

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

FACULTAD DE MEDICINA VETERIANARIA

UNIDAD DE POSGRADO

**“CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, SEMINALES Y  
ENDOCRINAS EN CARNEROS SOMETIDOS AL  
AISLAMIENTO ESCROTAL”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magister en Producción y Reproducción  
Animal

AUTOR

Wilfredo Huanca López

Lima – Perú

2014

# TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Lista de cuadros.....	iii
I. INTRODUCCION.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Anatomía del tracto reproductivo del macho .....	4
2.1.1 Órganos Sexuales primarios: Testículo.....	5
2.1.1.1 Desarrollo embrionario y descenso testicular.....	7
2.1.2 Órganos sexuales secundarios: Rete testis, conducto eferente, epidídimo y conducto deferente.....	8
2.1.2.1 Epidídimo.....	8
2.1.2.2 Conducto deferente.....	9
2.1.3 Glándulas sexuales accesorias.....	9
2.1.4 Pene.....	10
2.2 Evaluación del macho.....	10
2.3 Fisiología espermática.....	12

2.3.1	Espermatogenesis.....	12
2.3.1.1	Espermacitogenesis.....	13
2.3.1.2	Espermiogenesis.....	14
2.3.1.3	Espermiación.....	14
2.3.2	Maduración del espermatozoide.....	15
2.4	Regulación funcional de la espermatogenesis.....	17
2.4.1	Ciclo espermatogenico.....	17
2.4.2	Onda espermatogenica.....	17
2.5	Control neuroendocrino de la reproducción.....	18
2.5.1	Hormona Luteinizante y células de Leydig.....	19
2.5.2	Hormona Folículo estimulante y células de sertolli.....	20
2.5.3	Eficiencia de la espermatogenesis.....	21
2.5.4	Otros factores regulatorios.....	21
2.6	Características del espermatozoide.....	23
2.6.1	Morfología del espermatozoide.....	23
2.6.1.1	Cabeza .....	23
2.6.1.2	Cola o flagelo .....	23
2.6.2	Transporte de los espermatozoides.....	24
2.6.3	Características físicas del semen.....	25
2.7	Termorregulación testicular.....	26

2.8	Alteraciones de la función testicular.....	29
2.8.1	Anormalidades espermáticas.....	30
2.8.2	Factores que afectan la estructura nuclear del esperma.....	32
2.8.2.1	Compactación incorrecta de la cromatina.....	32
2.8.2.2	Defectos en el mecanismo de la apoptosis .....	32
2.8.2.3	Estrés oxidativo .....	33
2.8.3	Efecto del daño nuclear espermático sobre la fertilidad.....	33
2.9	Estudio sobre el efecto del calor en la reproducción.....	34
2.9.1	Métodos de evaluación.....	34
2.9.2	Efectos sobre el tamaño testicular y espermatogenesis.....	35
2.9.3	Cambios en la función endocrina y características semen.....	36
II.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
3.1	Lugar de desarrollo fase experimental.....	38
3.2	Animales.....	38
3.3	Diseño Experimental.....	39
3.4	Evaluaciones efectuadas.....	39
3.4.1	Evaluación de consistencia testicular.....	40
3.4.2	Colección de semen.....	40
3.4.3	Evaluación de semen.....	41
3.4.4	Determinación de hormonas: LH y Testosterona.....	41
3.5	Análisis estadístico.....	42
III.	RESULTADOS.....	43
4.1	Evaluación clínica testicular.....	43
4.2	Volumen seminal y concentración espermática.....	44
4.3	Motilidad masal y motilidad individual progresiva.....	45
4.4	Características morfológicas de los espermatozoides.....	46
4.5	Características endocrinas.....	49

