



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

TÍTULO:

“Respuesta del estrés al uso de Electro eyaculador en carneros con y sin tranquilizante: evaluación de calidad seminal, congelabilidad y parámetros hormonales”

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MAGÍSTER EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

Autor: M.V.Z. Luis Alejandro Ulloa Ramones

C.I. 1400675847

Director: M.Sc. Hernán Patricio Bueno León

C.I. 0102813532

CUENCA

2017



RESUMEN

En la actualidad las técnicas más frecuentemente utilizadas en la colecta de semen de ovinos para preservar el material genético ya sea con fines reproductivos o de conservación son: Vagina Artificial (VA) y Electroeyaculador (EE). En lo que respecta al EE, existe preocupación en la comunidad científica por el estrés que puede generar el empleo de ésta técnica en los animales y por lo tanto afectar a su bienestar. Existen trabajos previos en este tema, algunos utilizaron tranquilizante y otros no. El objetivo de esta investigación fue evaluar la respuesta al estrés por el uso de electroeyaculador en carneros tratados con y sin tranquilizante sobre la calidad y congelabilidad de semen y parámetros hormonales. Se estudió el semen de cuatro carneros de la raza Corriedale sexualmente maduros, entre 2-3 años de edad, con pesos comprendidos entre 60-90kg. En uno de los tratamientos se administró xilacina (2%) en dosis de 0,05mg/kg de peso del carnero y en el otro tratamiento no se inyectó tranquilizante. Se realizó ocho colectas por animal, cuatro con cada tratamiento y se analizó las características cuali-cuantitativas del semen fresco y post-descongelado. Para determinar los parámetros hormonales (cortisol y testosterona) se tomó muestras de sangre en tres tiempos: 20 minutos antes, durante y 20 minutos después de la aplicación del EE, los niveles hormonales se midieron por ELISA. Se encontró diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en el volumen, concentración, porcentaje de espermatozoides vivos y en la motilidad post-descongelación, siendo mayor en el tratamiento con tranquilizante, por lo que concluimos que la administración de xilacina previa a la EE resultó ser eficaz en el análisis de esas variables.

PALABRAS CLAVES: CARNEROS, CORTISOL, ELECTROEYACULADOR, SEMEN, TESTOSTERONA, XILACINA.



ABSTRACT

Actually the techniques most frequently used in the collection of ram semen for preserve the genetic material either for reproductive or conservation reasons are: Artificial Vagina (AV) and Electroejaculator (EE). Regarding EE, there is concern in the scientific community about the stress that can generate the use of this technique in animals and therefore affect their well-being. There are previous scientific researches on this subject, some used tranquilizer and others did not. The aim of this investigation was asses the stress response by the use of electroejaculator in rams treated with and without tranquilizer on the quality and freezing of semen and hormonal parameters. We studied the semen of four sexually mature Corriedale rams, between 2-3 years of age, with weights ranging from 60-90kg. In a treatment, xylazine (2%) was administered at doses of 0,05mg/kg of ram weight and in the other treatment no tranquilizer was injected. Eight collections per animal were performed, four with each treatment and the qualitative-quantitative characteristics of fresh and post-thawed semen were analyzed. To determine the hormonal parameters (cortisol and testosterone) blood samples were taken at three times: 20 minutes before, during and 20 minutes after EE application, hormone levels were measured by ELISA. Statistically significant differences ($P < 0.05$) were found in the volume, concentration, percentage of live spermatozoa and in post-thaw motility, being higher in the tranquilizer treatment, so we conclude that administration of xylazine prior to EE proved to be effective in the analysis of these variables.

KEYWORDS: CORTISOL, ELECTROEJACULATOR, RAMS, SEMEN, TESTOSTERONE, XYLAZINE.



CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CONTENIDO.....	3
LISTA DE TABLAS.....	5
LISTA DE FIGURAS	5
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA.....	6
CLÁUSULA DE DERECHOS DEL AUTOR.....	7
CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL	8
AGRADECIMIENTOS	9
DEDICATORIA.....	10
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	11
CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. Colección de semen con electroeyaculador.....	13
2.1.1. Electroeyaculador.....	13
2.1.2. Plasma seminal.....	14
2.2. Evaluación seminal	15
2.3. Criopreservación del espermatozoide	15
2.4. Xilacina.....	15
2.5. Farmacocinética	16
2.6. Farmacodinamia.....	16
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Materiales.....	18
3.1.1. Materiales biológicos.....	18
3.1.2. Materiales químicos.....	18
3.1.3. Materiales físicos	18
3.2. Métodos	19
3.2.1. Localización	19
3.2.2. Características de la unidad de análisis.....	20
3.2.3. Metodología.....	20
3.2.4. Variables analizadas	27
3.2.5. Diseño experimental y pruebas estadísticas	28
CAPITULO IV: RESULTADOS.....	29
4.1 Mediciones Previas	29
4.2. Análisis Seminal.....	29



4.3. Análisis Hormonal	31
CAPITULO V: DISCUSIÓN	33
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	36
Bibliografía	37
ANEXOS	41



LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Cronograma de extracciones seminales	21
Tabla 2 Análisis de muestras sanguíneas	25
Tabla 3 Resultados de las Variables: DT, CC, Peso en cada tratamiento	29
Tabla 4 Variables del Análisis Seminal que presentaron significación.....	31
Tabla 5 Variables del Análisis seminal que no presentaron significación	31
Tabla 6 Medición de Hormonas (cortisol y testosterona) en sangre	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Electroeyaculador para carneros (Western, 2008).....	14
--	----



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

AA1: Anormales en fresco.

AA2: Anormales post descongelación.

CA: Cortisol Antes.

CC: Condición Corporal.

CDES: Cortisol Después.

CDU: Cortisol Durante.

DT: Diámetro Testicular.

EE: Electroeyaculación.

HOST: Hypoosmotic swelling test (Prueba hipo osmótica de membrana).

IA: Inseminación Artificial.

IM: Intramuscular.

IV: Intravenosa.

MIP: Motilidad Individual Progresiva.

MM: Motilidad Masal.

MOT 2: Motilidad Post descongelación.

SC: Subcutánea.

SNC: Sistema Nervioso Central.

TA: Testosterona Antes.

TDES: Testosterona Después.

TDU: Testosterona Durante.

VA: Vagina Artificial.

VIVOS 1: Vivos en fresco.

VIVOS 2: Vivos post descongelación



CLÁUSULA DE DERECHOS DEL AUTOR

Yo, Luis Alejandro Ulloa Ramones, autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Respuesta del estrés al uso de Electroeyaculador en carneros con y sin tranquilizante: evaluación de calidad seminal, congelabilidad y parámetros hormonales”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 10 de julio del 2017.



Luis Alejandro Ulloa Ramones

C.I: 1400675847



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo, Luis Alejandro Ulloa Ramones, autor del trabajo de titulación “Respuesta del estrés al uso de Electroeyaculador en carneros con y sin tranquilizante: evaluación de calidad seminal, congelabilidad y parámetros hormonales”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 10 de julio del 2017.

Luis Alejandro Ulloa Ramones

C.I: 1400675847



AGRADECIMIENTOS

Al Supremo Creador, mi Dios, omnipotente, por brindarme día a día el don de la vida y las bendiciones para avanzar; a la Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias a mis maestros por entregarme sus conocimientos para formarme como ser humano y profesional, a mis compañeros de estudios, por compartir momentos de cátedra y convivencia armónica.

A mis padres, hermanos y prolongación de mi existencia, mi hijo Julián, por ser mi fuerza y motivación diaria, para el logro de esta meta.

Luis Alejandro Ulloa Ramones



DEDICATORIA

Con mucho amor y cariño, dedico el presente trabajo de investigación a mis padres: Luis Alejandro y Ela Narciza, a la bendición superior que el Supremo Creador me ha brindado mi hijo: Julián Alejandro, a mis hermanos, fuente de inspiración: Gabriela y Diego, quienes a diario me facilitaron sus palabras de aliento y sus manos generosas, para que esta sana idea de superación no se trunque y llegue a feliz término, cuando mis fuerzas desmayaban y sentía desfallecer.

