren significativamente ($p < 0,05$)

Por no presentar una distribución normal, los datos porcentuales fueron transformados por el $\arcsen \sqrt{x}$.

MP= Motilidad progresiva, **VAP**= Velocidad promedio, **VSL**= Velocidad rectilínea, **VCL**= Velocidad curvilínea, **ALH**= amplitud lateral, **BCF**= Frecuencia de movimientos de la cabeza, **STR**= porcentaje de rectilinealidad y **LIN**= Porcentaje de linealidad.

La raza Pampinta presentó una mayor motilidad progresiva (**MP**) en la estación reproductiva (verano-otoño), con una tendencia declinante hacia las estaciones siguientes. En cambio en Corriedale, se obtuvieron los mayores porcentajes de motilidad progresiva en la estación no reproductiva. La velocidad promedio (**VAP**) y la velocidad lineal (**VSL**) tuvieron un comportamiento similar. En la raza Pampinta hubo tendencia hacia valores mayores en la estación reproductiva, y en Corriedale en cambio, tendencia hacia valores mayores en estación no reproductiva.

La velocidad curvilínea (**VCL**) en Pampinta registró los mayores valores en estación reproductiva, en cambio la raza Corriedale, se observó el menor valor en otoño; no obstante, no hubo diferencias significativas atribuibles a efecto de raza o de estación.

La amplitud lateral (**ALH**) sólo fue diferente en la raza Pampinta en primavera, donde se registró el valor más bajo. La Corriedale no tuvo diferencias entre estaciones.

La frecuencia de movimiento de la cabeza (**BCF**) y el porcentaje de rectilinealidad (**STR**) no presentaron diferencias significativas atribuibles a la raza. En ambas variables, el valor mayor se registró en la raza Corriedale en invierno y en la raza Pampinta en otoño.

Finalmente el porcentaje de linealidad (**LIN**) presentó el mayor registro en otoño e invierno en Corriedale, no siendo diferente de los valores de Pampinta en todas las estaciones. Solamente fue significativamente menor la Corriedale en verano, mientras que en primavera, Corriedale tuvo un valor intermedio, siendo diferente de los valores propios en el resto de las estaciones y de Pampinta en primavera.

Para las 3 variables restantes la interacción estación por raza no fue significativa. Estas fueron: el porcentaje de espermatozoides móviles (**MT**), el porcentaje de elongación (**ELO**) y el área recorrida (**Área**). Sus valores medios pueden observarse en la Tabla 18.

Tabla 18: Características seminales promedio posdescongelación de carneros Corriedale y Pampinta en las 4 estaciones del año

Caract. seminales	ESTACIÓN				RAZA	
	VERANO N=24	OTOÑO n=30	INVIERNO n=30	PRIMAVERA n=30	CORRIEDALE n=57	PAMPINTA n=57
MT % (*)	35,6±2,9ab	31,9±2,1b	40,4±2,7ab	42,3±1,9a	37,4±1,6	37,8±1,8
ELO % (*)	49,3±0,3ab	48,4±0,3b	49,7±0,3a	49,9±0,3a	49,2±0,3	49,4±0,3
Área μm^2	6,3±0,1	6,3±0,1	6,3±0,1	6,4±0,1	6,3±0,1	6,3±0,1

abc valores con letras distintas en las filas dentro de estación y raza difieren significativamente ($p < 0,05$)

MT= Motilidad total, **ELO**= Porcentaje de Elongación, **Área**= Área recorrida.

El menor porcentaje de ESPZ móviles **MT** se observó en el otoño, no existiendo efectos atribuibles a la raza.

El porcentaje de elongación (**ELO**), registró su valor mayor en estación no reproductiva, extendiendo su acción hasta el verano; sin embargo el verano no fue significativamente diferente al menor valor del otoño. Tampoco se observaron efectos atribuibles a la raza.

Por último, el área recorrida por los ESPZ (**AREA**) no evidenció diferencias ni entre estaciones y ni entre razas, siendo todos sus valores similares.

5. DISCUSIÓN

5.1. Medición sobre animales.

La variación del peso vivo de los carneros estuvo influenciada por la estación y por la raza. Las diferencias de conformación y tamaño entre ambas razas se mantuvieron a lo largo del periodo de ensayo, lo que motivó que en carneros adultos y de razas muy distantes que ya completaron su desarrollo, las diferencias iniciales de peso se mantuvieran a lo largo de las estaciones. La reducción de peso invernal en ambas razas obedece a causas ambientales, donde la influencia de la menor temperatura del período afectó tanto al animal como a las pasturas que proporcionaron una parte de su alimentación básica. Se descarta como factor negativo la calidad nutricional proporcionada por la suplementación en las distintas estaciones; es poco probable que haya influenciado en el peso negativamente, ya que la condición corporal no evidenció modificaciones en el verano, otoño e invierno. Sin embargo, en la primavera se logró una mayor condición corporal, siendo semejante a lo observado para el peso vivo de la primavera y el verano. Esto ratifica que, el ambiente, es el principal factor de modificación del peso y la condición corporal.

Similar situación fue encontrada por Mandiki *et al.* (1998a), quienes observaron en ejemplares de las razas Texel, Suffolk e Ile de France que el peso de los carneros adultos disminuyó en el invierno, obteniéndose el mayor registro en el verano, aunque no difirieron estadísticamente entre estaciones y razas. Sin embargo, las diferencias de peso entre las razas, si bien en este caso no fueron estadísticamente diferentes, las diferencias iniciales también se mantuvieron a lo largo de las estaciones y este efecto fue atribuido a diferencias de origen racial. Gastel *et al.* (1995), en el Uruguay, registraron un mayor peso en verano en borregos (carneros jóvenes) diferenciándose del resto de las estaciones (otoño, invierno y primavera) y entre éstas, no se observaron diferencias.

Finalmente, las diferencias de peso entre las razas Corriedale y Pampinta se atribuyen al mayor tamaño y conformación de la segunda. En ésta, la influencia de la raza Frisona es determinante, ya que su tamaño adulto es semejante al de Pampinta. Estas diferencias entre razas también fueron observadas entre Texel, Suffolk e Ile de France (Mandiki *et al.*, 1988a).

La condición corporal aumentó en primavera debido al mejor estado nutricional de los animales, ya que la pastura en esa época ofreció la mejor calidad y cantidad de forraje. En las demás estaciones no hubo variaciones y se considera que el estado nutricional de los animales fue óptimo durante todo el período de ensayo.

La medición de la circunferencia escrotal representa la práctica más aceptada para medir en forma indirecta el volumen testicular. Aquella varía de acuerdo al fotoperíodo, registrándose los valores más altos en verano y los más bajos en el invierno siendo similar a lo encontrado por Kafi *et al.* (2004), quienes en la raza Karakul registraron la menor circunferencia escrotal en el invierno. Otros autores evaluaron el diámetro testicular y observaron las mismas variaciones estacionales (Colas *et al.*, 1986; Chemineau *et al.*, 1988; Avdi *et al.*, 2004;). Sin embargo, Fernández Abella *et al.*, (1993) registraron el mayor volumen testicular en la primavera en carneros de raza Corriedale.

La explicación a este efecto estaría dada por la correlación altamente significativa existente entre el peso vivo y la circunferencia escrotal que fue observada en este ensayo en la raza Corriedale (0,34) y en Pampinta (0,47), debido posiblemente al mejor plano nutricional registrado en la primavera y el verano provisto básicamente por la pastura. Es sabido que, los cambios nutricionales afectan más rápidamente al volumen testicular que al peso corporal (Setchell *et al.*, 1965; Braden *et al.*, 1974; Lindsay, 1976; Lindsay *et al.*, 1976; Oldham, *et al.*, 1978, citados por Fernández Abella, 2001).

La mayor circunferencia escrotal de la raza Pampinta obedece a su mayor tamaño corporal respecto de la Corriedale. Esta relación también fue observada por Mandiki *et al.* (1998a) al comparar el diámetro testicular de carneros Texel, Ile de France y Suffolk. Estos autores encontraron diferencias de 1 cm de diámetro testicular en la misma estación cuando compararon carneros de raza Texel de menor tamaño, con carneros Ile de France de mayor tamaño. En esos mismos períodos la diferencia de peso entre ambas razas, fue cercana a los 22 Kg. La raza Suffolk tuvo un comportamiento parecido al Ile de France.

Las concentración de testosterona plasmática fue máxima en el verano, un poco menor en el otoño y mínima en el invierno y en la primavera. Gündoğan (2007), reportaron un comportamiento similar en la concentración plasmática de testosterona de carneros de razas autóctonas de Turquía como la Daglic y Chios, registrándose valores altos en verano y otoño y bajos en invierno y primavera. Similar situación fue encontrada por Lincoln *et al.* (1990) en carneros Mouflon europeos, Soay, Shetland, Blackface, Herdwick, Norfolk, Wiltshire, Portland y Merino. El efecto del fotoperíodo es la explicación a este comportamiento, cuya consecuencia más importante es el aumento de la masa testicular en las estaciones de verano y otoño, que a su vez trae aparejado un mayor número de células intersticiales o de Leydig en funcionamiento,

que con la debida estimulación neurohormonal (menor horas de luz, mayor secreción de melatonina y LH), segregan mayor cantidad de testosterona, aumentando, por ende la concentración sanguínea. La correlación altamente significativa entre la circunferencia escrotal y la concentración de testosterona en Corriedale (0,32) y en Pampinta (0,63), refuerza la hipótesis que el aumento de la masa del tejido testicular aumenta la concentración de testosterona plasmática y como ya se sostuvo anteriormente, el aumento del tejido testicular está íntimamente relacionado con el cambio de peso y con el fotoperíodo negativo. Tulley y Burfening, (1983) observaron que, el acortamiento de las horas luz incrementó la circunferencia escrotal y la libido de los carneros sometidos a un régimen de 8L:16O (8 h de luz y 16 h de oscuridad). También Gastel *et al.*, (1995) en el Uruguay, señalaron que el diámetro de los túbulos seminíferos está correlacionado con la circunferencia escrotal y el nivel de testosterona en sangre en carneros de raza Corriedale. Sin embargo Mandiki *et al.*, (1998b), encontraron que la mayor concentración plasmática de testosterona se registró en otoño, siendo menor en las estaciones de verano, invierno y primavera, trabajo realizado en las razas Texel, Suffolk e Ile de France.

En cuanto a la capacidad de servicio, los carneros experimentaron un incremento en el número de cópulas completas en la estación del otoño, siendo menor y no diferente entre sí en el resto de las estaciones. Esto no coincide con lo reportado por Kafi *et al.*, (2004) quien observó un menor número de cópulas en otoño y un mayor número en invierno. El incremento otoñal en el número de cópulas completas, se explica por una mayor libido que responde a la agudización del fotoperíodo, es decir, cuando las diferencias en la cantidad de horas luz y de oscuridad son máximas. Este fenómeno debería acompañarse con una mayor concentración de testosterona plasmática, hecho que no ocurrió en el presente trabajo, pues la concentración máxima se obtuvo en verano. Es probable que, el mayor peso vivo registrado en primavera haya motivado el incremento de la circunferencia escrotal hacia la estación del verano. Si se tiene en cuenta lo afirmado por Gastel *et al.* (1995), ese incremento en la circunferencia escrotal puede estar explicado por un incremento en masa testicular y por consiguiente un ensanchamiento en el diámetro de los túbulos seminíferos y un mayor nivel de testosterona plasmática. La posterior leve disminución de la circunferencia escrotal experimentada en otoño, genera un plano menor en la concentración de testosterona, pero aún persistente en la libido. Kafi *et al.* (2004) sostienen que la concentración de testosterona disminuye un mes después de la

disminución de la circunferencia escrotal, en coincidencia con los hallazgos de Perez *et al.* (1997) y Bremmer *et al.* (1984), ambos obtenidos en la raza Corriedale.