4.5.1	Perfiles hormonales de Testosterona.....	49
4.5.2	Cambios de concentración de Hormona Luteinizante.....	49
IV.	DISCUSIÓN.....	51
5.1	Evaluación Clínica Testicular.....	52
5.2	Características seminales.....	53
5.3	Perfiles hormonales.....	55
V.	CONCLUSIONES .....	57
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el propósito de evaluar los cambios en las características clínicas, seminales y endocrinas en carneros con aislamiento escrotal térmico. Se utilizaron 12 animales adultos de raza Merino, distribuidos al azar en dos grupos: a) Control: n = 4 y b) Tratado: n = 8. Los animales del grupo tratado fueron sometidos a aislamiento escrotal con una bolsa de algodón cubierta con plástico para elevar la temperatura a  $39.0 \pm 0.5$  °C por 48 horas. Se registraron cambios en volumen del eyaculado, consistencia testicular, circunferencia escrotal; concentración; motilidad masal (0 - 5); motilidad individual (%); anomalías espermatozoides (%); perfiles endocrinos de testosterona y LH. Se realizó la colección de semen por electroeyaculación, tres veces por semana y para la determinación hormonal, los animales fueron canulados en la vena yugular y se tomó muestras de sangre por 6 horas a intervalos de 15 minutos. Las muestras fueron analizadas mediante radioinmunoanálisis. El periodo de evaluación fue de 35 días. Los resultados señalan cambios en la circunferencia escrotal de  $30.43 \pm 1.1$  (inicio) a  $25.00 \pm 0.5$  cm (semana 5). No se registraron cambios en volumen pero si en concentración espermática a partir de la segunda semana. En motilidad masal se registraron observaciones de valores 0 a partir de la semana 2 y  $2.45 \pm 3.1$  en motilidad individual en la semana 2. El porcentaje de anormales se incremento a  $82.3 \pm 29.3$  % en la semana 3, siendo las anomalías de cabeza sola, cola doblada y gota citoplasmática, las principales anomalías observadas. Las concentraciones de Testosterona disminuyen a partir de la semana 2 ( $280 \pm 83$  pg/ml) y se incrementan las concentraciones de LH a  $0.96 \pm 0.72$  a partir de la semana 2, con la presencia de un mayor número de pulsos de LH ( $0.92 \pm 0.33$  / 6 horas). Se concluye que la aplicación de bolsas de algodón, para incrementar la temperatura a nivel del testículo producen cambios en las características clínicas, seminales, proporción de espermatozoides normales, concentración, motilidad masal e individual y cambios en las concentraciones hormonales de Testosterona y LH, por lo que se recomienda adecuadas prácticas de manejo para evitar efectos del incremento de la temperatura a nivel escrotal y las consiguientes deficiencias en el comportamiento reproductivo de los animales machos.

Palabras claves: Carneros, aislamiento escrotal, Semen, Hormonas

## ABSTRACT

Study was carried out with the objective of evaluate changes in clinical, seminal and endocrine characteristics in rams under scrotal insulation. 12 adults merino rams were assigned to two groups: a) Control: n=4 and b) Treated: n=8. Animals of treated group were maintained under scrotal insulation with a cotton bag cover with plastic to increase the temperature to  $39.0 \pm 0.5$  °C by 48 hours. Changes in volume, testicular consistency, scrotal circumference, concentration, mass motility (0 – 5), individual motility (%), spermatozoa abnormalities (%), endocrine profiles of testosterone and LH were recorded. Semen was collected by electro ejaculation three times per week and for endocrine evaluation, blood samples were taken every 15 minutes during 6 hours. Samples were analyzed by radioimmunoassay. The period of evaluation was 35 days. Results indicate changes in the scrotal circumference from  $30.43 \pm 1.1$  (week 1) to  $25.00 \pm 0.5$  cm (week 5). Changes not were recorded in volume but if in spermatozoa concentration from week 2. In week 2, mass motility was 0 and individual motility  $2.45 \pm 3.1$  %. Abnormalities percentage was increases to  $82.3 \pm 29.3$  % on week 3 and the principal abnormalities observed were in head, tail and presence of cytoplasm droplet. Testosterone profiles decreased ( $280 \pm 83$  pg/ml) and LH increased to  $0.96 \pm 0.72$  from week 2 with the presence of a greater number of LH pulses ( $0.92 \pm 0.33$  / 6 hours). The results suggest that the use of cotton bags to increase the testicular temperature affect the clinical and seminal characteristics with changes in the normal spermatozoa, concentration, mass and individual motility and changes in the profiles of testosterone and LH and appropriate management practices are recommend to avoid effects of increased scrotal temperature and consequent impaired reproductive behavior of male animals.