Luis Alejandro



CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

Para la colecta de semen en carneros las técnicas comúnmente empleadas son: VA y EE. Sin embargo la EE suele producir estrés en los animales y por lo tanto atenta contra su bienestar.

La EE es una técnica de colección de semen, utilizada en aquellos machos que no han sido entrenados para trabajar con VA, con problemas en las patas, columna o falta de libido. La EE no siempre termina en eyaculación, depende en gran medida del nivel de estimulación que reciba el carnero, los eyaculados obtenidos por éste método son de menor calidad que los de VA. Se ha demostrado que durante la EE, la electricidad aplicada induce cambios relevantes en la frecuencia cardiaca y niveles de cortisol en los carneros, por lo que se ha prohibido su uso en algunos países. En el caso de ser indispensable su aplicación, es imprescindible asociarla con algún tratamiento anestésico para reducir los efectos estresantes en el animal, según Orihuela (2014).

La criopreservación de semen es una biotecnología reproductiva de gran importancia, que busca promover la conservación del germoplasma masculino por tiempo indeterminado. Esta biotecnología asociada a la IA, representan un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad, según Ribeiro-Peres *et al.*,(2014).

Según Palmer (2005) en Estados Unidos y otras latitudes tropicales, la EE todavía se considera un procedimiento aceptable por la mayoría de los comités de bienestar animal. Sin embargo, en ciertos países europeos la EE sin anestesia en toros se ha prohibido, según Mosure *et al.*,(1998).

Objetivo general:

Evaluar la respuesta al estrés por el uso de electroeyaculador (EE) en carneros con y sin tranquilizante, evaluando calidad seminal, congelabilidad y parámetros hormonales.

Objetivos específicos:

- Evaluar las características cuali-cuantitativas de semen fresco y descongelado de carnero obtenido por electroeyaculación con y sin tranquilizante previo a su colecta.



- Evaluar los niveles de cortisol y testosterona de los carneros durante el proceso de colecta.

Hipótesis

¿El uso de tranquilizantes previo a la colecta de semen de carneros con EE mejora las características cuali-cuantitativas y congelabilidad de semen al disminuir el estrés provocado por el uso de esta técnica?



CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Colección de semen con electroeyaculador

La EE consiste en la aplicación de estímulos eléctricos por medio de una sonda rectal. Estos impulsos eléctricos provocan la contracción de la musculatura de los miembros pélvicos, así como la erección del pene (Fumagalli, 2012). Cuando se produce la estimulación adecuada, esta viaja vía nervio pudendo interno hacia los centros lumbosacros de la columna vertebral, desde allí parte la respuesta vía nervios simpáticos lumbares (nervio erigente del plexus hipogástrico), lo cual estimula la contracción de la musculatura lisa que recubre la próstata, glándulas vesiculares y conductos deferentes, asegurando la progresión de la masa espermática hacia la uretra pélvica (emisión) (Morrillo *et al.*, 2012).

Por otro parte, la respuesta nerviosa viaja vía nervios parasimpático para provocar la contracción de la musculatura estriada del tracto uretral (músculo isquiocavernoso, bulbo esponjoso y uretral), lo cual que resulta en la erección del pene y la eyaculación propiamente dicha. (Morrillo *et al.*, 2012).

Las sondas miden aproximadamente 30 cm de largo y de 20 a 30 mm de diámetro, tienen electrodos longitudinales o transversales (Garcia-Macias *et al.*, 2006) El equipo produce descargas de 1 a 15 V (Fumagalli, 2012).

2.1.1. Electroeyaculador

Una de las técnicas empleadas para la recolección de semen en animales domésticos, principalmente en rumiantes (bovinos, ovinos y caprinos), es el uso de la EE. Para esto se emplea un dispositivo electrónico, que consiste en una fuente generadora de energía que transmite impulsos eléctricos en una determinada frecuencia, voltaje y corriente que son conducidos a través de un transductor, que es un dispositivo de forma anular de proporciones requeridas según la especie y contiene electrodos que permiten el paso de energía eléctrica, lo que provocará las descargas que permitan eyacular al animal (Yamasaki *et al.*, 2005).



Figura 1 Electroeyaculador para carneros (Western, 2008)

El volumen de un eyaculado de carnero con vagina artificial, oscila entre 0,8 y 1,2 ml, con una concentración espermática aproximada de $1,5 \times 10^9$ espermatozoides/ml. Sin embargo, existen carneros de gran calidad que producen eyaculados de hasta 3,0 ml, concentraciones espermáticas máximas de hasta $7,0 \times 10^9$ espermatozoides/ml (Parraguez *et al.*, 2000) con un promedio de motilidad de 64.5% (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2006).

Con el uso de electroeyaculador se han obtenido los siguientes resultados:

Volumen promedio: 1ml, con concentraciones de 5.2×10^9 y motilidad de 71.9% según (Marco-Jiménez *et al.*, 2008); por otra parte hay resultados de un volumen promedio de 2ml con concentración de 1163×10^6 y motilidad de 84.5% (Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012); y en el trabajo de (Ledesma *et al.*, 2014) obtuvieron valores de 3.9 ml de volumen promedio, con motilidad de 81.7%

2.1.2. Plasma seminal.

El plasma seminal es una compleja mezcla de secreciones que se originan principalmente en el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias del macho (Töpfer-Petersen *et al.*, 2005), cumple un rol de protección de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo de la hembra (Troedsson *et al.*, 2005), donde las proteínas presentes en el plasma seminal protegen a los espermatozoides vivos para no ser fagocitados por los polimorfonucleares presentes en el útero; también juegan un rol importante en el transporte y eliminación de espermatozoides muertos (Loomis, 2006). La amplia variación en la calidad espermática del semen refrigerado que se observa entre machos de una misma especie, puede atribuirse a diferencias en la composición de su plasma seminal (Muiño-Blanco *et al.*, 2008).



2.2. Evaluación seminal

La evaluación convencional del semen en las diferentes especies incluye diversos parámetros macroscópicos: volumen y color, microscópicos: concentración, motilidad, viabilidad y HOST. Los valores obtenidos a partir de un espermatograma básico no son indicadores de fertilidad, sino de la funcionalidad del macho, así como de su ciclo hormonal y espermatogénico (Santiani et al., 2004).

Sin embargo, muchos estudios realizados en nuestro medio orientados al manejo y conservación de espermatozoides en animales domésticos, incluyen limitados parámetros de referencia. No obstante, existen técnicas especializadas diseñadas para estimar la potencial capacidad fecundante de una muestra de semen. En ovinos, la evaluación de la integridad funcional y estructural de la membrana plasmática, así como de la acrosomal pueden ser indicadores de la funcionalidad de sus espermatozoides (Santiani et al., 2004).

2.3. Criopreservación del espermatozoide

El éxito en la criopreservación de espermatozoides depende del mantenimiento de su potencial fertilizante, el cual ofrecerá integridad y funcionalidad a las diferentes estructuras celulares (Hammerstedt et al., 1990). Los espermatozoides capaces de fecundar al ovocito, deben mantener al menos cuatro atributos básicos después de la congelación y descongelación:

Metabolismo para producir energía

Motilidad progresiva (importante para la fecundación, ya que mide el grado de avance que éste tendrá en el tracto reproductivo femenino)

Enzimas acrosómicas (importantes para la penetración de los espermatozoides a través de las estructuras que rodean al ovocito) (Salomon & Maxwell, 1995)

Proteínas de la membrana plasmática (importantes para la supervivencia de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino y para su conexión a la membrana del ovocito durante la fecundación) (Andrabi, 2009).