En la raza Corriedale, se registró un mayor número promedio de montas que en la raza Pampinta durante el tiempo (20 minutos) que transcurrió la prueba de capacidad de servicio. Esto puede deberse a una menor habilidad *per se* para la cópula de los carneros de la raza Corriedale, que requirieron un mayor número de montas para lograr una cópula completa. Hallazgos similares fueron reportados por El-Alamy *et al.* (2001), quienes observaron que, la libido de carneros de la raza Finn, fue superior a los carneros de la raza Dorset, en el transcurso de un ensayo, donde los carneros fueron estimulados con un régimen cambiante de luz-oscuridad. En primera instancia fueron estimulados con un régimen de 8L:16O y luego con 16L:8O.

5.2. Variaciones estacionales de los parámetros seminales

El efecto de la estación sobre la calidad del semen ha sido estudiado en diferentes razas. En carneros de raza Ile de France (Colas, 1980), en carneros de razas Suffolk, Texel y Dorset Horn (Boland *et al.*, 1985), cruza Finn (Amir *et al.*, 1986) y cruza por Chios (Ibrahim, 1997). En este trabajo se pudo observar una aceptable actividad en ambas razas durante todas las estaciones del año, sin embargo, se observaron variaciones estacionales en las características seminales. El semen de mejor calidad fue producido en verano y otoño, independientemente de la raza. Estudios previos publicados por otros autores (Colas *et al.*, 1986; Langford *et al.*, 1989), confirman el paralelismo estacional entre el diámetro testicular y la producción de ESPZ.

Del conjunto de variables estudiadas, sólo fueron afectadas por la estación, el volumen, el total de ESPZ por eyaculado (depende de la concentración y volumen), la motilidad progresiva, el vigor y el porcentaje de ESPZ normales. El incremento ocurrido en el verano y el otoño para estas variables, se encuentra en correspondencia con la etapa reproductiva de la especie ovina.

El volumen del eyaculado se incrementa a expensas de mayor participación de células espermáticas y del plasma seminal. Aparentemente el aporte en la cantidad de células y plasma se incrementó en la etapa reproductiva, sin embargo, la concentración de ESPZ/ml de eyaculado no fue afectada por la influencia de las estaciones. Esta misma situación fue reportada por Boland *et al.* (1985), quienes registraron valores de volumen seminal superiores en verano en relación a los valores de la primavera, cabe destacar que estos autores sólo registraron datos de estas dos estaciones.

Los mayores valores de motilidad progresiva y vigor registrados en verano y otoño, muestran la influencia de la época reproductiva y las mejores condiciones del semen en estas estaciones. Esto puede explicarse en el mayor porcentaje de ESPZ normales que se presentó en las mismas estaciones (verano - otoño). Recordemos que, las anomalías morfológicas se incrementaron en forma importante en las estaciones "no reproductivas" (invierno y primavera), aumentando las gotas citoplasmáticas y especialmente las anomalías de cola, que consecuentemente disminuyen la efectividad del movimiento del flagelo. Esto coincide con lo reportado por Amir *et al.*, (1986) quienes observaron que los carneros de raza Finn incrementaron el porcentaje de anomalías morfológicas en invierno y primavera. La mejora de la calidad espermática de las razas Corriedale y Pampinta registrada en la época reproductiva es equivalente a los resultados obtenidos por Colas *et al.* (1990) en carneros de raza Ile de France, Mandiki *et al.* (1998a) en carneros de raza Ile de France, Suffolk y Texel y Karagiannidis *et al.* (2000) en carneros de raza Chios y Frisona.

La motilidad masal y el porcentaje de ESPZ vivos no fueron influenciados por las estaciones, coincidiendo estas observaciones con lo reportado por Mandiki *et al.*, (1998a) en semen de carneros de raza Ile de France, Suffolk y Texel, quienes observaron, en la etapa de crecimiento de carneros hasta los 2 años de edad, mayores variaciones entre razas que entre estaciones.

Las diferencias entre razas en la calidad espermática se reflejaron en la mayor concentración y por ende un mayor número de ESPZ totales por eyaculado observado en la raza Pampinta. Estas diferencias podrían atribuirse a la mayor circunferencia escrotal de los carneros Pampinta con respecto a Corriedale, que indicaría una mayor masa de tejido testicular y por consiguiente una mayor producción de ESPZ.

No encontramos una explicación al mayor porcentaje de ESPZ normales, obtenido por la raza Corriedale, probablemente la mejor adaptación al medio ambiente y al clima por esta raza, por un mayor tiempo de permanencia en estas latitudes contribuyan a ese resultado. Sin embargo, la raza Pampinta se originó en una latitud similar al lugar del presente ensayo, aunque en un clima con menor humedad ambiental. No encontramos información sobre calidad seminal de la raza Frisona, componente mayor de la raza Pampinta, que pudiera contribuir a explicar genéticamente este resultado.

No hubo diferencias entre razas en el volumen, la motilidad masal, la motilidad progresiva, el vigor y el porcentaje de ESPZ vivos. Mandiki *et al.* (1998a) evaluaron en las razas Ile de France, Suffolk y Texel, realizando un análisis separando las razas

dentro de la estación. En este caso, en el volumen del eyaculado, no se encontraron diferencias entre razas en primavera y verano, sin embargo, se hallaron diferencias en la estación reproductiva, donde la raza Texel tuvo los mayores registros y la raza Ile de France tuvo el menor registro en otoño. En el mismo análisis, en la motilidad masal se determinaron diferencias en verano, otoño e invierno, donde los menores valores correspondieron a la raza Texel.

Los mayores valores de las anomalías morfológicas en conjunto, se registraron en este ensayo en la época no reproductiva (invierno-primavera). Las gotas citoplasmática y defectos de cola, fueron las que registraron mayor frecuencia de variación. Amir *et al.* (1986) registraron un incremento de células anormales en invierno y primavera, debido fundamentalmente a gotas citoplasmáticas, defectos de cola y de acrosoma, coincidiendo con los resultados obtenidos en esta tesis.

En cuanto al orden de eyaculación, el primer eyaculado resultó con un mayor volumen, una mayor concentración de ESPZ/ml y por consiguiente un mayor número total de ESPZ por eyaculado, resultado lógico por otra parte, en cuanto a las dos primeras variables y la tercera es dependiente de las dos primeras. Amir *et al.* (1986) evaluaron las mismas variables y encontraron diferencias favorables para el primer eyaculado atribuibles al efecto de eyaculación. En concordancia Ibrahim (1997), en eyaculados de carneros de raza Chios, registraron valores mayores, en el primer eyaculado en las variables volumen y concentración de ESPZ/ml, con respecto del segundo eyaculado. También Nel-Themaat *et al.*, (2006), registraron valores más altos en el primer eyaculado de los parámetros volumen, concentración de ESPZ/ml y número total de ESPZ por eyaculado.

La motilidad progresiva, vigor y porcentaje de ESPZ normales no evidenciaron diferencias por orden de eyaculación. Esto se debe a que, al no haber fallas en la espermatogénesis no se pueden observar variaciones importantes, dada la baja cantidad de eyaculados semanales que se obtuvo en este ensayo. Las anomalías se hacen presentes con una mayor frecuencia de eyaculación (Amir *et al.*, 1986).

En el segundo eyaculado se determinó una mayor motilidad masal, pH y porcentaje de ESPZ vivos. Datos similares fueron registrados por Nel-Themaat *et al.* (2006), quienes registraron un valor más alto para la motilidad del segundo eyaculado. Es posible que, en el primer eyaculado se eliminen células muy maduras o muertas y algunos detritos orgánicos que disminuyan las tres variables medidas. Recordemos que, el flujo de ESPZ por el conducto deferente es constante y que muchas de estas células permanecen en la ampolla hasta el momento de la eyaculación. Estas células

se encuentran muy maduras, con viabilidad reducida y algunas muertas. También Ibrahim (1997) registraron valores más altos de motilidad masal y pH para el segundo eyaculado, comparado con el primero, aunque, el pH no fue diferente significativamente.

5.3. Evaluación de semen descongelado

Los pools de semen congelado/descongelado de cada estación y raza fueron evaluados inmediatamente a la descongelación (hora 0) y dos horas después (hora 2) (test de termorresistencia), observándose la declinación de la motilidad progresiva y el vigor en ese lapso de tiempo. En el semen congelado en el verano y otoño los valores de motilidad progresiva y vigor a la hora 0 y a la hora 2 fueron más altos que en el invierno y en la primavera. En términos relativos la magnitud de caída en motilidad progresiva y vigor en todas las estaciones fue similar, aunque los valores de la hora 0 de las estaciones reproductivas (verano -otoño), se destacan sobre los de las estaciones no reproductivas (invierno - primavera).

El porcentaje de acrosoma intacto fue similar en todas las estaciones observándose valores semejantes a los hallados por Fischman *et al.* (2007), quienes encontraron valores de integridad acrosómica del 93,8 % en semen congelado/descongelado de carneros de raza Frisona.

La prueba HOS mostró valores bien diferenciados en las estaciones “reproductivas” (verano - otoño) versus la “no reproductivas” (invierno – primavera). En las estaciones donde se observó un mayor porcentaje de células motiles, se observó valores HOS+ más elevados, en concordancia por lo sostenido por Esteves *et al.* (2000) quienes observaron una alta relación entre la motilidad progresiva y los valores de HOS+. Sin embargo, Blach *et al.* (1988) y Smikle y Turek (1997) registraron la presencia de espermatozoides congelados/descongelados inmóviles con su membrana plasmática intacta (HOS+). Otros trabajos realizados con semen de ovino no detectaron una correlación significativa entre los valores de la prueba HOS y motilidad espermática (García Artiga, 1994; Boretto *et al.*, 2002). De lo antedicho se desprende que la prueba HOS no sería tan efectiva para caracterizar la calidad seminal, más bien debería utilizarse como prueba orientativa y no definitiva.

La prueba de viabilidad con fluorocromos (CFDA/PI) demostró un comportamiento semejante a lo ocurrido con el test hipoosmótico, observándose valores altos en verano, intermedios en otoño e invierno y bajos en primavera. Estos valores por estación, observados individualmente, son comparables con los obtenidos por Azerêdo

et al. (2001) en semen congelado/descongelado de caprinos. Por otro lado, los resultados del trabajo de Smith y Murray (1997), demostraron que no hay diferencias entre las técnicas de tinción eosina-nigrosina y CFDA/PI, después de evaluar semen (fresco y congelado/descongelado) de bovino y ovino; también, Valcárcel *et al.*, (1994) publicaron que es posible observar una proporción de células teñidas con el yoduro de propidio (interpretadas como muertas) que presentan motilidad cuando se emplea la técnica de la CFDA/PI en ESPZ congelados/descongelados de ovino.