Key words: Rams, scrotal insulation, sperm, hormones

## LISTA DE CUADROS

1. Cuadro 1 Evaluación de la consistencia testicular.
2. Cuadro 2 Circunferencia escrotal y consistencia testicular.
3. Cuadro 3 Volumen de semen colectado.
4. Cuadro 4 Concentración espermática (  $n \times 10^6 / ml$  )
5. Cuadro 5 Motilidad masal durante la fase experimental.
6. Cuadro 6 Motilidad progresiva individual durante la fase experimental.
7. Cuadro 7 Presencia de espermatozoides anormales (%).
8. Cuadro 8 Anormalidades espermáticas observadas en grupo control
9. Cuadro 9 Anormalidades espermáticas observadas en grupo tratado
10. Cuadro 10 Concentraciones promedio de Testosterona (pg/ml)
11. Cuadro 11 Concentraciones promedio de Hormona Luteinizante (ng/ml)



## I.INTRODUCCIÓN

La reproducción es uno de los eventos esenciales de los seres vivos que permite producir una descendencia, asegurando la permanencia de la especie. Igualmente representa un evento clave en el contexto de la producción animal por su influencia en el logro de los parámetros óptimos de cada especie. La reproducción como evento global, depende del macho y hembra de cada especie, quienes son los encargados de aportar los gametos necesarios para que ocurra la fertilización y el posterior desarrollo embrionario.

Existen diversos factores que afectan el óptimo comportamiento reproductivo de las especies; entre ellas se puede mencionar los factores nutricionales, genéticos, sanidad y los medioambientales. Los tres primeros pueden ser controlados por el hombre; sin embargo, el último factor no siempre puede estar bajo control humano, limitándose a diseñar alternativas tendientes a mejorar las condiciones de alojamiento de los animales.

El factor ambiental desempeña un rol fundamental en la eficiencia reproductiva de los animales y también en el ser humano. Entre los efectos que el calor produce a nivel celular y molecular, se menciona al estrés térmico, el cual contribuye al incremento en la producción de radicales libres de oxígeno (Ikeda *et al.*,1999). Cuando este incremento supera la capacidad de ser eliminados por el organismo, se produce una situación de estrés oxidativo que produce

una serie de modificaciones en los componentes lípidos, proteínas y el ADN espermático (Wells *et al.*, 1997), con las consiguientes efectos negativos en la capacidad fecundante.

Los procesos reproductivos en mamíferos son muy sensibles a los efectos de la hipertermia en ambos sexos, ocurriendo como una consecuencia de gran importancia la reducción en la cantidad y calidad de los espermatozoides en el macho y la disminución de la fertilidad de las hembras (Ozawa *et al.*, 2004; Banks *et al.*, 2005; Yaeram *et al.*, 2006), por lo que en épocas de intenso calor, se observa una menor fertilidad de los machos.

En los machos, la fisiología propia de los animales ha permitido que los órganos primarios de la reproducción, como los testículos, puedan ser regulados acorde a los cambios climáticos (Arthur *et al.*, 1996). El escroto y el sistema vascular a nivel testicular desempeñan una función importante como elemento termorregulador (Setchell *et al.*, 1994). Sin embargo, condiciones de manejo de los animales puede afectar la función termorreguladora de los testículos y una disminución de la capacidad reproductiva del macho. Los efectos adversos de elevada temperatura sobre la función del testículo de los mamíferos, ha sido reconocida e incluso se señala que incrementos moderados de temperatura pueden afectar el proceso de la espermatogénesis (Blackshaw, 1977).

Los efectos de una temperatura medioambiental elevada, calentamiento local del escroto y criptoquidismo sobre la espermatogénesis son conocidos y han sido reportados por diversos autores (Van Demark y Free, 1970; Blackshaw, 1977). Sin embargo, los efectos de los cambios debido al calor, van a ser dependientes de la duración y grado de elevación de la temperatura, mientras que el proceso de regeneración testicular va a ser dependiente de la intensidad del efecto térmico (Galloway, 1997).

La elevación de la temperatura produce cambios a nivel de los espacios intersticiales del testículo y origina cambios en los niveles de Testosterona y LH (Byers y Glover, 1984). Si bien existen reportes sobre los diversos efectos del aislamiento escrotal en carneros, estos varían en el grado de la respuesta.

El presente trabajo está orientado a determinar las variaciones en las características clínicas, seminales y endocrinas a nivel testicular, en carneros sometidos a efecto térmico a nivel testicular.

## II.- REVISIÓN DE LITERATURA

La reproducción en el macho es un proceso complejo e integrado, dependiente de la interacción de secreciones endocrinas y nerviosas entre el Sistema Nervioso Central, hipotálamo, hipófisis y testículo. Los testículos, al igual que los ovarios, producen y liberan células germinales y sintetizan hormonas esteroideas y peptídicas. A diferencia de las ovejas, los carneros no presentan un periodo durante el cual su sistema reproductivo es completamente inactivo. Sin embargo, los cambios en la duración de los días afecta la actividad sexual de los carneros, con un incremento en el tamaño testicular, niveles de testosterona, producción espermática y libido con los días de menor luminosidad.