2.4. Xilacina

Es un derivado tiacínico con capacidad analgésica, sedante y relajante muscular. Un incremento en la dosis no suele acompañarse de un aumento de



los niveles de sedación, aunque sí prolonga la duración de sus efectos, que en general se sitúan en torno a los 20-30 minutos. Debido a sus efectos, resulta de gran utilidad en la sedación de animales, de cara a la realización de procedimientos poco cruentos, tales como radiografías, ecografías, curas, etc. Cabe recordar que la disminución de la motilidad intestinal conlleva el acúmulo de gases en el tracto gastroentérico. Los rumiantes son muy sensibles a la administración de agonistas α -2 adrenérgicos, como la xilacina, por lo que las dosis varían entre 0,05-0,1 mg/Kg IV y 0,1-0,2 mg/Kg IM. La sedación tras la administración IV será efectiva a los 3-5 minutos y de 10-15 minutos por vía IM (Belda et al., 2005). En Rumiantes (sin ayuno) hay salivación profusa por decremento de la deglución, y se presenta parálisis de los movimientos ruminales, sin aparente peligro para la evacuación de gases (Sumano López y Ocampo Camberos, 2006), por lo que no se requeriría el ayuno de los animales.

2.5. Farmacocinética

Después de administrarse por vía IM, la xilacina se absorbe rápidamente, aunque su biodisponibilidad es incompleta. Al administrar por vía IM tiene una biodisponibilidad de 40-48% en equinos 17-73% en ovinos y 52-90% en caninos. Cuando se administra por vía IV en el caballo, su efecto comienza en 1-2 min siempre y cuando se use el preparado al 10%. En perros y gatos, el efecto de la xilacina cuando se administra por vía IM o SC empieza a los 10-15 min, y por vía IV (preparado al 2%) en 3-5 min. La analgesia persiste hasta 15-30 min, pero la sedación al menos 1-2 h. La xilacina se biotransforma en gran medida convirtiéndose hasta en 20 metabolitos. Su vida media es de 23 min en la oveja, 50 min en el caballo, 36 min en la vaca y 30 min en el perro (Sumano & Ocampo, 2006).

2.6. Farmacodinamia

La xilacina estimula los receptores periféricos α -2 presinápticos, que induce la liberación de noradrenalina y genera un estímulo vagal vía central. Además de un efecto analgésico y sedante, la xilacina genera actividad relajante muscular por inhibición de la transmisión intraneuronal de impulsos. Por este fundamento se le ha usado en la terapia antitétánica. A pesar que tiene efectos similares a



los de la morfina en algunos receptores, no causa excitación en felinos, equinos o bovinos (Sumano & Ocampo, 2006).



CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Materiales biológicos

- 4 Carneros adultos de la raza Corriedale
- Pajuelas con semen de carneros
- Suero sanguíneo de carneros

3.1.2. Materiales químicos

- Diluyente AndroMed®
- Tinción de Eosina-Nigrosina
- Alcohol polivinílico
- Fructosa
- Citrato de sodio
- Xilacina al 2 %
- Gel Carboxi-metil-celulosa
- Agua destilada
- Nitrógeno Líquido (-196°C)
- Kit ELISA para Cortisol
- Kit ELISA para Testosterona

3.1.3. Materiales físicos

- Embudo de colección de semen
- Tubos Vacutainer
- Jeringas de 3ml, 5ml y 10 ml
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Gradilla
- Pajuelas de 0,25 ml
- Tubos Falcon de 15 ml.
- Termómetro
- Vasos de Precipitación de 50ml, 100ml y 250ml.



- Pipetas de 1ml y 5ml.
- Refrigerador
- Rampa de Flotación
- Termo de Nitrógeno Líquido
- Microscopio CX31. Olympus
- Fotómetro SDM1. Minitube
- Platinas térmicas XH-2012. Premier
- Electroeyaculador Bailey MOD2. Western Instrumental Company
- Estufa INC-108. Memmer
- Gradillas
- Micropipetas de 1000 μ l, 500 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- Puntas de Pipeta
- Baño maría
- Cámara para microscopio. ACCU Scope. Excelis HDF
- Estetoscopio
- Televisión
- Microplacas para ELISA
- Lector de microplacas ELISA

3.2. Métodos

3.2.1. Localización

La presente investigación se realizó en la granja Irquis de la Universidad de Cuenca ubicada en la parroquia Victoria del Portete, cantón Cuenca, provincia del Azuay, en el callejón interandino a una altitud promedio de 2600 msnm, temperatura entre 10-14° C, con las siguientes coordenadas UTM: X: 714038.17 Y: 9659215.46

El procesamiento del material genético, crioconservación y evaluación post-descongelación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la granja Irquis de la Universidad de Cuenca.

El análisis de las muestras sanguíneas para las evaluaciones hormonales se realizó en el Laboratorio CENBIOCLI S.A. en la ciudad de Cuenca.



3.2.2. Características de la unidad de análisis

Se trabajó con muestras de semen fresco, pajuelas de 0,25 ml descongeladas y muestras de sangre para el análisis de cortisol y testosterona. Se estudiaron cuatro carneros sexualmente maduros, mayores a un año de edad, con un peso entre 60-90 Kg. Dos meses antes de iniciar la presente investigación, se llevaron a Irquis dos carneros procedentes de la granja de Nero de la Universidad de Cuenca, éstos animales fueron sometidos a una etapa de adaptación a las condiciones climáticas, de manejo (pastoreo extensivo); su alimentación se basa en pastura Ryegrass y concentrado, sal mineral y agua se ofrecieron *ad libitum*. Los otros dos carneros estudiados siempre estuvieron en la granja de Irquis.

Se hizo un examen previo a los animales y se determinó que no presentan enfermedades reproductivas ni de otra índole.

3.2.3. Metodología

3.2.3.1. Administración de xilacina

Se administró xilacina vía IV en la vena yugular 10 minutos antes a la colecta de semen con EE. La dosis aplicada fue de 0,05 mg/Kg de peso vivo.

3.2.3.2. Extracción de semen con electroeyaculador

El semen de los cuatro carneros se extrajo con EE dos veces por semana. En todo el estudio se tomó ocho muestras a cada animal; en cuatro colectas se administró el tranquilizante xilacina (dosis de 0,05 mg/Kg de peso vivo por vía IV 10 minutos antes de la extracción de semen) y cuatro colectas sin tranquilizante. Tabla N°1.

Previo a la electroeyaculación, se retiró manualmente la materia fecal de la ampolla rectal, se lubricó con gel de carboxi-metil-celulosa para no dañar la mucosa rectal con la sonda y de esta manera lograr un mejor contacto. El EE utilizado tiene una sonda de 7/8 de pulgada de diámetro y 7 pulgadas de largo, además dos electrodos que están dispuestos de manera circular en el extremo de la sonda. Este EE trabaja con 6 voltios, el contador de impulsos es de 60 por segundo y la anchura de pulso es aproximadamente 1/5 de un segundo. (Western, 2017).

Se insertó la sonda (con los electrodos hacia delante) aproximadamente 10 cm



en el recto del carnero, quedando ubicada por encima de las glándulas anexas. Se dio descargas eléctricas durante 4 segundos seguidos por 4 segundos de descanso, se repitió el ciclo hasta que el animal eyaculó.

Para asegurarse que la sonda se encuentra en el sitio correcto, es necesario observar los músculos posteriores, que responden a los estímulos eléctricos a través de contracciones espasmódicas (Fumagalli, 2012). Al aplicar el estímulo eléctrico afecta a los nervios simpático lumbares según Morillo *et al.*, (2012). La cadena simpática está separada de las raíces nerviosas somáticas lumbares por cada músculo psoas y su fascia (González Mesa *et al.*, 2013), cuya función es la de flexionar la articulación de la cadera. con respecto al músculo psoas menor, su principal función consiste en flexionar la pelvis sobre la región dorsal o lumbar (arquear los lomos) (Urroz, 2004), lo que provocaría los movimientos típicos al aplicar esta técnica del tren posterior.