Lamentablemente la técnica de CFDA/PI se ha utilizado muy poco en semen ovino y menos aún tratando de reflejar los cambios estacionales. Sin embargo, otros investigadores han evaluado la influencia de la estación con otros fluorocromos como el FITC-PSA (Hoechst 33258=Isotiocianato de fluoresceína y la conocida Aglutinina *Pisum sativum*, descrita por Cross y Meizel (1989) y adaptada por D'Alessandro y Martemucci, (2003) hallando resultados comparables de viabilidad a los obtenidos con CFDA/PI.

La prueba de funcionalidad de mitocondrias se determina utilizando sondas moleculares fluorescentes marcadoras de mitocondrias (mitotracker). Las más frecuentes utilizadas por los investigadores son la JC-1, MITO y Rhodamina 123. Esta última en asociación con colorantes fluorescentes para determinar la viabilidad del ESPZ, permite determinar las células que se encuentran viables y con las mitocondrias funcionales (proceso oxidativo del ciclo de Krebs). Esta funcionalidad y por ende la posibilidad de captación de Rhodamina 123 por parte de las mitocondrias de los ESPZ, disminuye sustancialmente luego del proceso de congelado/descongelado en los ESPZ del carnero (Windsor; White, 1995)

La funcionalidad de las mitocondrias del pool de semen descongelado tuvo un comportamiento estacional semejante a lo observado para la viabilidad. Los valores fueron altos en verano, intermedios en otoño e invierno y bajos en primavera. En la estación reproductiva (verano-otoño) la funcionalidad de las mitocondrias está de acuerdo a lo observado en las pruebas de viabilidad y en la actividad bioquímica de la membrana. Sin embargo, en la estación "no reproductiva", específicamente en el invierno, se registró un valor bastante menor, aunque estadísticamente similar al obtenido en otoño y diferente del verano. Garner *et al.* (2007) con datos registrados en semen de toros, informaron que los porcentajes de motilidad progresiva espermática estimada visualmente usando microscopía de luz, fueron mayores que los observados en la estimación de mitocondrias funcionales utilizando sondas fluorescentes como la Rhodamina 123, JC-1 o MITO; sin embargo, la motilidad progresiva y funcionalidad de

mitocondrias se encuentran correlacionados en un orden del $r = 0,96$, $0,97$ y $0,96$ respectivamente.

Diferencias entre razas, prácticamente no se hallaron en las evaluaciones del semen posdescongelado. Sólo fueron observados una mejor motilidad progresiva a la hora 0 de la raza Corriedale y la mejor funcionalidad de las mitocondrias en la raza Pampinta. No se encontraron causas que puedan explicar estos resultados y tampoco se hallaron publicaciones que sostengan o rechacen diferencias entre razas en evaluaciones de pool de semen posdescongelación por esta técnica, teniendo en cuenta que para la congelación del semen evaluado se había utilizado el mismo protocolo de congelación en ambas razas. La explicación podría encontrarse en que la participación del número de carneros de cada raza en cada pool fue muy variable y especialmente en la raza Corriedale, donde la cantidad de eyaculados de los carneros disminuyó en la época no reproductiva, minimizando por ende su participación en la formación del pool.

Sintetizando, se puede sostener que, los cambios estacionales ocurridos en la viabilidad (CFDA/PI), en la actividad bioquímica de membrana (HOS) y en la funcionalidad de las mitocondrias (Rh 123/PI) se deben al efecto del proceso de congelación sobre la integridad de membrana, en relación a las estaciones, atribuible a las variaciones estacionales en la composición y el contenido de proteínas del plasma seminal del carnero, debido a los altos niveles observados durante la estación reproductiva comparados con la estación no reproductiva (Smith *et al.*, 1999). En la estación reproductiva aumenta la concentración de proteínas en el plasma seminal, esto ayudaría a recomponer los daños de membrana, provocados en el proceso de criopreservación. En referencia a la composición de estas proteínas, en la estación no reproductiva desaparecen las de 20 a 70 kDa de peso molecular. Es de suponer que, los cambios estacionales en los niveles de gonadotropinas (Xu *et al.*, 1991) y de los receptores en los testículos (Barenton y Pelletier, 1983), afectan la función endócrina gonadal y la secreción de las vesículas seminales y el epidídimo (Smith *et al.*, 1999).

5.4. Evaluación de semen congelado-descongelado por medio de CASA

Al principio de la década de los '90 existían pocos estudios sobre el análisis computarizado de la motilidad espermática en semen. Diversos trabajos publicados en esa época permitieron empezar a conocer el comportamiento del semen analizado por esta metodología en la especie equina publicados por Varmer *et al.* (1991); Jasko *et al.* (1992); Palmer y Magistrini, (1992), luego en la especie porcina publicado por Rath

et al. (1988), en el conejo (Williams; Mephee, 1992; Farrel *et al.*, 1993; Perez *et al.*, 1996), en bovinos (Farrel *et al.*, 1998), ovinos (Gil *et al.*, 2002). Sin embargo, en estos últimos años se ha incrementado el número de estudios donde se utiliza este análisis para evaluar las características cinéticas de los espermatozoides en las diferentes especies y de los mamíferos en general (Verstegen *et al.*, 2002). La mayoría de estas investigaciones han sido realizadas mediante software comerciales que poseen muchos descriptores de motilidad espermática. Existen pocas investigaciones realizadas en semen de mamíferos donde se haya utilizado el análisis estadístico multivariado como herramienta para seleccionar los parámetros de motilidad que expliquen adecuadamente la motilidad espermática (Abaigar *et al.*, 1999; Quintero-Moreno *et al.*, 2004).

En este ensayo se utilizaron 11 variables para describir los índices de velocidad, angularidad y los parámetros de oscilación de la cabeza del espermatozoide. Sin embargo, es muy difícil determinar la metodología estadística más exacta que estandarice en forma óptima las distintas trayectorias trazadas por un espermatozoide, ya que, a excepción de algunas variables de movimiento de la cabeza del espermatozoide, casi todos los parámetros presentan entre ellos correlaciones medias o altas. Esto ocurre debido a que estos parámetros son productos, cocientes y/o relaciones porcentuales derivadas de las relaciones entre ellos.

El efecto de la estación, la raza y la interacción entre ambos factores se trató de cuantificar en los descriptores seleccionados. La interacción estación por raza fue significativa en 8 de las variables estudiadas, lo que complica fuertemente la interpretación de dichos resultados

Los resultados de motilidad total obtenidos por esta metodología son comparables a los de motilidad progresiva a la hora 0 obtenidos en la evaluación visual con microscopía de luz, aunque de una magnitud menor en todos los casos. Si consideramos que al determinar la motilidad progresiva visualmente se ignoran los ESPZ mótils en el lugar (sin progresión), la magnitud de la diferencia debería ser mayor. Por otro lado la influencia estacional favorable de la época reproductiva con mejores valores en el registro visual, aquí no se observa y por el contrario contrasta con aquella. Es probable que el observador sobrestime la valoración de la motilidad progresiva y minimice las diferencias registradas, siendo estas últimas de menor cuantía que las obtenidas por el CASA. Al comparar con información de otros investigadores, observamos que los valores de la motilidad total pos/descongelación son superiores, entre el 50 y 60 % en carneros de raza Garole (Joshi *et al.*, 2005) y

cercana al 60 % en carneros de raza Malpura y Bharat Merino en la India (Bag *et al.*, 2002).

En las variables que miden la velocidad del movimiento como ser VAP, VSL y VCL la interacción raza por estación fue significativa. Los valores obtenidos en la raza Pampinta fueron más altos en la estación reproductiva (verano – otoño), mientras que en la raza Corriedale, los valores más altos se determinaron en la estación “no reproductiva” (invierno -primavera). Mientras que la ALH se diferenció únicamente en la raza Pampinta en primavera obteniendo el menor valor.

En los descriptores que miden relaciones, como ser el porcentaje de linealidad (LIN), en la raza Corriedale fue alta en otoño e invierno, mientras que en Pampinta lo fue en primavera. En cambio en el porcentaje de rectilinearidad (STR) sólo se destacó la raza Corriedale en la estación de verano por su valor bajo.

La motilidad progresiva tuvo un comportamiento similar, el mismo comportamiento se obtuvo con la MP

La carencia de trabajos publicados sobre la evaluación del semen congelado/descongelado de ovinos determinado “mediante la metodología CASA, donde el factor estación esté presente”, impide la comparación de resultados y disminuye las posibles explicaciones de los resultados obtenidos. Del conjunto de variables estudiadas, se rescatan las que pueden otorgarle algún valor biológico, por estar correlacionadas con la fertilidad, la motilidad total, la motilidad progresiva en humanos (Mortimer, 2000) y la linealidad en toros (Rodriguez Martinez, 2000).

Muchos trabajos realizados en otras especies están poniendo énfasis en el rol de las subpoblaciones espermáticas (Abaigar *et al.*, 1999; Thurston *et al.*, 2001) y utilizan el CASA para caracterizarlas, actualmente se están proponiendo nuevas formas de análisis de los datos proporcionados por el CASA, como ser, análisis multivariados y de cluster que escapan al objetivo de este trabajo.

La motilidad espermática está directamente relacionada con la funcionalidad del espermatozoide. En estos trabajos se observaron grandes variaciones en algunos parámetros de motilidad individual dentro de cada subpoblación, lo cual indica la existencia de diferencias individuales en función del movimiento espermático (Palmer; Magistrini, 1992; Varmer *et al.*, 1991; Jasko *et al.*, 1992). El movimiento espermático estaría estrechamente relacionado con las pruebas de calidad seminal, especialmente con aquellas relacionadas con la funcionalidad espermática.

Gadea *et al.* (1998) observaron que la fertilidad seminal fue de un 27% y propone un modelo estadístico donde seleccionan el porcentaje de penetración espermática y

la motilidad como los parámetros más adecuados para relacionarlos con la fertilidad. Sin embargo, no se encontró ningún modelo que relacione la motilidad y la fertilidad *in vivo* (Holt, 1996), si bien se ha observado carencia de relación entre los descriptores de motilidad medidos por medio del CASA y la fertilidad (Rath *et al.*, 1988; Berger *et al.*, 1996). Otros investigadores postulan que, el estudio de la relación entre el análisis seminal y fertilidad "*in vivo*" es muy importante, debiendo destacarse que las anomalías morfológicas, no ha sido una variable importante en el análisis de los factores que puedan afectar la fertilidad. Se ha descrito que en el semen refrigerado durante 4 días, las gotas citoplasmáticas disminuyen los índices de fertilidad y prolificidad, pero la motilidad total no es afectada, oscilando entre 83,5 y 89,9 % (Waberski *et al.*, 1994).