### 2.1. Anatomía del tracto reproductivo del macho

El tracto reproductivo del macho está conformado por diferentes componentes entre los que podemos señalar a los órganos sexuales primarios, representado por un par de gónadas o testículos; los órganos sexuales secundarios, conformado por un sistema de conductos que se continúan a partir de la red testicular (rete testis), los conductos eferentes, epidídimos y conductos deferentes; y finalmente se incluyen las glándulas sexuales accesorias, que en el caso del carnero está conformado por el Ámpula, Próstata, vesículas seminales, glándulas bulbouretrales o de Cowper (Brito *et al.*, 2002), componentes responsables de cumplir con una determinada función, como la secreción de la fracción líquida o plasma seminal, que contribuye al transporte y proporcionar nutrientes a los espermatozoides y finalmente el pene como órgano copulador.

### 2.1.1 Órganos sexuales primarios: testículos

Los testículos son órganos pares, generalmente asimétricos, de forma ovalada, situados en la región inguinal y alojados en un divertículo proveniente de una prolongación abdominal, las bolsas escrotales y en el caso del ovino tiene una estructura pendulosa y un cuello elongado (Arthur, 1996). Se encuentran revestidas por una túnica fibrosa que les sirve de protección y garantiza la adecuada función espermatogénica. El tamaño de los testículos corresponde aproximadamente al 1 % del peso vivo de los animales y su tamaño se incrementa después que los animales llegan a la pubertad y al inicio de cada estación de empadre (Setchell, 1978) y en el ovino, los testículos presentan un diámetro testicular superior a los 30 cm y un peso superior a los 550 gramos (Senger, 2003).

Los testículos están formados por un parénquima rodeado por la *túnica albugínea*, de consistencia fibrosa y conformada por tres capas: a) una capa externa procedente del peritoneo visceral, la túnica vaginal; b) una capa intermedia o capa albugínea propiamente dicha y c) una capa interna o túnica vasculosa (Setchell, 1994). La túnica albugínea está conformada por fibroblastos, colágenos y células mioepiteliales y la actividad contráctil que presenta parece ser de origen miogénico (Campos *et al.*, 1990).

La *túnica vaginal* penetra en el parénquima para dividirlo en lóbulos, los contienen internamente a los túbulos seminíferos. Los túbulos seminíferos presentan un patrón irregular de circunvoluciones pero sus dos extremos forman un solo conducto, que termina en una serie de canales o *rete testis*. Estos túbulos están formados por un epitelio poliestratificado con una luz central. En el epitelio se encuentran dos tipos celulares, las células germinales en diferentes estadios de maduración y las células de *Sertoli* (Setchell, 1994).

Las contracciones musculares de la túnica son importantes para el transporte de los espermatozoides desde el testículo hacia el epidídimo (Ellis *et al.*, 1978) y tienen relación con la temperatura a nivel testicular, alcanzando su máxima contracción a una temperatura de 32 °C y se inhiben a mayor temperatura (Davis y Horowitz, 1979). Estas contracciones se producen en respuesta a la acción de la acetilcolina, adrenalina, noradrenalina y prostaglandina F<sub>1</sub> y a la estimulación nerviosa (David y Langford, 1969; David y Langford, 1971).

El túbulo seminífero es una estructura tubular contorneada, que está rodeada por una lámina basal, la cual está conformada por una membrana basal gruesa y dos tipos celulares. En las especies domesticas mayores como los carneros, se encuentra más de una capa de células en la lámina basal. Las más cercanas al epitelio seminífero son células mioides pero no forman una capa continua y en una sección mas periférica se encuentras células similares a fibroblastos, la cual conforme se produce envejecimiento, ocurre un proceso de fibrosis que aumenta el espesor de esta lamina basal (Finocchiaro *et al.*, 2005).

La producción de espermatozoides se realiza a nivel de los túbulos seminíferos, migran a los conductos eferentes y de allí al epidídimo, donde complementan su desarrollo y de aquí al conducto deferente que presenta una dilatación o ampolla localizada próxima a la glándula prostática.