Tabla 1 Cronograma de extracciones seminales

CARNEROS	EXTRACCIÓN DE SEMEN		
	E.E.	E.E.+ xilacina	TOTAL
Carnero A	4	4	8
Carnero B	4	4	8
Carnero C	4	4	8
Carnero D	4	4	8
SUBTOTAL	16	16	32

3.2.3.3. Evaluación de Semen Fresco

Una vez obtenidas las muestras de los carneros, éstas fueron transportadas inmediatamente al laboratorio para realizar los siguientes análisis:

- *Volumen*
- *Concentración*: se midió en el fotómetro, que nos da el resultado en millones de espermatozoides por ml.
- *Motilidad masal (MM)*, medida en una escala de 1 a 5, se colocó una gota de semen puro sobre un portaobjetos temperado a 37°C, sobre una platina térmica de microscopio y se observó a 40X.
- *Motilidad individual progresiva (MIP)* se observó al microscopio



con lente de 40X, se colocó 10 μ l de semen puro sobre un portaobjetos precalentado en la placa térmica a 37°C. Se evaluó en porcentaje (0-100%). Para determinar la MIP, se consideró los siguientes movimientos:

- a) Progresivo rectilíneo: espermatozoides con movimiento activo y energético, con desplazamiento en sentido de avance.
 - b) Ondulatorio: movimiento lento, con pequeño desplazamiento originado por golpes lentos y laterales de la cola.
 - c) Rotatorio: movimientos sobre sí mismo con un radio reducido y cierta velocidad.
 - d) Espermatozoides inmóviles.
- *Vitalidad Espermática (VE) y Anormalidades* mediante la tinción eosina-nigrosina. En un portaobjetos precalentado a 37°C, se mezcló una gota de 5 μ l de semen con una gota del mismo volumen de la tinción de eosina-nigrosina. A continuación se hizo un frotis con un cubreobjetos (37°C), se observó al microscopio y se contó 100 espermatozoides en distintos campos, finalmente para determinar la VE se sacó un porcentaje entre espermatozoides vivos (cabeza blanca) y muertos (cabeza roja), lo mismo se hizo para las anormalidades, se calculó el porcentaje entre espermatozoides normales y anormales (sin cola, macrocabezas, microcabezas, gota citoplasmática, etc).

En general, el porcentaje aceptable de anormalidades de cabeza es de 15-20%, mientras que las anormalidades de acrosoma y cola se puede aceptar hasta un 25%. Fuese cual fuese el sistema de clasificación, en cualquiera de los casos se debe esperar un mínimo de 70% de espermatozoides normales en el eyaculado. (Gómez & Migliorisi, 2017)

3.2.3.4. Procesamiento del semen y crioconservación

El semen extraído se diluyó con AndroMed® El diluyente se preparó a 37°C, sobre la placa térmica, se colocó 200ml de AndroMed® en 800 ml de agua bidestilada.



El cálculo para el número de dosis por eyaculado, se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\# \text{ pajuelas} = \frac{V \times [] \times MIP}{50 \times 10^6}$$

V: volumen

[]: concentración

MIP: motilidad individual progresiva

50×10^6 : concentración espermática por pajuela

Se agregó la cantidad de diluyente, según la siguiente fórmula:

$$DT = \# \text{ pajuelas} - V$$

DT: diluyente total

V: volumen

Una vez calculado los volúmenes de semen y de AndroMed® se procedió a empajuelar, se procesó 10 pajuelas por eyaculado. Se colocó las pajuelas en un vaso de precipitación con agua destilada dentro del refrigerador hasta que alcanzó una temperatura de 5°C, aproximadamente en una hora (tiempo de equilibrio). Posteriormente se colocó las pajuelas en una rampa de flotación (dentro del mismo refrigerador) a la misma temperatura durante dos horas. Luego se colocó la rampa de flotación con las pajuelas dentro de una caja de espuma flex a una altura de 4 cm del nivel de nitrógeno líquido durante 10 minutos, posteriormente se realizó la inmersión de las pajuelas en nitrógeno y finalmente se colocaron dentro del termo de nitrógeno líquido a -196°C hasta realizar su evaluación post-descongelación.

3.2.3.5. Evaluación del semen post-descongelado

Transcurridos 7 días se descongeló las pajuelas, se sumergió en Baño maría (37°C por 1 minuto) y se evaluó las características cuali-cuantitativas de los espermatozoides. Se realizó las siguientes pruebas: MIP, VE, anormalidades y Test HOST.

3.2.3.6. HOST

Por medio de la prueba hipoosmótica (hyposmotic swelling test HOST) se



evaluó la integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides. Su principio consiste en suspender a los espermatozoides en un medio hipoosmótico, aquellos que son bioquímicamente activos (HOST +) permitirán la entrada de agua y mostrarán diferentes grados de turgencia en un esfuerzo por mantener la dinámica de equilibrio entre los líquidos de su compartimento intracelular y los del medio extracelular, como consecuencia, el espermatozoide aumenta su volumen con notables cambios en la morfología de sus flagelos: dilatación o enrollamiento (Hernández et al., 2015). Esta respuesta se asocia con el grado de integridad normal de la membrana y la actividad funcional de la misma, requisito indispensable para que se dé la reacción acrosómica durante el proceso de fertilización (Urrego et al., 2008).

Para evaluar el efecto de la permeabilidad de la membrana espermática mediante HOST, se utilizó el protocolo propuesto por Correa & Zavos (1994), basándonos en el principio de que los azúcares y los electrolitos mantienen la integridad funcional de la membrana espermática (Urrego et al., 2008). Por lo tanto, HOST es la técnica ideal para evaluar la permeabilidad de la membrana del espermatozoide independientemente de la especie, como lo confirman los trabajos de Santiani et al (2004) en ovinos, Vazquez et al (1997) en jabalí, Campi et al (2004) en verracos, Correa & Zavos (1994) en bovinos, Jeyendran et al (1984) en humanos.

Ésta prueba se realizó a los espermatozoides procedentes de las pajuelas descongeladas, para ello se preparó una mezcla en una relación 10:1, se colocó en una tubo Eppendorf de 1,5 ml: 100 μ l de la solución de fructosa – citrato de sodio – agua destilada y 10 μ l de la muestra espermática. Luego se llevó los tubos a la estufa, dónde se mantuvieron durante una hora a 37°C, 98% de humedad y 5% de CO₂. Finalmente se observó al microscopio y se contó 100 células, siendo positivos los espermatozoides que presentaron doblez o hinchazón en sus piezas medias o enrollamiento de sus colas.

El porcentaje de espermatozoides positivos a HOST se calculó con el número de células que presentaron modificaciones en sus colas sobre el número total de espermatozoides contados en la misma placa (Urrego et al., 2008).



3.2.3.7. Extracción de muestras sanguíneas

La extracción de las muestras sanguíneas de los ovinos se realizó tres veces por cada colecta de semen:

- 20 minutos antes de la extracción de semen con EE
- Inmediatamente después de la EE
- 20 minutos después de la EE.

Antes de la primera extracción se canalizó una sonda con un catión a la vena femoral, se extrajo 5 ml de sangre por muestra, la cual se colectó en tubos vacutainer (tapa roja) sin EDTA, posteriormente se colocó los tubos en gradillas y fueron llevados al laboratorio de Irquis, se centrifugó y el suero se envió al Laboratorio Cenbiocli S.A. dónde se realizó el análisis de cortisol y testosterona. Tabla 2

Tabla 2 Análisis de muestras sanguíneas

CARNEROS	HORMONAS ANALIZADAS		
	<i>Cortisol</i>	<i>Testosterona</i>	TOTAL
Carnero A	24	24	48
Carnero B	24	24	48
Carnero C	24	24	48
Carnero D	24	24	48
SUBTOTAL	96	96	192

3.2.3.8. Evaluación de parámetros hormonales

La metodología empleada para la detección de las hormonas: cortisol y testosterona fue a través de la técnica de ELISA.