5.5. Consideraciones finales generales del todo el trabajo

1. Para evidenciar la extensión de la temporada reproductiva de la raza Pampinta se sugiere modificar el diseño experimental, ampliando el muestreo y evaluación de semen a todas las semanas del año.
2. Se sugiere que para evaluaciones posteriores se congele en forma individual a cada carnero.
3. Finalmente, se sugiere seguir investigando el comportamiento estacional y la calidad seminal de la raza Pampinta, ampliando la base de origen de los reproductores.

6. CONCLUSIONES

1. En la latitud estudiada, la raza Pampinta presenta los mejores registros en circunferencia escrotal y en algunos parámetros seminales (Concentración espermática y número total de ESPZ) previo a la congelación, en el verano y el otoño.
2. En ambas razas, el primer eyaculado presenta mayor volumen, concentración espermática y número total de ESPZ. En cambio, en el segundo eyaculado se observan mayores valores de motilidad masal y porcentaje de espermatozoides vivos. El orden de eyaculación no afecta la motilidad progresiva, el vigor y el porcentaje de espermatozoides normales.
3. La mayor concentración plasmática de testosterona se registra en verano, seguido del otoño y valores basales en invierno y primavera.
4. La estación reproductiva es similar para ambas razas.
5. El resultado de la evaluación posdecongelación difiere según la técnica utilizada y la raza. Así, empleando técnicas visuales los mejores valores en los parámetros posdecongelación de ambas razas se obtienen en verano y otoño. En cambio empleando la técnica CASA, se registran en verano y otoño (raza Papinta) e invierno y primavera (raza Corriedale). No obstante la congelación de semen en pool por raza, pudo afectar el resultado estacional de la evaluación del semen posdecongelado, debido a las diferencias de participación de individuos de cada raza en la integración del pool.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ABAIGAR, T.; HOLT, W.; HARRISON, R.; DEL BARRIO, G. 1999. Sperm subpopulation in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol. Reprod.* 60:32-41.
- ABAIGAR, T.; CANO, M.; PICKARD, A.R.; HOLT, W.V. 2001. Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorr*): effects of body weight, electroejaculation technique and short-term semen storage. *Reproduction.* 122: 265-273.
- AGUIRRE FLORES, V.; VÁSQUEZ ROSALES, R.; ORIHUELA TRUJILLO, A. 2005. Entrenamiento de carneros para recolección de semen mediante vagina artificial, utilizando como estímulo objetos inanimados. *Vet. Méx.* 36(1):105-111
- AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology.* 57: 1801-1808.
- AISEN, E.; QUINTANA, M.; MEDINA, V.; MORELLO, H.; VENTURINO, A. 2005. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology.* 50(3): 239-249.
- AL-RUBEAI, M.; EMERY, A.N.; CHALDER, S.; GOLDMAN, M.H. 1993. A flow cytometric study of hydrodynamic damage to mammalian cells. *J. Biotechnol.* 31:161-177.
- AMIR, D.; GACITUA, H.; RON, M.; LEHRER, A.R. 1986. Seasonal variation in semen characteristics and the fertility of Finn cross rams subjected to frequent ejaculation. *Anim. Reprod. Sci.* 10: 75-84.
- ANEL, L.; DE PAZ, P.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C.A.; BOIXO, J.C.; MANSO, A.; GONZALEZ, M.; KAABI, M.; ANEL, E. 2003. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology.* 60(7): 1293-308.
- ASHWORTH, P.J.C.; HARRISON, R.A.P.; MILLER, N.G.A.; PLUMMER, J.M.; WATSON, P.F. 1994. Survival of ram spermatozoa at high-dilution: Protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod. Fertil. Dev.* 6:173-180.
- AVDI, M.; BANOS, G.; STEFOS, K.; CHEMINEAU, P. 2004. Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Serres rams. *Theriogenology.* 62:275-282.
- AZERÊDO, G.A.; ESPER, C.R.; RESENDE, K.T. 2001. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Rumin. Res.* 41:257-263.

- BACCETTI, B. 1979. The evolution of the acrosomal complex In Fawcett DW and Bedford JM (eds), *The Spermatozoon*. Urban and Schwarzenberg, Baltimore, USA. pp. 305-329.
- BAG, S.; JOSHI, A.; RAWAT, P.S.; MITTAL, J.P. 2002. Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in a semi-arid tropical environment. *Small Rumin. Res.* 43(1):23-29.
- BAMBA, K. 1988. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology*. 29:1245-1251.
- BARENTON, B.; PELLETIER, J. 1983. Seasonal changes in testicular gonadotropin receptors and steroid content in the ram. *Endocrinology*. 112:1441-1446.
- BEDFORD, JM. 1983. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization. *Biol. Reprod.* 28:108-120.
- BEDFORD J.M.; CROSS, N.L. 1978. Normal penetration of rabbit spermatozoa through a trypsin and acrosin-resistant zone pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 54:385-392.
- BERGER, T.; ANDERSON, D.L.; PENEDO, M.C.T. 1996. Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. *Anim. Reprod. Sci.* 44:231-239.
- BJÖRNDAHL, L. 1986. On serum nuclear zinc and chromatin decondensation. Thesis. Kongl. Carolinska Medico Chirurgicaliska Institutet Stockholm. pp.1-32.
- BLACH, E.L.; AMANN, R.P.; BOWEN, R.A.; SAWYER, H.R.; HERMENET, M.J. 1988. Use of monoclonal antibody to evaluate integrity of the plasma membrane of stallion sperm. *Gamete Res.* 21:233-241.
- BLESBOIS, E.; HEMIER, D. 1990. Effects of high-density lipoproteins on storage at 4°C of flow spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 90:473-482.
- BLOCKEY, M.A.; WILKINS, J. 1984. Field application of the ram serving capacity. In: Lindsay, D., Pearce, D.T. (eds.), *Reproduction in sheep*. Aust. Acad. Sci. Canberra, Australia. 403 p.
- BLOM, E. 1976. Zinc as a possible causal factor in the sterilizing sperm defect in Jersey bulls *Nord Vet. Med.* 28:515-518.
- BOLAND, M.P.; ALKAMALI, A.A.; CROSBY, T.F.; HAYNES, N.B.; HOWLES, C.M. 1985. The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentration in rams. *Anim. Reprod. Sci.* 9:241-252.
- BORETTO, J.M.; GIBBONS, A.E.; BUNGE, M.M.; CUETO, M.I.; BIDINOST, F. 2002. Calidad seminal post-descongelamiento en relación con la eficiencia reproductiva de la inseminación artificial laparoscópica en ovinos. *Rev. Med. Vet.* 83:185-188
- BOURSNELL, J.C.; BRIGGS, P.A.; COLE, D.M. 1968. Boar vesicular secretion protein: further comparison with seminal plasma protein. *J. Reprod. Fert.* 16:457-461.

- BOYERS, S.P.; DAVIS, R.; KATZ, D.F. 1989. Automated semen analysis. *Curr. Probl. Obstet. Gynecol. Fertil.* 12:172-200.
- BRADEN, A.W.H.; TURNBULL, K.E.; MATTNER, P.E.; MOULE, G.R. 1974. Effect of protein and energy content of the diet on the rate of sperm production in rams. *Aust. J. Biol. Sci.* 27(1):67-73
- BREMMER, W.J.; CUMMING, I.A.; WINFIELD, C.; DE KRETZER, D.M.; GALLOWAY, D. 1984. A study of the reproductive performance of mature Romney and Merino rams throughout the year. In: Linsay, D.R., Pearce, D.T. (eds.), *Reproduction in Sheep*. Cambridge University Press, Cambridge, pp.16–19
- BROWN, C.; HARRISON, R. 1978. The activation of proacrosin in spermatozoa from ram, bull and boar. *Biochymica et Biophysica acta.* 526:202-217.
- BYRNE, G.P.P.; LONERGAN, P.; WADE, M.; DUFFY, P.; DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; BOLAND, M.P. 2000. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 62(4):265-75.
- CAIZA DE LA CUEVA, F.I.; PUJOL, M.R.; RIGAU, T.; BONET, S.; MIRÓ, J.; BRIZ, M.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. 1997a. Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: the role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success. *Theriogenology.* 48:947-968.
- CAIZA DE LA CUEVA, F.I.; RIGAU, T.; BONET, S.; MIRO, J.; BRIZ, M.; RODRÍGUEZ, J. 1997b. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effects of ouabain. *Theriogenology.* 47:765-784.
- CALVO, C. 1983. *Ovinos*. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. 503 p.
- CASEY, P.J.; HILMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R.; YUDIN, A.I.; LIU, I.K.M.; DROBINS, E.Z. 1993. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *J. Androl.* 14:289-297.
- CHANG, M.C.; HUNTER, R.H.F. 1975. Capacitation of mammalian sperm: biological and experimental aspects. In: Hamilton DW, Greep RO (eds.), *Handbook of Physiology. Endocrinology V*. Washington: American Physiological Society. pp. 339-351.
- CHECK, J.H.; EPSTEIN, R.; NOWROOZI, K.; SHANIS, B.S.; WU, C.H.; BOLLENDORF, A. 1989. The HOS test as a useful adjunct to the semen analysis to predict fertility potential. *Fertil. Steril.* 52(1):159-161.
- CHEM, L.B. 1988. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 4:155-181.
- CHEMINEAU, P.; PELLETIER, J.; GUÉRIN, Y.; COLAS, G.; RAVAUULT, J.P.; TOURÉ, G.; ALMEIDA, G.; THIMONIER, J.; ORTAVANT, R.; DAVEAU, A.; MAURICE, F.; MOULIN, O.; CHESNEAU, D.; MIRMAN, B. 1988. Photoperiodic and melatonin treatments for the control of seasonal reproduction in sheep and goats. *Reprod. Nutr. Dev.* 28:409-22.

- CIERESZKO, A.; JABLONOWSKA, C.; STRZEZEK, J. 1990. Aspartate aminotransferase activity in motile and immotile spermatozoa fractions of frozen-thawed semen. *Anim. Reprod. Sci.* 23:237-244.
- CIERESZKO, A.; STRZEZEK, J. 1989. Isolation and characteristics of aspartate aminotransferase from boar spermatozoa. *Int. J. Biochem.* 21(12):1343-1351.
- COLAS, G. 1975. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J. Reprod. Fert.* 42(2):277-285.
- COLAS, G. 1980. Variations saisonniers de la qualite du sperma chez le belier Ile-de-France. *Reprod. Nutr. Dev.* 20:1789-1799
- COLAS, G.; GUERIN, Y.; LEMAIRE, Y.; MONTASSIER, Y.; DES-PIERRES, J. 1986. Seasonal variation in the testis diameter and sperm morphology in the Vendean ram and Texel ram. *Reprod. Nutr. Dev.* 26:863-875.
- COLAS, G.; LEFEBVRE, J.; GUERIN, J. 1990. Father-male offspring transmission of seasonal variations in testis diameter and percentage of abnormal sperm in the Ile-de-France rams: male offspring born in February. *Reprod. Nutr. Dev.* 30:589-603.
- CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. 1994. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology.* 42:351-360.
- CORREA, J.R.; HEERSCHKE, G.; ZAVOS, P.M. 1997. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. *Theriogenology.* 47:715-721.
- CRITSER, J.K.; HUSE-BENDA, A.R.; AAKER, D.V.; ARNESON, B.W.; BALL, G.D. 1988. Cryopreservation of human spermatozoa. The effect of holding procedure and seeding on motility, fertilizability and acrosome reaction. *Fertil. Steril.* 50:314-320.
- CROSS, N.L.; MEIZEL, S. 1989. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol. Reprod.* 41:653-641.
- DARIN-BENNETT, A. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold shock. *Cryobiology.* 14:466-470.
- DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. 1975. Cholesterol and phospholipids content of mammalian spermatozoa and its relation to membrane structure and cold-shock. *J. Reprod. Fert.* 43(2):383-384.
- DAVIES, D.C.; HALL, G.; HIBBIT, H.K.; MOORE, H.D.M. 1975. The removal of the seminal vesicles from the boar and the effects on the semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 43:305-312.
- DAVIS, R.O.; SIEMERS, R.J. 1995. Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reprod. Fert. Dev.* 7:857-869.