Las células de *Sertoli* son de gran tamaño y están adheridas a la capa interna de la membrana basal, desde donde se extienden hacia la luz del túbulo. Su citoplasma forma prolongaciones que rodean las células germinales. Entre las células de *Sertoli* existen unas uniones estrechas, formando la barrera hematotesticular. La barrera formada permite dividir el epitelio germinal en un compartimento basal y otro adluminal, aislando a las células germinales y evitando que se difundan auto antígenos, desde el interior del túbulo a los vasos sanguíneos. En el tejido intersticial se encuentran las células de *Leydig*, fibroblastos, macrófagos, vasos sanguíneos y vasos linfáticos.

El tejido intersticial ocupa los espacios entre los túbulos seminíferos y contiene los vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nerviosos del parénquima testicular (Finocchiaro *et al.*, 2005). Asimismo, se encuentran las células de Leydig, productoras de la hormona testosterona y un apreciable número de células mastocitas y macrófagos (Setchell, 1977)

El tamaño del tejido intersticial varía entre especies y en el carnero representa un 15 % del parénquima testicular y las células de Leydig representan más o menos el 8 % del parénquima y alrededor del  $30 \times 10^6$  células de Leydig / gr. de tejido (Nowakowski y Cwikla, 1994)

#### **2.1.1.1 Desarrollo embrionario y descenso testicular**

Las gónadas desarrollan a partir de la estratificación del epitelio celómico, el botón urogenital, en la zona medial del mesonefro. Las células primordiales son identificadas primariamente en el endodermo del saco vitelino y se inicia en los estadios iniciales del desarrollo embrionario (Setchell, 1978). El primer signo de la diferenciación del macho es la degeneración del conducto de Muller adyacente a los testículos. Después de este evento ocurre la transformación del conducto de Wolf en el sistema eyaculatorio del macho. La porción del conducto de Wolf adyacente al testículo se transforma en el epidídimo (George y Wilson, 1994). El desarrollo posterior del Conducto de Wolf es dependiente de la producción de andrógenos por el testículo

En la mayoría de los mamíferos, los testículos van a migrar desde su sitio original y pasan a través de la pared intestinal hacia una invaginación del peritoneo para formar el escroto. En el caso del carnero, los testículos se encuentran presentes en el escroto al momento del nacimiento y el descenso se produce a la mitad de la gestación (Arthur, 1996).

Los testículos están formados por los túbulos seminíferos y el tejido intersticial; en el primero se realiza la formación de los espermatozoides a partir de las células germinales. En el carnero, el diámetro de los túbulos seminíferos es de 200 - 300 micras y el largo de los túbulos es de casi 3000 metros, con cerca de 11 metros/gramo de parénquima testicular y un área basal de 85 cm cuadrados/ gr. (Setchell, 2006). El largo de los túbulos seminíferos decrece con la edad, en forma similar como disminuye el peso testicular.

### **2.1.2. Órganos sexuales secundarios: rete testis, conducto eferente, epidídimo y conductos deferentes**

Los túbulos seminíferos presentan formas onduladas y tienen dos puntos terminales, cada una de las terminaciones van a desembocar en el rete testis, el cual es una complicada red de canales intercomunicados y está formada por diferentes células en forma de columnas, cuboides y escamosas, con presencia de linfocitos y macrófagos (Setchell, 2006). El rete testis se une al epidídimo por medio del conducto aferente. La posición y dimensiones del conducto dependen de las relaciones entre el testículo y el epidídimo.

#### **2.1.2.1. Epidídimo**

El epidídimo es un conducto simple y presenta grandes ondulaciones y está muy ligado a la superficie del testículo, extendiéndose desde la parte anterior a posterior del testículo. El epidídimo es dividido en tres segmentos denominados cabeza, cuerpo y cola del epidídimo; otra división, basada en criterios histológicos y funcionales ha sido propuesta por (Glover y Nicander, 1971) dividiendo el epidídimo en tres regiones: segmento inicial, medio y terminal, coincidiendo las dos primeras regiones con la zona donde se produce la maduración del espermatozoide y la última con el almacenamiento de los espermatozoides antes de la eyaculación. Las descripciones histológicas dividen el epidídimo entre 6 a 12 zonas histológicas diferentes, el epitelio es complejo y contiene una variedad de tipos de células (Setchell, 1994).