3.2.3.8.1. ELISA para determinar Cortisol

Para realizar el análisis, todos los reactivos, sueros referencia y control estuvieron a temperatura ambiente (20 - 27°C). El procedimiento realizado fue



el siguiente:

- Se ordenó los pocillos de las microplacas, para que cada referencia del suero: control y muestra del paciente, sean analizados por duplicado.
- Se pipeteó 25µl del suero de referencia y de la muestra control en el pocillo asignado.
- Luego se agregó 50µl del reactivo de enzima Cortisol a todos los pocillos y se mezcló durante 20-30 segundos.
- Posteriormente se añadió 50µl del reactivo cortisol biotina a cada pocillo y se mezcló su contenido durante 20-30 segundos para homogenizar. Se cubrió e incubó las microplacas durante 60 minutos a temperatura ambiente.
- Después se secó el contenido de la microplaca por decantación con papel absorbente.
- A continuación se añadió 350µl de Tampón de Lavado y se decantó, se realizó en total tres lavados.
- Luego se agregó 100µl de la Solución Sustrato a todos los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Posteriormente se agregó 50µl de la Solución de Parada a cada pocillo y se mezcló suavemente durante 15-20 segundos.
- Finalmente se leyó la absorbancia de cada pocillo a 450nm (con una longitud de onda de referencia de 620-630nm, para minimizar errores) en un lector de microplacas ELISA. Los resultados se leyeron 30 minutos después de que se añadió la Solución de Parada.

3.2.3.8.2. ELISA para determinar Testosterona

Para realizar el análisis, todos los reactivos, suero referencia y control estuvieron a temperatura ambiente (20 - 27°C). La descripción de la técnica empleada, se cita a continuación:

- Se ordenó los pocillos de las microplacas, para que cada referencia del suero: control y muestra del paciente, sean analizados por duplicado.
- Se pipeteó 10µl del suero de referencia y de la muestra control en el pocillo asignado.



- Luego se agregó 50µl del reactivo de enzima Testosterona a todos los pocillos y se mezcló durante 20-30 segundos.
- Posteriormente se añadió 50µl del reactivo testosterona biotina a cada pocillo y se mezcló su contenido durante 20-30 segundos para homogenizar. Se cubrió e incubó las microplacas durante 60 minutos a temperatura ambiente.
- Luego se secó el contenido de la microplaca por decantación con papel absorbente.
- A continuación se añadió 350µl de Tampón de Lavado y se decantó, se realizó en total tres lavados.
- Luego se agregó 100µl de la Solución Sustrato a todos los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Posteriormente se agregó 50µl de la Solución de Parada a cada pocillo y se mezcló lentamente durante 15-20 segundos.
- Finalmente se leyó la absorbancia de cada pocillo a 450nm (longitud de onda de referencia de 620-630nm) en un lector de microplacas ELISA. Los resultados se leyeron 30 minutos después de que se añadió la Solución de Parada.

3.2.4. Variables analizadas

3.2.4.1. Variables Independientes

- Extracción de semen con electroeyaculador con administración previa o no de tranquilizante xilacina.

3.2.4.2. Variables Dependientes

Variables Dependientes		
Viabilidad Espermática en Fresco	Viabilidad Espermática Post-descongelación	Hormonas en Sangre
Motilidad Masal	MIP	Testosterona
MIP	VE	
VE	Anormalidades	Cortisol
Anormalidades	HOST	



3.2.5. Diseño experimental y pruebas estadísticas

Para el análisis de los datos se utilizó el software estadístico (SPSS versión 23). Se aplicaron pruebas estadísticas generales, de normalidad de datos y homogeneidad de varianza.

Para determinar la normalidad de los datos se aplicó las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Para determinar diferencias estadísticas se aplicó un Análisis de Varianza (ADEVA) para los resultados normales y la Prueba de Mann-Whitney si los datos no cumplían con los parámetros de normalidad.

Las variables analizadas estadísticamente fueron: densidad testicular (DT), condición corporal (CC), peso, volumen, concentración, motilidad masal (MM), HOST, medición del nivel de cortisol y testosterona en sangre antes, durante y después de la aplicación de xilacina. Motilidad individual progresiva (MIP), porcentaje de espermatozoides vivos y de sus anomalías en fresco y postdescongelación.

Los resultados presentados corresponden a las medias y su error estándar, con un nivel de significancia del 5%. Los datos considerados estadísticamente diferentes fueron aquellos donde $p < 0.05$.



CAPITULO IV: RESULTADOS

Los resultados obtenidos se los presenta en tres secciones:

- Mediciones Previas: DT, CC, peso
- Análisis Seminal: volumen, concentración, MM, MIP, porcentaje de vivos, porcentaje de anormalidades, HOST.
- Análisis Hormonal: cortisol y testosterona en sangre.

4.1 Mediciones Previas

Los resultados obtenidos para la variable de DT si cumplieron con el supuesto de Normalidad de datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Anexo 1), no sucedió lo mismo con los resultados de las variables CC y peso. Se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (Anexo 2) y se comprobó que para DT no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos tratamientos ($P>0,05$), demostrando de esa manera que las medidas de densidad testicular entre los carneros en esta investigación fueron parecidas (Tabla 1). Para los resultados correspondientes a CC y peso no se encontró diferencias significativas entre tratamientos ($P>0,05$), lo que nos indica que la condición corporal y peso de los animales estudiados fueron similares (Tabla 3).

Tabla 3 Resultados de las Variables: DT, CC, Peso en cada tratamiento

Variable	Tratamiento		Significancia
	Con Xilacina	Sin Xilacina	
	X ± EE	X ± EE	
DT (cm)	32,5 ± 0,29	32,4 ± 0,32	0,897
CC (Escala NIRD)	2,9 ± 0,03	2,9 ± 0,03	1,000
Peso (kg)	42,4 ± 0,39	42,4 ± 0,39	1,000

X ± EE: media ± error estándar de la media.
^{NS} No hay diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$), según Mann-Whitney.

4.2. Análisis Seminal

Los datos correspondientes al volumen de las muestras seminales de los carneros, cumplieron con el supuesto de normalidad solamente en el tratamiento con xilacina, según lo evidencian los resultados de la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Anexo 1). Mediante la Prueba de Mann-Whitney (Anexo 3) se observó que el volumen seminal presentó diferencias estadísticamente



significativas ($P < 0,05$) entre los dos tratamientos, siendo mayor en el que se aplicó xilacina (Tabla 4).

En lo que respecta a la concentración espermática, los valores que cumplieron con las condiciones de normalidad de datos, fueron los correspondientes al tratamiento con xilacina, según se observan los resultados de las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y la de Shapiro-Wilk (Anexo 1). Se encontraron además diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en la concentración espermática entre los dos tratamientos (Tabla 4) siendo mayor en el tratamiento que se aplicó el tranquilizante, para ello se utilizó la prueba de Mann-Whitney (Anexo 3).

Los resultados de la prueba de HOST para los dos tratamientos cumplieron con los supuestos de normalidad de datos según las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y la de Shapiro-Wilk (Anexo 1). Mediante la prueba estadística de Mann-Whitney no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) para esta variable (Anexo 3).

El resto de variables correspondientes al análisis seminal no cumplieron con las condiciones de normalidad de datos en ninguna de las pruebas realizadas: Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk (Anexo 1). Sin embargo, al realizar la prueba de Mann-Whitney (Anexo 3) se observó significancia ($P < 0,05$) entre tratamientos para las variables de Vivos en fresco y de Motilidad Post-descongelación (Tabla 4), lo que nos indica que los porcentajes de espermatozoides vivos en fresco y la motilidad de éstos luego de descongelar las pajuelas fue mayor en el tratamiento que se aplicó xilacina previo a la extracción de semen en relación al tratamiento sin tranquilizante.