- D'ALESSANDRO, A.G.; MARTEMUCCI, A.G. 2001. Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology*. 55:1159-1170.
- D'ALESSANDRO, A.G.; MARTEMUCCI, G. 2003. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Anim. Reprod. Sci.* 79:93-102.
- DE ALBA, C. 1995. Variaciones de la composición fosfolipídica de la membrana espermática del verraco durante el equilibrio del semen en procesos de conservación. Tesis doctoral. Universidad Complutense, Madrid, España. 157 p.
- DE ALBA, C.; CORCUERA, B.; GARCÍA-ARTIGA, C.; STRZEZEK, J. 1997. Determinación de parámetros bioquímicos relacionados con la calidad seminal. En: 4º Simposio Internacional de Reproducción e IA porcina. Madrid, España, Mayo 1997. pp. 91-101.
- DE ALBA, C.; MARIGORTA, P.; SAIZ, F.; STRZEZEK, J.; LYCZYNSKI, A.; MARTIN-RILLO, S. 1996. Aspartate aminotransferase activity changes during boar semen preservation at 15°C. *J. Physiol. Pharmacol.* 47(2)Suppl 1:141
- DEIBEL, F.C.; SMITH, J.E.; CRABO, B.G.; GRAHAM, E.F. 1976. Evaluation of six assays of sperm quality by means of their accuracy, precision and sensitivity in separating known induced levels of damage. *Proc. 8th Int Congr Ani Reprod AI, Krakow, Poland, July 12-16.* 4:888-891.
- DOTT, H.M.; FOSTER, G.C. 1979. The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. *J. Reprod. Fertil.* 55:161-166.
- DREVIUS, L.O.; ERIKSSON, H. 1966. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp. Cell. Res.* 42:136-156.
- DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T.J.; OVERSTREET, J.W.; CROWE, J.H. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model. *J. Exp. Zool.* 265(4):432-437.
- DUBIEL, A.; STANZYK, J.F.; BARCIKOWSKI, B.; RNOWICS, K.; HOLSZKA, M. 1987. Testosterone concentrations in the plasma of boars of different ages. *Medycina Weterynaryjna.* 43(11):687-691.
- EL-ALAMY, M.A.; FOOTE, R.H.; HARE, E. 2001. Sperm output and hormone concentrations in finn and dorset rams exposed to long- and short-day lighting. *Theriogenology*. 56:839-854.
- ESTEVEZ, S.C.; SHARMA, R.K.; THOMAS, A.J.J.R.; AGARWAL, A. 2000. Effect of swim-up sperm washing and subsequent capacitation on acrosome status and functional membrane integrity of normal sperm. *Int. J. Fertil. Womens Med.* 45(5):335-341.
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. *Acribia*. Zaragoza, España. 192 p.

- EVENSON, D.P.; THOMPSON, L. 1990. Flow cytometric analysis of boar sperm chromatin structure as related to cryopreservation and fertility. *Reprod. Dom. Anim. Suppl* 1:165-183.
- EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICS, Z.; MELAMED, M.R. 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membranes potential related to cell motility. *J. Histochem. Cytochem.* 30:279-280.
- FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. 1992. Assesment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 32:223-277.
- FARRELL, P.B.; FOOTE, R.H.; SIMKIN, M.E.; CLEGG, E.D.; WALL, R.J. 1993. Relationship of semen quality, number of sperm inseminated, and fertility in rabbits. *J. Androl.* 14:464-471.
- FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C.; FOOTE, R.H. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology.* 41:871-879
- FERNÁNDEZ ABELLA, D.; ABELLA, O.; RODRÍGUEZ PALMA, R.; ZANOTTA, G. 1993. Evaluación de las variaciones estacionales en la producción espermática de cuatro razas. *Boletín Técnico de Ciencias Biológicas.* 3:23-34.
- FERNÁNDEZ ABELLA, D. 2001. Principios de fisiología reproductiva ovina. Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay. 247 p.
- FERNÁNDEZ ABELLA, D.; BONILLA RIERA, C.; BONILLA RIERA, R.; VILLEGAS, N.; IBAÑEZ, W. 2001. Efecto de la refrigeración del semen de carnero a 4-5°C sobre el transporte espermático. *Rev. Prod. Ovina (SUL).* 14:55-63.
- FISCHMAN, M.L.; CAMPI, S.; GONZÁLEZ, L.; BLASI, C.; GHIRARDI, M.P.; VEKSLER J.; CISALE, H. 2007. Valoración de la calidad seminal en semen ovino congelado de entre 9 y 15 años de antigüedad 5º Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina. 2-4 Mayo 2007. En CD.
- FISER, P.S.; AINSWORTH, L.; FAIRFULL, R.W. 1987. Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology.* 28(5):599-607.
- FOOTE, R.H.; BREDDERMAN, P.J. 1969. Sizing of aging bull spermatozoa with an electronic counter. *J. Dairy. Sci.* 52:117-120.
- FORT, M.C.; SUÁREZ, V.H.; BEDOTTI, D.O. 1992. Variación estacional de la actividad ovárica de dos razas ovinas en la región semiárida pampeana. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 12:185-191.
- FRIM, J.; MAZUR, P. 1983. Interactions of cooling rate, glycerol concentration, and dilution procedure on the viability of frozen-thawed human granulocytes. *Cryobiology.* 20:657-676.

- GADEA, J.; MATÁS, C.; LUCAS, X. 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Anim. Reprod. Sci.* 56:95-108.
- GAGNON, C. 1995. Regulation of sperm motility at the axonemal level. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:847-855
- GAO, D.Y.; MAZUR, P.; KLEINHANS, F.W.; WATSON, P.F.; NOILES, E.E.; CRITSER, J.K. 1992. Glycerol permeability of human spermatozoa and its activation energy. *Cryobiology.* 29:657-667.
- GARCÍA ARTIGA, C. 1994. Test de endósmosis en ovino. En: 7º Jornadas Internacionales de Reproducción Animal. Spaingraf. S.L., Murcia, España. pp. 77-81.
- GARCÍA-ARTIGA, C.; FONTANILLAS, J.C.; PÉREZ, J.; GARCÍA-CUENCA, I.; MARTÍN-RILLO, S.; PÉREZ-GARCÍA, T. 1994. Técnicas de Tinción Espermiática. *Porci.* 21:11-18.
- GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W.; MEL DEJARNETTE, J.; MARSHALL, C.E. 1997. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reproduction.* 57:1401-1406
- GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; ALLEN, C.H. 2007. Effect of semen dilution on bovine sperm viability as determined by dual-DNA staining and flow cytometry. *J. Androl.* 18:324-331
- GASTEL, T.; BIELLI, A. PEREZ, R.; LOPEZ, A.; CASTRILLEJO, A.; TAGLE, R.; FRANCO, J.; LABORDE, D.; FORSBERG, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ. H. 1995. Seasonal variations in testicular morphology in Uruguayan Corriedale rams. *Anim. Reprod. Sci.* 40(1-2):59-75.
- GIL, J.; JANUSKAUKAS, A.; HÅÅRD, M.C.H.; HÅÅRD, M.G.M.; JOHANISSON, A.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H. 2000. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-plus ® and Triladyl ®. *Reprod. Dom. Anim.* 35:69-77.
- GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, C. M.; SÖDERQUIST, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2002. Influence of centrifugation or low extension rates on the fertility of ram semen after cervical insemination. *Theriogenology.* 57:1781-1792
- GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology.* 59(5-6):1241-1255.
- GLOVER, T.D., D'OCCHIO, M.J., MILLAR, R.P. 1990. Male life cycle and seasonality. In: Lamming, G.E. (eds.), *Marshall's Physiology of Reproduction*, vol II, *Reproduction in the male*, 4º ed. Churchill Livingstone, London, England. pp. 213-378.
- GONZÁLEZ-URDIALES, R. 2002. Contrastación seminal. *Cunicultura.* 160:394-399.

- GRASA, P.; PEREZ-PE, R.; BAGUENA, O.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; CEBRIAN-PEREZ, J.A.; MUINO-BLANCO, T. 2004. Ram sperm selection by a dextran/swim-up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes. *J. Androl.* 25:982-990
- GÜNDOĞAN, M. 2007. Seasonal variation in serum testosterone, T3 and andrological parameters of two Turkish sheep breeds. *Small Rumin. Res.* 67(2-3):312-316
- HAFEZ, E.S.E. 1993. Reproducción e inseminación artificial en animales. 5º ed. Interamericana McGraw-Hill, México. 694 p.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. 2000. Reproduction in farm animals. 7º ed. Baltimore, USA. 509 p.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7º ed. McGraw-Hill Interamericana, México. 519 p.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 11: 73-88.
- HARDELAND, R. 2008. Melatonin, Hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell. Mol. Life. Sci.* 65:2001-2018.
- HARKEMA, W.; BOYLE, M.S. 1992. Use of fluorescent stain to assess membrane integrity of equine spermatozoa. *Proc 12th Int Congr Anim Reprod AI, The Hague, Netherlands, 1992, August, 23-27.* 2:1424-1426.
- HARRISON, R.A.; VICKERS, S.E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 88:343-352
- HELLEMANN, C. Y JARA, C. 1997. Efecto de un surfactante sobre la integridad de espermatozoides ovinos crioconservados. *Arch. Med. Vet.* 29(1):153-160.
- HOLMES, R.J. 1986. Sexual behavior of sheep. In: Morrow, D.A. (eds.) *Current therapy in theriogenology*, Saunders, Philadelphia, PA, USA. pp. 870-873.
- HOLT, W.V. 1996. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reprod. Dom. Anim.* 31:17-24.
- HOLT, W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:3-22.
- HOLT, W.V.; NORTH, R.D. 1984. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *J. Exp. Zool.* 230:473-483.
- HUANG-YANG, Y.H.J.; MEIZEL, S. 1975. Purification of rabbit testis proacrosina and studies of its active form. *Biol. Reprod.* 12:232-238.
- IBARRA, D.; LABORDE, D.; OLIVERA, J.; VAN LIER, M.V.; BARGUEÑOS, J. 1999. Comparación de tres pruebas para medir la capacidad de servicio en carneros adultos. *Arch. Med. Vet.* 31(2):189-196.

- IBRAHIM, S.A. 1997. Seasonal variations in semen quality of local and crossbred rams raised in the United Arab Emirates. *Anim. Reprod. Sci.* 49:161-167.
- INDEC. Instituto Nacional de Estadística y Censos. 2004. [en línea] Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA) 1993-2001 y Censo Nacional Agropecuario 2002. <<http://www.indec.gov.ar/>> [consulta: 15 de Diciembre de 2004]
- INTA. 2006. Datos meteorológicos de la UIB Balcarce del año 2005-2006. [en línea] <<http://www.inta.gov.ar/balcarce/>> [consulta: 18 de Julio de 2007]
- JASKO, D.J.; LITTLE, T.V.; LEIN, D.H.; FOOTE, R.H. 1992. Comparison of spermatozoa movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). *JAVMA.* 200:979-985.
- JEFFERIES, B. C. 1961. Body composition scoring and its use in management. *Tasmanian Journal of Agriculture.* 32:19-21.
- JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PÉREZ-PELÁEZ, M.; CRABO, B.J.; ZANEVELD, L.J.D. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70:219-228.
- JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; ZANEVELD, L.J. 1992. The hypoosmotic swelling test: an update. *Arch. Androl.* 39:1279-1289.
- JOSHI, A.; BAG, S.; NAQVI, S.M.K.; SHARMA, R.C.; MITTAL, J.P. 2005. Effect of post-thawing incubation on sperm motility and acrosomal integrity of cryopreserved Garole ram semen. *Small Rumin. Res.* 56(1-3):231-238.
- KAFI, M.; SAFDARIAN, M.; HASHEMI, M. 2004. Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams. *Small Rumin. Res.* 53:133-139.
- KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; ALEXOPOULOS, C.; AMARANTIDIS, I. 2000. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Rumin. Res.* 37:125-130.
- KATZ, D.F.; OVERSTREET, J.W. 1980. Mammalian sperm movement in vitro secretions of the male and female genital tracts. In: *Testicular development, structure and function.* (eds.): A. Steinberger y E. Steinberger. Raven Press: New York: pp. 481-489.
- KATZ, L.S.; PRICE, E.O.; WALLACH, S.J.R.; ZENCHACK, J.J. 1998. Sexual performance of rams reared with or without females after weaning. *J. Anim. Sci.* 66:1166-1173.
- KILGOUR, J. 1985. Mating behaviour of rams in pens. *Aust. J. Exp. Agric.* 25:298-305.
- KOEHLER, J.K.; CLARK, J. M.; SMITH, D. 1985. Freeze-fracture observations on mammalian oocytes. *Am. J. Anat.* 174: 317-329.

- KRAUSE, W. 1995. The significance of computer-assisted semen analysis (CASA) for diagnosis in andrology and fertility prognosis. *Hum. Reprod.* 10: 60-66.
- KUMI-DIAKA, J. 1993. Subjecting the canine spermatozoa to the hypoosmotic swelling test. *Theriogenology*. 39:1279-1289.
- KUMI-DIAKA, J.; BADTRAM, G. 1994. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. *Theriogenology*. 41:1355-1366.
- LABORDE, D.; QUEIROLO, D.; PÉREZ, R.; LÓPEZ, A.; FRANCO, J. 1991. Comparison of three tests of serving capacity in rams. 28^o Technical meeting of Veterinary Faculty. November, 14-16, Montevideo, Uruguay. pp 57.
- LANGFORD, G.A.; SHRESTHA, J.N.B.; SANFORD, L.M.; MARCUS, G.J. 1989. Repeatability of scrotal size and semen quality measurements in rams in a short-day light regime. *Anim. Reprod. Sci.* 19:19-27.
- LINCOLN, G.A.; DAVIDSON, W. 1977. The relationship between sexual and aggressive behaviour, and pituitary and testicular activity during the seasonal sexual cycle of rams, and the influence of photoperiod. *J. Reprod. Fertil.* 49:267-276.
- LINCOLN, G.A.; LINCOLN, C.E.; MCNEILLY, A.S. 1990: Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. *J. Reprod. Fert.* 88:623-633.
- LINDSAY, D.R. 1976. Mating behaviour in sheep. In *sheep Breeding*. Eds. Butterworths, London, UK. pp. 473-479
- LINDSAY, D.R.; GHERARDI, P.B.; OLDHAM, C.M. 1976. The effect of feeding a high protein supplement before joining on testicular volume of rams. *Sheep Breeding: Proceedings International Congress, Muresk. Perth, West. Australian Institute of Technology*. pp. 294-298
- LUBERDA, A.; STRZEZEK, J. 1988. Effect of zinc on boar seminal plasma over DNSA and phosphatase activity. *Medycyna Weterynaryjna*. 5(44):298-301.
- MAGISTRINI, M.; GUITTON, E.; LEVERN, Y.; NICOLLE, J.C.L.; VIDAMENT, M.; KERBOEUF, D.; PALMER, E. 1997. New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. *Theriogenology*. 48:1229-1235.
- MAHI, C.A.; YANAGIMACHI, R. 1973. The effects of temperature, osmolarity and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 35:55-66.
- MANDIKI, S.N.M.; DERYCKE, G.; BISTER, J.L.; PAQUAY, R. 1998a. Influence of season and age on sexual maturation parameters of Texel, Suffolk and Ile-de-France rams: 1. Testicular size, semen quality and reproductive capacity. *Small Rumin. Res.* 28(1):67-79.

- MANDIKI, S.N.M.; DERYCKE, G.; BISTER, J.L.; PAQUAY, R. 1998b. Influence of season and age on sexual maturation parameters in Texel, Suffolk and Ile-de-France rams: 2. Circulating concentrations of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactine and testosterone. *Small Rumin. Res.* 28(1):81-88.
- MARIGORTA, P.; SAIZ, F.; DE ALBA, C.; CORCUERA, D.; SAGGES, A.; MARTIN-RILLO, S. 1997. Acrosine and aspartate aminotransferase activities in boar semen during the freezing process as indicative of the cell status. *Stocarstvo.* 51(2):113-120.
- MARTÍ, J.I.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. 2003. Parámetros de calidad y capacidad fecundante de dosis espermáticas seleccionadas mediante distintos procesos de swim-up. 10º Jornadas sobre Producción Animal. ITEA. 24(1):309-311.
- MAXWELL, W.M.C. 1986. Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at synchronized oestrus. 1. Effect of time of onset of oestrus, ovulation and insemination on fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 10:301-308
- MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. 2000. Recent developments in artificial insemination in sheep and goats with semen stored in chilled liquid or frozen state. 14th International Congress on Animal Reproduction. Stockholm 2, Sweden. In CD.
- MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. 1997. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology.* 48:209-219.
- MAXWELL, W.M.C; SALAMON, S. 1993. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5:613-638.
- MAXWELL, W.M.C; WATSON, P.F. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 42:55-65.
- MAZUR, P. 1984. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247:125-142.
- MC DERMOTT, C.; FRASER, L.R. 1992. Ca²⁺-related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca²⁺-ATPase. *J. Reprod. Fertil.* 96:363-377
- MCGANN, L.E.; YANG, H.Y.; WALTERSON, M. 1988. Manifestations of cell damage after freezing and thawing. *Cryobiology.* 25(3):178-185.
- MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology.* 57:327-344.
- MEQUE, L.C.C. 2004. Diseño de un diluyente de refrigeración seminal en la especie ovino. Tesis de Doctorado. Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria. España. 145 p.
- MEYERS, S.A.; OVERSTREET, J.A.; LIU, I.K.M.; DROBNIS, E.Z. 1995. Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reaction in fertile and subfertile males. *J. Androl.* 16:47-54.

- MICKELSEN, W. D.; PAISLEY, L. G.; DAHMEN, J. 1982. The relationship of libido and serving capacity test scores in rams on conception rates and lambing percentage in the ewe. *Theriogenology*. 18(1):79-86.
- MOORE, H.D.M.; HALL, G.A.; HIBBITT, K.G. 1976. Seminal plasma protein and the reaction of spermatozoa from intact boars and from boars without seminal vesicles to cooling. *J. Reprod. Fertil.* 47:39-45.
- MOORE, H.D.M.; HIBBITT, K.G. 1977. Fertility of boar spermatozoa after freezing in the absence of seminal vesicles protein. *J Reprod Fétil.* 50:349-352.
- MORTIMER, S. 2000. CASA - Practical aspects. *J. Androl.* 21:515-524.
- MORTIMER, S.T. 2002. Practical application of computer-aided sperm analysis (CASA). In: 9th International Symposium on Spermatology. October 6-11, Cape Town/South Africa. p.79.
- MÜLLER, K.; POMORSKI, T.; MÜLLER, P.; HERRMANN, A. 1999. Stability of transbilayer phospholipids asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *J. Cell. Sci.* 112:11-20.
- NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E.K.; GADELLA, B.M. 2003. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol. Reprod.* 68:1828-1835.
- NEL-THEMAAT, L.; HARDING, G.D.; CHANDLER, J.E.; CHENEVERT, J.F.; DAMIANI, P.; FERNANDEZ, J.M.; HUMESA, P.E.; POPE, C.E.; GODKE, R.A. 2006. Quality and freezing qualities of first and second ejaculates collected from endangered Gulf Coast Native rams. *Anim. Reprod. Sci.* 95:251-261.
- NOAKES, D.E.; PARKINSON, T.J.; ENGLAND, G.C.W. 2001. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8^o ed. W Saunders; London, England. 868 p.
- OETTLÉ, E.E. 1986. Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. *Vet. Med.* 81:263-266.
- 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. *Aust. J. Agric. Res.* 29(1):173-179
- OLLERO, M.; PÉREZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PÉREZ, J.A. 1998. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Criobiology*. 37:1-12.
- O'RAND, M.G. 1979. Changes in sperm properties correlated with capacitation. In Fawcett DW and Bedford JM (eds), *The Spermatozoon*. Urban and Schwarzenberg, Baltimore, USA. 195-204
- ORTAVANT, R.; PELLETIER, J.; RAVAUULT, J.P.; THIMONIER, J.; VOLLAND-NAIL, P. 1985. Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm mammals. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 7:306-345.