Los valores de las variables de ésta sección que no presentaron diferencias estadísticamente significativas se presentan en la Tabla 5.

**Tabla 4** Variables del Análisis Seminal que presentaron significación

Variable	Tratamiento		Significancia
	Con Xilacina	Sin Xilacina	
	X ± EE	X ± EE	
Volumen (ml)	0,92 ± 0,027 ^a	0,65 ± 0,013 ^b	0,000
Concentración (10 ⁶ esp/ml)	901,2 ± 18,67 ^a	807,4 ± 14,67 ^b	0,002
Vivos1 (%)	63,7 ± 1,25 ^a	56,9 ± 1,20 ^b	0,005
Motilidad Post-desc (%)	50,0 ± 2,24 ^a	43,7 ± 1,80 ^b	0,043

X ± EE: media ± error estándar de la media.
^{a,b} Superíndices distintos indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05), según Mann-Whitney

Tabla 5 Variables del Análisis seminal que no presentaron significación

Variable	Tratamiento		Significancia
	Con Xilacina	Sin Xilacina	
	X ± EE	X ± EE	
MM (escala 1-5)	3,66 ± 0,075	3,72 ± 0,08	0,780
MIP (%)	58,13 ± 1,36	59,38 ± 1,11	0,590
AA1 (%)	11,88 ± 1,008	13,13 ± 1,11	0,445
Vivos2 (%)	55,0 ± 1,60	56,25 ± 1,25	0,491
AA2 (%)	13,13 ± 1,20	13,13 ± 1,20	1,000
HOST (%)	29,81 ± 1,67	30,70 ± 1,71	0,838

X ± EE: media ± error estándar de la media.
^{NS} No hay diferencias estadísticamente significativas (P>0,05), según Mann-Whitney.

4.3. Análisis Hormonal

Los valores de cortisol medidos en la sangre de los carneros antes de la introducción del electroeyaculador, cumplieron con los supuestos de normalidad, según las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y la de Shapiro-Wilk (Anexo 1) en ambos tratamientos: con y sin tranquilizante. Mientras que las mediciones de esta hormona durante y después a la introducción del



electroeyaculador, cumplieron con las condiciones de normalidad solamente en el tratamiento en que se inyectó previamente xilacina, a través de las pruebas estadísticas anteriormente mencionadas. Mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (Anexo 4) se determinó que en ninguno de los casos existieron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,05$), por lo que las mediciones de cortisol en sangre fueron similares en los dos tratamientos (Tabla 6).

Los resultados obtenidos en la medición de la hormona testosterona en sangre antes de introducir el electroeyaculador, cumplieron con los supuestos de normalidad en el tratamiento en que no se inyectó tranquilizante (Kolmogorov-Smirnov, Anexo 1). En el caso de los valores de testosterona durante la introducción del electroeyaculador, aquellas que cumplieron con las condiciones de normalidad fueron las del tratamiento dónde no se aplicó xilacina (Pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, Anexo 1) y las del tratamiento en que sí se inyectó el tranquilizante (Kolmogorov-Smirnov, Anexo 1). Por otro lado, los datos correspondientes a la medida de esta hormona después de la introducción del electroeyaculador, no cumplieron con los supuestos de normalidad en ninguno de los dos tratamientos. Finalmente, mediante la prueba de Mann-Whitney (Anexo 4) no se encontró diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$) en la medición de testosterona entre los tratamientos con y sin tranquilizante (Tabla 6).

Tabla 6 Medición de Hormonas (cortisol y testosterona) en sangre

Variable	Tratamiento		Significancia
	Con Xilacina	Sin Xilacina	
	X ± EE	X ± EE	
CA (µg/dl)	7,44 ± 1,220	5,03 ± 0,502	0,287
CDU (µg/dl)	5,96 ± 0,711	5,04 ± 0,357	0,323
CDES (µg/dl)	4,92 ± 0,750	5,30 ± 0,392	0,254
TA (ng/ml)	2,52 ± 0,609	1,83 ± 0,332	0,696
TDU (ng/ml)	2,17 ± 0,407	1,69 ± 0,237	0,838
TDES (ng/ml)	2,22 ± 0,562	2,03 ± 0,301	0,445

X ± EE: media ± error estándar de la media.
^{NS} No hay diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$), según Mann-Whitney.



CAPITULO V: DISCUSIÓN

Uno de los métodos más empleados en ovinos es la electroeyaculación, proceso que produce estrés en los animales. Este proceso produce estrés en los animales por lo que para disminuir sus efectos se utilizó el tranquilizante “xilacina”, evaluado en el plasma sanguíneo junto con la testosterona, lo que permite medir la libido de los animales y determinar si sus distintos niveles afectan o no las valoraciones cualitativas y cuantitativas del semen fresco así como del postdescongelado.

El volumen fue una de las variables con las que obtuvimos diferencias significativas. La media de los datos obtenidos con el tratamiento con tranquilizante fue: 0,27ml superior a la media del otro tratamiento. Si bien éstos volúmenes son bajos, fueron similares a los obtenidos en el estudio de Marco-Jiménez *et al.*,(2008) cuya investigación se realizó en carneros de raza Guirra a los que se les inyectó xilacina previo a la introducción del electroeyaculador ($1,01 \pm 0,1$ ml). Nuestros resultados se contraponen con los obtenidos en las investigaciones realizadas por Ledesma *et al.*,(2014) (volumen promedio $3,99 \pm 0,386$ ml) y con los resultados obtenidos por Pineda *et al.*, (1987), Pineda y Dooley., (1991) quienes obtuvieron grandes volúmenes seminales utilizando electroeyaculador como método de colecta.

Los datos de concentración presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos, la media del valor correspondiente al tratamiento con xilacina presentó una concentración de 93,8 millones de espermatozoides/ml mayor al otro tratamiento. En un estudio realizado por Mattner y Voglmay, (1962) en nueve carneros de raza Merino colectaron semen con electroeyaculador sin administrar tranquilizante y obtuvieron distintos valores de concentración espermática, con un máximo de 3700×10^6 /ml y un mínimo de 900×10^6 /ml, este último valor es cercano a los obtenidos en ésta investigación. En un trabajo realizado con electroeyaculador por Marco-Jiménez *et al.*, (2005) en carneros de raza Guirra, previamente sedados con xilacina, obtuvieron eyaculados altamente concentrados: 6200×10^6 /ml. Esta variabilidad en las concentraciones se debe al factor raza y al distinto método de aplicación de voltaje continuo en cada intervalo mientras que en los trabajos anteriormente citados el voltaje se aumentó progresivamente.



Se observó diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides vivos de las muestras en fresco entre los dos tratamientos: con xilacina se encontró 6,8% más espermatozoides viables en relación al otro tratamiento. Mientras que en las pajuelas descongeladas con el tratamiento sin tranquilizante se obtuvo 1,25% más de vitalidad espermática que en el otro. El tratamiento sin xilacina de este estudio se observa que el porcentaje de vivos en fresco es 0,65% mayor al obtenido en el mismo tratamiento post-descongelación, sin embargo en el tratamiento con xilacina tanto en nuestro estudio (8,7% mayor en fresco) como en las investigaciones realizadas por Álvarez *et al.*, (1992) y García-Álvarez *et al.*, (2009) el porcentaje de vivos post-descongelación disminuye en gran medida en relación a las muestras en fresco (39,1% y 37% respectivamente).

Los resultados de motilidad masal de nuestro trabajo no presentaron diferencias significativas entre tratamientos. La media de los datos para el tratamiento sin xilacina ($x: 3,72$) son parecidos con la obtenida en el estudio realizado por Cameron, (1977) en carneros de raza Merino ($x: 3,4$).

En el presente trabajo, las muestras en fresco correspondientes al tratamiento sin xilacina que presentaron una motilidad individual progresiva 1,25% mayor en relación a su par sin tranquilizante, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los dos tratamientos.

El resultado de motilidad post-descongelación, en el tratamiento con xilacina se obtuvo una motilidad 6,3% mayor al tratamiento sin tranquilizante, además se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Nuestro resultado fue superior si lo comparamos con el encontrado por García-Alvarez *et al.*, (2009) que obtuvo una motilidad post-descongelación media de $36,67 \pm 7,60\%$. La diferencia en el porcentaje de motilidad post-descongelación entre ambas investigaciones puede deberse a la utilización de distintos métodos para determinar la motilidad, García-Alvarez *et al.*, (2009) utilizaron el sistema CASA, mientras que en este estudio esa valoración fue subjetiva.

En el porcentaje de anormalidades no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos tratamientos tanto en fresco como en post-descongelación, lo cual se corrobora con los resultados obtenidos por Cochran *et al.*, (1984) que trabajó con cinco razas de ovejas: Barbados, St. Croix, Finnsheep, Hampshire, Suffolk.



No se observaron diferencias estadísticas entre los dos tratamientos para la prueba de HOST, y al comparar éstos resultados con los obtenidos por (Boretto *et al.*, (2002) vemos que las medias para esta variable se aproximan entre sí.

Los niveles de cortisol y testosterona en el tratamiento con xilacina coinciden con lo afirmado por Damián y Ungerfeld (2011) quienes proponen que la electroeyaculación afecta a la concentración hormonal, por lo que a medida que aumenta el cortisol, la testosterona disminuye y viceversa, después de la electroeyaculación. Según Juniewicz *et al.*, (1987) el cortisol (corticoide) suprime la generación de GnRH a nivel hipotalámico y se suprime la secreción de LH a nivel pituitario según Matteri *et al.*, (1984).



CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Se obtuvo eyaculados con mayor volumen, concentración espermática y porcentaje de espermatozoides vivos, en el tratamiento con la aplicación xilacina al 2% previo a la técnica de electro eyaculación.
- El método de congelación de pajuelas fue eficaz, porque se obtuvo un porcentaje considerable de motilidad post-descongelación, ya que el número de espermatozoides que presentaban anomalías aumentó ligeramente, siendo muy similar al obtenido en fresco.
- La administración de xilacina no afectó significativamente el análisis y resultados de las características seminales cuali-cuantitativas, a excepción del porcentaje de espermatozoides vivos post-descongelación.
- En la medición de cortisol y testosterona se observó que la xilacina no disminuyó el estrés en los carneros durante la electroeyaculación.

RECOMENDACIONES

- Aplicar Xilacina al 2% anterior a la aplicación a la electroeyaculación para obtener mayor volumen, concentración espermática y porcentaje de espermatozoides vivos.
- Para un mejor efecto del tranquilizante, se debe evitar que el animal pase por estrés durante la etapa de inducción, ya que esta condición no permite una sedación óptima.
- Realizar estudios similares teniendo en cuenta factores como raza, acondicionamiento del animal a la técnica de electroeyaculación, madurez sexual y llevar un registro de fertilidad previo a la evaluación.



Bibliografía

- Álvarez, M., Tamayo-Canul, J., Martínez-Rodríguez, C., López-Urueña, E., Gomes-Alves, S., Anel, L., . . . de Paz, P. (1992). Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis). *Animal Reproduction Science* 132, 145– 154.
- Andrabi, S. (2009). Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 552–569.
- Belda, E., Laredo, F. G., Escobar, M., Agut, A., Soler, M., & Lucas, M. (2005). Agonistas α -2 adrenérgicos en sedación y anestesia veterinaria. *Aanles de Veterinaria de Murcia* 21, 23-33.
- Boretto, J., Gibbons, A., Bunge, M., Cueto, M., & Bidinost, F. (2002). Calidad seminal post-descongelamiento en relacion con la eficiencia reproductiva de la inseminacion artificial laparoscopica en ovinos. *Revista de Medicina Veterinaria, Vol 83(4)*, 185-188.
- Cameron, R. (1977). SEMEN COLLECTION AND EVALUATION IN THE RAM: The Effect of Method of Stimulation on Response to Electroejaculation. *Australian Veterinary Journal, Vol. 53*, 380-383.
- Campi, S., Blasi, C., Fischman, M., García, C., & Cisale, H. (2004). Comparación entre dos test de funcionalidad de membrana para valorar semen de verraco. *Veterinaria Argentina* 21 (206), 421-426.
- Cochran, R., Judy, J., Parker, C., & Hallford, D. (1984). Prefreezing and post-thaw semen characteristics of five ram. *Theriogenology vol 23*, 431-440.
- Córdova-Izquierdo, A., Saltijeral Oaxaca, J., Muñoz Mendoza, R., Córdova-Jiménez, S., Córdova-Jiménez, A., & Guerra Liera, E. (2006). Efecto del método de obtención de semen de ovino sobre la calidad espermática. *REDVET*, 1-4.
- 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.
- Damián, J., & Ungerfeld, R. (2011). The Stress Response of Frequently Electroejaculated Rams to Electroejaculation: Hormonal, Physiological, Biochemical, Haematological and Behavioural Parameters. *Reprod Dom Anim* 46, 646-650.
- Fumagalli. (2012). *Parámetros fisiológicos y bioquímicos durante la electroeyaculación bajo anestesia general en el venado de campo*. Uruguay: Tesis de maestría en Reproducción Animal. Obtenido de <http://mx.123dok.com/document/w7q0gxz6-parametros-fisiologicos->



durante-la-electroeyaculacion-bajo-anestesia-en-venado-de-campo-ozotoceros-bezoarticus.html

- García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Martínez-Pastor, F., Garde, J., Ramón, M., Fernández-Santos, M., . . . Soler, A. (2009). Sperm characteristics and in vitro fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: Electroejaculation and postmortem collection. *Theriogenology* 72, 160–168.
- García-Macias, V., Martínez-Pastor, F., Álvarez, M., Garde, J., Anel, E., Anel, L., & de Paz, P. (2006). Assessment of chromatin status (SCSA) in epididymal andejaculated sperm in Iberian red deer, ram and domestic dog. *Theriogenology* 66, 1921–1930.
- Gómez, M., & Migliorisi, A. (17 de 05 de 2017). *Sitio Argentino de Producción Animal*. Obtenido de Sitio Argentino de Producción Animal: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_toros/49-ProtocoloEvalSemen.pdf
- González Mesa, J., Otero Granados, E., del Valle Hoyos, M., & Rivera, M. (2013). Bloqueo simpático lumbar. *Rev Soc Esp Dolor*, 224-331.
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., & Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *Andrology*, 73-88.
- Jeyendran, Van der Ven, Perez-Pelaez, Crabo, & Zaneveld. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction & Fertility Ltd*, 219-228.
- Jiménez-Rabadán, P., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., del Olmo, E., Pérez-Guzmán, M., . . . Soler, A. (2012). Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. *Animal Reproduction Science*, 1-8.
- Juniewicz, P., Johnson, B., & Bolt, D. (1987). Effect of adrenal steroids on testosterone and luteinizing hormone secretion in the ram. *Journal of Andrology vol 8*, 190-196.
- Ledesma, A., Manes, J., Cesari, A., Alberio, R., & Hozbor, F. (2014). Electroejaculation Increases Low Molecular Weight Proteins in Seminal Plasma Modifying Sperm Quality in Corriedale Rams. *Reprod Dom Anim*, 324-332.
- Loomis, P. R. (2006). Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. *Vet Clin Equine* 22, 663–676.
- Marco-Jiménez, JS Vicente, & MP Viudes-de-Castro. (2008). Seminal Plasma Composition from Ejaculates Collected by Artificial Vagina and Electroejaculation in Guirra Ram. *Reprod Dom Anim* 43, 403 -408.