- PALMER, E.; MAGISTRINI, M. 1992. Automated analysis of stallion semen post-thaw motility. *Acta Vet. Scand. (Suppl.)*. 88:137-152.
- PARKS, J.E. 1997. Hypothermia and mammalian gametes. In: Karow, A.M. and Critser, J.K., (eds.) *Reproductive Tissue Banking*. San Diego: Academic Press, pp. 229-261.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38:209-222.
- PAULENZ, H.; HOFMO, P.O. 1996. Routine assessment of sperm concentration at a boar AI station using a coulter counter. *Reprod. Dom. Ani.* 31(1):257-258.
- PAULENZ, H.; SODERQUIST, L.; ADNOY, T.; FOSSEN, O.H.; BERG, K.A. 2003. Effect of milk- and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. *Theriogenology*. 60(4):759-766.
- PELLETIER, J.; ALMEIDA, G. 1987. Short light cycles induce persistent reproductive activity in Ile-de-France rams. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 34:215-226.
- PEREZ, C.; LOPEZ, A.; CASTRILLEJO, A.; BIELLI, A.; LABORDE, D.; GASTEL, T.; TAGLE, R.; QUEIROLO, D.; FRANCO, J.; FORSBERG, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 1997. Reproductive seasonality of Corriedale rams under extensive rearing conditions. *Acta Vet. Scand.* 38:109-117.
- PEREZ, L.J.; VALCARCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; MOSES, D.; BALDASSARRE, H. 1996. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology*. 46:131-140.
- PÉREZ-LLANO, B.; GARCÍA-CASADO, P.; LORENZO, J.L.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, R. 1998a. Response to the boar sperm to the Host test and relationship between HOST and ORT results. 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-9/Julio, Abstr. 69.
- PÉREZ-LLANO, B.; SÁNCHEZ, R.; LORENZO, J.L.; GARCÍA-CASADO, P. 1998b. A short version of the osmotic resistance test for boar semen. 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-9/Julio, Abstr. 61.
- PÉREZ-LLANO, B.; GONZÁLEZ, J.L.; GARCÍA-CASADO, P. 1998c. Nueva técnica de ORT corta para su evaluación. *Albítar*. 21:6-7.
- PÉREZ-LLANO, B.; YENES-GARCÍA, P.; GARCÍA-CASADO, P. 2003. Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypoosmotic swelling test and acrosome status during incubation at 37°C. *Theriogenology*. 60:1401-1407
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164:666
- QUINN, P.J. 1989. Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21: 3-19.

- QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. 1980. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J. Reprod. Fert.* 60:403-407.
- QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; RIGAU, T.A.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology.* 59:1973-1990
- QUINTERO-MORENO, A.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis *Theriogenology.* 61:673-690
- RATH, D.; ARMBRECHT, S.; SCHAAP, P.; WEITZE, K.F.; 1988. Experience with a computerized videomicrographic system for sperm analyses. *Proceedings 11th International Congress of Animal Reproduction and A.I. 1988, June, 25-30, Dublin, Ireland.* 3:288.
- RENARD, P.; TRIMECHE, A.; LE PICHON, J.P.; QUERO, J.C.; GRIVEAU, J.F.; CHOUTEAU, P.; TAINURIER, D.; LE LANNOU, D. 1996. Sperm motility and flagellar motion: a comparison between boar and other mammalian species. *Reprod. Dom. Anim.* 31:249-250.
- RIGAU, T.; FARRÉ, M; BALLESTER, J.; MOGAS, T.; PEÑA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. 2001. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology.* 56:801-815.
- RODRÍGUEZ-GIL, J. E. 2000. Aspectos funcionales de espermatozoides de mamífero. *Jornadas sobre la fecundación en mamíferos: conceptos actuales.* Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria, Unidad de Reproducción Animal, pp. 1-6.
- RODRÍGUEZ-GIL JE; MONTSERRAT A; RIGAU T. 1994. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology.* 42:815-829.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H; LARSSON, B; PERTOFT, H. 1997. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod. Fertil. Dev.* 9:297-308.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H. 2000. Evaluación de semen congelado: Métodos Tradicionales y de Actualidad. [en línea] *Internacional Veterinary Information Service Ithaca, New York, USA.* <<http://www.ivis.org/>> [consulta: 15 de Diciembre de 2008]
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; WALLGREN, M.; SELLES, E.; TIENTHAI, P. 2001. Aspectos de función espermática en cerdos. 3º Congreso Ibérico de Reprodução Animal. Porto, 6-8/Portugal. *Livro de Resumos:* 51-60.
- ROGER, B.J.; PARKER, R.A. 1991. Relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test and sperm penetration assay. *J. Androl.* 12:152-158.

- ROLDAN, E.R.S.; CASSINELLO, J.; ABAIGAR, T.; GOMENDIO, M. 1998. Inbreeding, fluctuating asymmetry and ejaculate quality in a endangered ungulate. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 265: 243-248.
- RUSSEL, A.J.F.; DONEY, J.M.; GUNN, R.G. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agric. Sci. Camb.* 72:451-454.
- SAIZ-CIDONCHA F; DE ALBA C; MARIGORTA P; CORCUERA BD; MARTIN-RILLO S. 1994. Estudio de la calidad del semen de verraco a través de la evaluación de parámetros bioquímicos. *Porci.* 21:57-76.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 37(3-4):185-249.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62(1-3):77-111.
- SALAMON, S.; VISSER, D. 1972. Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Aust. J. Biol. Sci.* 25:605-618.
- SÁNCHEZ, A.; RUBILAR, J.; GATICA, M.V. 2002. Evaluation of fresh and frozen canine semen by the hypoosmotic swelling test. *Arch. Med. Vet.* 34 (1):123-130.
- SAS. 2001. Institute Inc. Release 8.02. SAS Inst. Inc. Cary, NC 27513, USA. Programa computacional.
- SCHANBACHER, B.D.; LUNSTRA, D.D. 1976. Seasonal changes in sexual activity and serum levels of LH and testosterone in Finnish Landrace and Suffolk rams. *J. Anim. Sci.* 43:644-650.
- SCHILLING, E.; VENGUST, M. 1985. Determination of osmotic resistance of boar spermatozoa and its relationship with the storage ability of semen samples. *Zuchthygiene.* 20:61-78.
- SCHILLING, E.; VENGUST, M.; SMIDT, D. 1984. ORT: Un nuevo sistema para predecir la congelabilidad y la capacidad de almacenamiento de los espermatozoides de verraco. *Proc 8th IPVS Congress, Belgica*, pp. 346 (abstr.)
- SCHILLING, E.; VENGUST, M.; BAJT, G.; TOMCIC, M. 1986. The osmotic resistance (ORT) of boar spermatozoa and the relation to pregnancy rate and litter size. *Proc 9th IPVS Congress, Barcelona, España.* pp. 77.
- SERRES C; FENEUX D; JOUANNET P; DAVID G. 1984. Influence of the flagellar wave development and propagation on the human sperm movement in seminal plasma. *Gam. Res.* 9:183-195
- SETCHELL, B.P.; WAITES, G.M.H.; LINDNER, H.R. 1965. Effect of undernutrition on testicular blood flow and metabolism and the output of testosterone in the ram. *J. Reprod. Fertil.* 9:149-162

- SERVICIO NACIONAL DE HIDROGRAFIA NAVAL. 2007. [en línea] Datos de horarios de salida y entrada del sol del año 2005-2006 a la ubicación de Balcarce. <<http://www.hidro.gov.ar/>> [consulta: 20 de Julio de 2007]
- SINGER, S.J.; NICHOLSON, G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175:720-731.
- SMIKLE, C.B.; TUREK, P.J. 1997. Hypo-osmotic swelling can accurately assess the viability of nonmotile sperm. *Molecular Reprod. Dev.* 47:200-203.
- SMIRNOV, I.V. 1949. Storage of semen of farm animals by deep-freezing (in Russian). *Sov. Zootech.* 4:63-65.
- SMITH, J.F.; MURRAY, G.R. 1997. Evaluation of different staining techniques for determination of membrane status in spermatozoa. *Proc. New Zeal. Soc. Anim. Prod.* 57:246-250.
- SMITH, J.F.; PARR, J.; MURRAY, G.R.; MCDONALD, R.M.; LEE, R.S-F. 1999. Seasonal changes in the protein content and composition of ram seminal plasma. *Proc. New Zeal. Soc. Anim. Prod.* 59:223-225.
- SÖDERQUIST, L.; MADRID-BURY, N.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. 1997. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology*. 48:1115-1125.
- STRZEŻEK, J. 1976. The protein of boar seminal plasma and its biochemical function. *Symposium of boar semen preservation*. Uppsala, Sweden. pp. 189.
- STRZEŻEK, J.; CIRESKO, A. 1987. Heterogeneity of aspartate aminotransferasa (AAT) in bull semen. *Comp Biochem Physiol.* 86B(2):373-375.
- STRZEŻEK, J.; SMIGIELSKA, J. 1978. Immunological characteristics of deoxyribonucleoproteins (DNP) insolated from fresh and stored boar spermatozoon. *Medycyna Wet.* 10:617-621.
- STRZEŻEK, J.; SWIDOWICZ, K. 1986. Cambios crió-bioquímicos del espermatozoide y su capacidad fertilizante. *Zuchthygiene*. 21:64-70.
- SUÁREZ, V. 2004. Lechería ovina y raza pampinta. *IDIA XXI Ovinos*. 7:194-200
- SUÁREZ, V.H.; BUSETTI, M.R.; ORTELLADO REAL, M.R.; BABINEC, F.J.; GARRIA, C.A.; SILVA COLOMER, J.; TALMON, G.D. 1998. Características productivas de la raza ovina Pampinta. *Therios*. 27:195-203.
- TALBOT, P.; CHACÓN, R.S.A. 1981. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions in human sperm. *J. Exp. Zool.* 215:201-208.
- TAMULI, M.K.; WATSON, P.F. 1992. Effects of temperature of incubation on the development of resistance to cold stress and hypoosmotic stress in boar spermatozoa incubated for up 24 hours. *Proc. 12th ICAR Congress*. The Hague, Netherlands, 1992, June 7-12. pp.1484-1486.

- THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. 1998. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 58:786-793.
- THURSTON, L.M.; WATSON, P.; MILEHAM, A.; HOLT, W. 2001. Morphologically distinct sperm subpopulation defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J. Androl.* 22(3):382-394.
- TULLEY, D.; BURFENING, P.J. 1983. Libido and scrotal circumference of rams as affected by season of the year and altered photoperiod. *Theriogenology.* 20:435-448.
- UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; OLIVER, J.E.; DUGANZICH, D.M.; MUNDAY, R.; SMITH, J.F. 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically - defined diluent containing antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.* 48:269-278.
- VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; PÉREZ, L.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. 1994. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology.* 41:483-489.
- VAN DER VEN, H.H.; JEYENDRAN, R.S.; AL-HASANI, S.; PÉREZ-PELÁEZ, M.; DIEDRICH, K.; ZANEVELD, L.J.D. 1986. Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (Hypoosmotic Swelling Test) and in vitro fertilization. *J. Androl.* 7:190-196.
- VAN DEN SAFFELE, J.; VERMEULEN, L.; SCHOOJANS, F.; COMHAIRE, F.H. 1992. Evaluation of the hypoosmotic swelling test in relation to advanced methods of semen analysis. *Andrologia.* 24:213-217.
- VARMER, D.; VAUGHAN, S.; JOHNSON, L. 1991. Use of computerised system for evaluation of equine spermatozoa motility. *Am. J. Vet. Res.* 52:224-230.
- VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.A.; ROCA, J.; COY, P.; RUIZ, S. 1992. Use of triple stain technique for simultaneous assessment of viability and acrosomal status in boar spermatozoa. *Theriogenology.* 38:843-852.
- VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.A.; PASTOR, L.M.; ROCA, J.; MATAS, C.; CALVO, A. 1996. Lectin histochemistry during in vitro capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa: new lectins for evaluating acrosomal status of boar spermatozoa. *Acta Histochem. (Jena).* 98:93-100.
- VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.A.; MARTÍNEZ, P.; GARCÍA-ARTIGA, C.; ROCA, J. 1997b. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. *Theriogenology.* 47:913-922.
- VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.A.; ROCA, J.; BLANCO, O.; LUCAS, X.; MATAS, C. 1997a. Utilización del analizador de imágenes para la evaluación de la motilidad de los espermatozoides de verraco. 4º Simposio Internacional de Reproducción e IA porcina. Madrid, España. Mayo 1997. 83-90 pp.

- VERHEYEN, G.; JORIS, H.; CRITS, K.; NAGY, Z.; TOUNARE, H.; VAN STEIRTEGHEM, A.. 1997. Comparison of different hypo-osmotic swelling solutions to select viable immotile spermatozoa for potential use in intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod. (Update)*. 3:195-203.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57:149-179.
- VON BUITEN, A.; ZHANG, J.; BOULE, M.S. 1989. Integrity of plasma membrane of stallion spermatozoa before and after freezing. *J. Reprod. Fertil.* 4:11-18.
- WABERSKI, D.; MEDING, S.; DIRKSEN, G.; WEITZE, K.F.; LEIDING, C.; HAHN, R. 1994. Fertility of long-term-stored boar semen: Influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36:145-151.
- WATSON, P.F. 1975. Use of Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet. Rec.* 97:12-15.
- WATSON, P.F. 1979. The preservation of semen in mammals. In: *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Finn, CA (ed.). Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 283-350.
- WATSON, P.F. 1981a. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: *The Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. Morris, G.J. and Clarke, A., eds. Academic Press: London, UK. pp. 189-218.
- WATSON, P.F. 1981b. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg-yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fertil.* 62:483-492.
- WATSON, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:871-891.
- WATSON, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:481-492.
- WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M. 1985. The responses of boar semen membrane to cold shock and cooling. In: *Deep freezing of boar semen*. L.A. Johnson and K. Larson (eds.), Swed. Univ of Agr Sci, Uppsala, Sweden, pp. 113-127.
- WELLS M.E.; AWA O.A. 1970. New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. *J. Dairy. Sci.* 53:227-232.
- WHITE, I.G.; DARIN-BENNETT, A. 1976. The lipids of sperm in relation to cold shock. *Proc 8^o Int Congr. Anim. Reprod. Art. Insem. (Krakow)*. 4:951-954.
- WILLIAMS, A.H.; MCPHEE, S.R.; Reeve, J.L.; Staples, L.D 1992. Optimum use of subcutaneous melatonin implants to enhance the reproductive performance of seasonal and non-seasonal sheep joined in spring and early summer. *Anim. Reprod. Sci.* 30:225-258.

- WINDSOR, D.P. 1997. Mitochondrial function and ram sperm fertility. *Reprod. Fertil. Dev.* 9:279-284.
- WINDSOR, D.P.; WHITE, I.G. 1993. Assessment of ram sperm mitochondrial function by quantitative determination of sperm rhodamine 123 accumulation. *Mol. Reprod. Dev.* 36:354-360.
- WINDSOR, D.P.; WHITE, I.G. 1995. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. *Anim. Reprod. Sci.* 40:43-58.
- WOELDERS, H. 1990. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. *Reprod. Dom. Ani. Suppl.* (1):145-164.
- XU, Z.Z.; MCDONALD, M.F.; MCCUTCHEON, S.N.; BLAIR, H.T. 1991. Seasonal variation in testis size, gonadotrophin secretion and pituitary responsiveness to GnRH in rams of two breeds differing in time of onset of the breeding season. *Anim. Reprod. Sci.* 26:281-292.
- YANAGIMACHI, R. 1993. Mammalian Fertilization. In: Knobil E (eds) *Physiology of Reproduction*. Raven Press, NY, USA. pp. 189-317.
- YÁNIZ, J.; MARTÍ, J.I.; SILVESTRE, M.A.; FOLCH, J.; SANTOLARIA, P.; ALABART, J.L.; LÓPEZ-GATIUS, F. 2005. Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15 °C on their survival and penetrating capacity. *Theriogenology*. 64:1844-1851.
- YOSHIDA, M. 2000. Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:349-355.
- ZANEVELD, L.J.D.; JEYENDRAN, R.S. 1990. Hypoosmotic swelling test. In: *Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility*. Keel, BA; Webster BW (eds.). CRC Press, Boca Ratón, USA. pp. 91-110.

8. APÉNDICE

SOLUCIÓN N° 1

SOLUCIÓN FISIOLÓGICA FORMOLADA 1 ‰

Solución de formol al 38 % 1 ml
Formaldehyde solution® SIGMA F8775

Solución Fisiológica (CINa 0,9 %) 1000 ml

Nota: Conservar a temperatura ambiente hasta su uso.

SOLUCIÓN N° 2

SOLUCIÓN DE CITRATO DE SODIO 2,92 %

Citrato de Sodio 2,92 g
Sodium citrate® MALLINCKRODT 0754

Agua pura c.s.p. 100 ml
Barnstead/Ultraline®, modelo D 11931 (USA)

Nota: Conservar en heladera, hasta su uso.

SOLUCIÓN N° 3

SOLUCIÓN DE EOSINA

Eosina G 2%
Eosina G 2% solution for supravital staining® MINITUB 15405/0025

Nota: Conservar en heladera, hasta su uso.

SOLUCIÓN N° 4

SOLUCIÓN DE NIGROSINA

Nigrosina 4%
Nigrosina 4% solution for supravital staining® MINITUB 15405/0029

Nota: Conservar en heladera, hasta su uso.

SOLUCIÓN N° 5**DILUYENTE PARA CONGELACIÓN (según protocolo de Maxwell, 1986)**

(Tris [hydroxymethyl] amino-methane 99,9 %) Trizma base® SIGMA T1410	4,356 g
Glucosa D-(+)-Glucose® SIGMA G6152	0,598 g
Acido Cítrico Citric acid monohydrate® SIGMA C7129	2,386 g
Estreptomina Streptomycin sulfate salt® SIGMA S9137	0,100 g
Penicilina G (Benzylpenicillin) Sodium salt® SIGMA P3032	0,060 g
Agua pura c.s.p. Barnstead/Ultraline®, modelo D 11931 (USA)	76 ml
Glicerol 99 % Glycerol® SIGMA G2025	6 ml
Yema de huevo	18 ml

Nota: Alicuotar en tubos a razón de 10 ml c/u. Conservar congelado a -20 °C hasta 1 hora antes de su uso. Descartar el remanente diario.

SOLUCIÓN N° 6**SOLUCIÓN ISOTÓNICA (según protocolo de Harrison y Vickers, 1990)**

Cloruro de Sodio (140 mM) Sodium chloride® SIGMA S5806	0,810 g
Glucosa (10 mM) D-(+)-Glucose® SIGMA G6152	0,180 g
Cloruro de Potasio (2,5 mM) Potassium chloride® SIGMA P5405	0,018 g
Alcohol Polivinílico (0,5 g/ml) Poly(vinyl alcohol)® SIGMA P8136	0,050 g
Polivinilpirrolidona (0,5 g/ml) Polyvinylpyrrolidone® SIGMA P0930	0,050 g
Hepes (20 mM) HEPES sodium salt® SIGMA H9136 o H7006	0,560 g
Agua pura c.s.p. Barnstead/Ultraline®, modelo D 11931 (USA)	100 ml

Nota: Ajustar el pH a 7,55 con el agregado de Hidróxido de Sodio (**Sodium hydroxide® SIGMA S5881**), y la osmolaridad a 300 mOsm/l. Conservar en heladera a 5° C, hasta su uso.

SOLUCIÓN N° 7

SOLUCIÓN HOS (según Paulenz, 1992)

Citrato de Sodio Sodium citrate® MALLINCKRODT 0754	0,49 g
Fructosa D-(-)-Fructose® SIGMA F3510	0,90 g
Agua pura CSP Barnstead/Ultraline®, modelo D 11931 (USA)	100 ml

Nota: Ajustar la osmolaridad a 100 mOsm/l y pH a 7,5 -7,8 (ajustar adicionando hidróxido de sodio **Sodium hydroxide® SIGMA S5881**). Alicuotar en botellas con tapa, a razón de 50 ml c/u, y conservar en heladera a 5 °C hasta su uso.

SOLUCIÓN N° 8

SOLUCIÓN HOS FORMOL

Solución HOS	1 ml
Solución formol al 38 % Formaldehyde solution® SIGMA F8775	3 µl

Nota: Conservar a 5 °C, hasta su uso.

SOLUCIÓN N° 9**SOLUCIÓN DE DIACETATO DE CARBOXIFLUORESCÉINA (CFDA)****(según protocolo de Harrison y Vickers, 1990)****a) Solución Stock (1 mg/ml)**

Carboxifluoresceína 6-Carboxyfluorescein diacetate® SIGMA C5041	0,010 g
--	---------

Dimetil sulfóxido (DMSO) Dimethyl sulfoxide® SIGMA C5879	10 ml
---	-------

Nota: Alicuotar en 20 tubos 500 µl y conservar a -20 °C y al abrigo de la luz.**b) Solución de Trabajo (0,5 mg/ml)**

Solución stock de CFDA	500 µl
------------------------	--------

DMSO	500 µl
------	--------

Nota: Conservar a -20 °C y al abrigo de la luz hasta 1 hora antes del uso.**SOLUCIÓN N° 10****SOLUCIÓN DE IODURO DE PROPIDIO (PI)****(según protocolo de Harrison y Vickers, 1990)****a) Solución Stock (1 mg/ml)**

Ioduro de propidio Propidium iodide® SIGMA P4170	0,010 g
---	---------

Agua Pura Barnstead/Ultraline®, modelo D 11931 (USA)	10 ml
---	-------

Nota: Conservar a 5° C y al abrigo de la luz.**b) Solución de trabajo (0,5 mg/ml)**

Solución stock de Ioduro de Propidio	500 µl
--------------------------------------	--------

Agua Pura	500 µl
-----------	--------

Nota: conservar a -20 °C y al abrigo de luz hasta 1 hora antes del uso.

SOLUCIÓN N° 11**SOLUCIÓN ISOTÓNICA FORMOLADA**

Solución de Formol al 38 % Formaldehyde solution® SIGMA F8775	10 µl
Solución isotónica (Solución N° 6)	1470 µl

Nota: Conservar a 5 °C hasta su uso.

SOLUCIÓN N° 12**SOLUCIÓN DE RODAMINA 123 (Rh 123)**

(según protocolo de Grasa, 1997)

a) Solución Stock (0,4 mg/ml)

Rodamina 123 Rhodamine 123® SIGMA C5879	0,004 g
Dimetil sulfóxido (DMSO) Dimethyl sulfoxide® SIGMA C5879	1,0 ml

Nota: Conservar a -20 °C y al abrigo de la luz.

b) Solución de trabajo (0,2 mg/ml)

Solución stock de Rodamina	500 µl
DMSO	500 µl

Nota: Alicuotar en 20 tubos Eppendorf con 100 µl c/u, conservar a -20 °C y al abrigo de luz hasta 1 hora antes del uso.