- Marco-Jiménez, Puchades, Gadea, Vicente, & Viudes-de-Castro. (2005). Effect of semen collection method on pre and post thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology* 64, 1756–1765.
- Matteri, R., Watson, J., & Moberg, G. (1984). Stress or acute adrenocorticotrophin treatment suppresses LHRH-induced LH release in the ram. *Journal of Reproduction and Fertility* 72, 385-392.
- Mattner, & Voglmay. (1962). A comparison of ram semen collected by the artificial vagina and by electro-ejaculation. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 78-81.
- Morrillo, M., Salazar, S., & Castillo, E. (2012). Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. *Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas*, 23-28.
- Mosure, W., Meyer, R., Gudmundson, J., & Barth, A. (1998). Evaluation of possible methods to reduce pain associated with electroejaculation in bulls. *Can Vet J*, 504-506.
- Muiño-Blanco, T., Pérez-Pé, R., & Cebrián-Pérez, J. (2008). Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod Dom Anim* 43, 18–31.
- Orihuela, A. (2014). La conducta sexual del carnero. Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu*, 49-89.
- Orihuela, A., Aguirre, V., Hernandez, C., Flores-Perez, I., & Vazquez, R. (2009). Effect of Anesthesia on Welfare Aspects of Hair Sheep (*Ovis aries*) During Electro-Ejaculation. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8, 305-308.
- Parraguez, V., Blank, O., Muñoz, C., & Latorre, E. (2000). Inseminación Artificial en Ovinos. *Monografías de Medicina veterinaria*, 1-11.
- Pineda, M., & Dooley. (1991). Effect of method of seminal collection on the retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of rams. *Am J Vet Res*, 307–13.
- Pineda, M., Dooley, M., Hembrough, & Hsu. (1987). Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of rams. *Am J Vet Res*, 562-8.
- Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M., & Ferreira de Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Med Vet* 46, 31-38.
- Santiani, A., Sandoval, R., Ruiz, L. F., & Coronado, L. (2004). Estudio de la integridad de membrana en espermatozoides de ovino mediante la prueba de estrés hipoosmótico. *Asociación Peruana de Producción Animal*, 1-10.
- Sumano López, H. S., & Ocampo Camberos, L. (2006). *Farmacología Veterinaria*. México: McGraw Hill Interamericana.



- Töpfer-Petersen, C., Ekhlesi-Hundrieser, M., Tsoleva, M., Leeb, T., Kirchhoff, C., & Müller, p. (2005). Structure and function of secretory proteins of the male genital tract. *Andrologia*, 202–204.
- Troedsson, M., Desvovuges, A., Alghamdi, A. S., Dahms, B., Dow, C. A., Hayna, J., . . . Buhi, W. C. (2005). Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science* 89, 171–186.
- Urrego, R., Ríos, A., Olivera Ángel, M., & Camargo, O. (2008). Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos. *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias* 21, 19-26.
- Urroz, C. (2004). *Elementos de Anatomía y Fisiología Animal*. Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia.
- Vazquez, Martinez, Martinez, P., Garcia-Artiga, & Roca. (1997). Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology* 47, 913-922.
- Western , I. (28 de 04 de 2008). *Colorado Serum Company*. Obtenido de https://ssl1001.qwestoffice.com/colorado-serum.com/merchantmanager/product_info.php?cPath=151_158&products_id=149
- Yamasaki Maza, A., Pedraza Villagómez, P., Peralta, M., Yong, G., Rothschuh Villanueva, J. E., & Yamasaki Maza, L. (2005). Diseño y construcción de electroeyaculador para ovinos y caprinos. *REDVET*, 1-23. Obtenido de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080505.html>



ANEXOS

Anexo 1.- Pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para la Normalidad de datos

Pruebas de normalidad para el tratamiento Sin Xilacina ^a

	Kolmogorov-Smirnov ^b			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
DT	,204	16	,073	,822	16	,005
CC	,462	16	,000	,546	16	,000
PESO	,282	16	,001	,806	16	,003
VOL	,334	16	,000	,644	16	,000
CONC	,219	16	,039	,873	16	,031
MM	,382	16	,000	,695	16	,000
MIP	,431	16	,000	,612	16	,000
VIVOS	,431	16	,000	,591	16	,000
ANORM	,385	16	,000	,670	16	,000
MOT2	,324	16	,000	,831	16	,007
VIVOS	,398	16	,000	,621	16	,000
ANORM	,431	16	,000	,591	16	,000
HOST	,153	16	,200 [*]	,942	16	,371
S1CA	,209	16	,061	,934	16	,281
S1CDU	,252	16	,008	,835	16	,008
S1CDES	,238	16	,016	,886	16	,049
S1TA	,149	16	,200 [*]	,867	16	,025
S1TDU	,130	16	,200 [*]	,936	16	,302
S1TDES	,236	16	,017	,799	16	,003

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. ETAPA = Sin Xilacina

b. Corrección de significación de Lilliefors

Pruebas de normalidad para el tratamiento Con Xilacina ^a

	Kolmogorov-Smirnov ^b			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
DT	,167	16	,200*	,868	16	,025
CC	,462	16	,000	,546	16	,000
PESO	,282	16	,001	,806	16	,003
VOL	,197	16	,098	,870	16	,027
CONC	,149	16	,200*	,923	16	,189
MM	,323	16	,000	,759	16	,001
MIP	,385	16	,000	,719	16	,000
VIVOS	,398	16	,000	,621	16	,000
ANORM	,492	16	,000	,484	16	,000
MOT2	,250	16	,009	,859	16	,019
VIVOS	,348	16	,000	,729	16	,000
ANORM	,431	16	,000	,591	16	,000
HOST	,073	16	,200*	,983	16	,985
S1CA	,164	16	,200*	,909	16	,111
S1CDU	,115	16	,200*	,948	16	,454
S1CDES	,168	16	,200*	,902	16	,087
S1TA	,319	16	,000	,773	16	,001
S1TDU	,190	16	,127	,841	16	,010
S1TDES	,262	16	,004	,821	16	,005

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. ETAPA = Con Xilacina

b. Corrección de significación de Lilliefors

Anexo 2.- Prueba No Paramétrica de Mann-Whitney para las mediciones previas ^a

	DT	CC	PESO
U de Mann-Whitney	124	128	128
W de Wilcoxon	260	264	264
Z	-0,156	0	0
Sig. asintótica (bilateral)	0,876	1	1
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,897 ^b	1,000 ^b	1,000 ^b

a. Variable de agrupación: tranquilizante.

b. No corregido para empates.



Anexo 3.- Prueba No Paramétrica de Mann-Whitney para el Análisis Seminal ^a

	VOL	CONC	MM	MIP1	VIVOS1	ANORM1	MIP2	VIVOS2	ANORM2	HOST
U de Mann-Whitney	0	49,5	120	113	55	107	74	109	128	122,5
W de Wilcoxon	136	185,5	256	249	191	243	210	245	264	258,5
Z	- 4,924	-2,959	- 0,348	- 0,748	-3,271	-1,006	- 2,159	-0,815	0	- 0,208
Sig. asintótica (bilateral)	0	0,003	0,728	0,455	0,001	0,314	0,031	0,415	1	0,836
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,000 ^b	,002 ^b	,780 ^b	,590 ^b	,005 ^b	,445 ^b	,043 ^b	,491 ^b	1,000 ^b	,838 ^b

- a. Variable de agrupación: tranquilizante.
b. No corregido para empates.

Anexo 4.- Prueba No Paramétrica de Mann-Whitney para el Análisis Hormonal ^a

a

	CA	CDU	CDES	TA	TDU	TDES
U de Mann-Whitney	99	101	97	117	122,5	107,5
W de Wilcoxon	235	237	233	253	258,5	243,5
Z	-1,093	-1,018	-1,168	-0,415	-0,207	-0,773
Sig. asintótica (bilateral)	0,274	0,309	0,243	0,678	0,836	0,44
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,287 ^b	,323 ^b	,254 ^b	,696 ^b	,838 ^b	,445 ^b

- a. Variable de agrupación: tranquilizante.
b. No corregido para empates.