### 2.1.2.2 Conducto deferente

El conducto deferente es una continuación del epidídimo y se inicia donde el epidídimo toma una dirección contraria al canal inguinal. El conducto deferente no debe ser considerado como un simple conducto transportador de espermatozoides desde el epidídimo hasta la uretra, debido a que está formado por un epitelio complejo que tiene funciones absorbentes y secretorias (Setchell, 1994 )

### 2.1.3. Glándulas sexuales accesorias

Se localizan en torno a la uretra pélvica donde vierten sus secreciones en el momento de la eyaculación. Todas las glándulas accesorias son tubulares y están ramificadas con músculo liso abundante en el tejido intersticial. Encontramos, dependiendo de la especie: glándulas vesicales, próstata, glándulas bulbouretrales y las glándulas uretrales o parauretrales.

El desarrollo y función de estas glándulas se encuentra bajo el control de la testosterona. Su secreción aporta la mayor parte del volumen del eyaculado y asegura el substrato idóneo para el metabolismo y la motilidad espermática. En fin, es un medio de suspensión espermática.

Las *glándulas vesicales o vesiculares*, desembocan en el conducto eyaculador. No existen ni en el perro ni en el gato y están muy desarrolladas en los équidos. Su secreción actúa como sistema tampón para evitar los cambios del pH. El principal componente es la fructosa la cual sirve como fuente de energía a los espermatozoides.

La *próstata* elabora la proteína antiglutinina que previene la aglutinación de los espermatozoides y en algunas especies produce prostaglandinas para favorecer las contracciones uterinas.

Las *glándulas bulbouretrales* o *de Cowper* secretan mucina y aportan el componente gelatinoso al eyaculado siendo de especial relevancia en el verraco.

#### **2.1.4. Pene**

Es el órgano copulador, encargado de depositar el semen en el aparato genital femenino. Para ello posee un tejido eréctil que garantiza la turgencia o erección necesaria para la cópula y eyaculación. El tejido eréctil está formado por los cuerpos esponjosos y cavernosos y según el predominio de uno u otro se clasifican en penes fibroelásticos (toro, carnero y verraco) y vasculares (caballo y perro).

## **2.2 Evaluación del macho**

La Fertilidad en los carneros es un factor importante para determinar la tasa de preñez en las ovejas (Kastelic *et al.*, 1995). Una práctica común en algunos países consiste en examinar la fertilidad de los carneros antes de la venta o al comienzo del periodo reproductivo (Kastelic *et al.*, 1995). Los métodos de evaluación consisten en un examen de los órganos reproductivos, especialmente los testículos, tomando muestras de semen y examinándolas al microscopio, empleando una combinación de examen clínico del semen y los testículos.

Los carneros presentan un patrón cíclico de desarrollo y regresión testicular, asociado con la concentración de testosterona, influenciado por los cambios en los regímenes de luz (Ibrahim 1997; Howles *et al.*, 1982; Lindsay *et al.*, 1984). Los cambios bruscos de días largos a días cortos induce una sucesión de respuestas en el sistema reproductivo, incrementando los niveles de la hormona luteinizante (LH) y testosterona en carneros activos (Schanbacher y Lunstra, 1976), en tanto que en los carneros en descanso los niveles son bajos

(Fuentes *et al.*, 1997). Numerosos estudios sobre el efecto de estacionalidad señalan que el fotoperiodo influye sobre los niveles de LH y hormona folículo estimulante (FSH), seguido casi inmediatamente de los niveles de testosterona, el crecimiento testicular y la concentración del semen (Sanford *et al.*, 1984; Langford *et al.*, 1987; Pérez *et al.* 1998; Gallegos *et al.*, 1998). Los días cortos mantienen la función testicular, incrementando el volumen del epidídimo y la calidad del semen (Lincoln y Davidson, 1977; Langford *et al.*, 1989).

En el carnero el tamaño testicular está asociado a la concentración de testosterona (Howles *et al.*, 1980; Dufour *et al.*, 1984; Pérez *et al.*, 1997) y los niveles de LH (Carr y Land, 1975; Land y Carr, 1975; Martin *et al.*, 1994), presentando una alta correlación con la libido, la capacidad de servicio, el volumen y la concentración del semen (Mickelsen *et al.*, 1982; Simplicio *et al.*, 1982). Con el tamaño testicular se puede tener una estimación favorable de la calidad del semen y la producción espermática a temprana edad (Rege *et al.*, 2000). Abdou *et al.*, (1978) encontraron una correlación entre el testículo, epidídimo y concentración espermática, concluyeron que fue esencialmente lineal y altamente significativo.

El examen físico de los testículos es muy importante porque permite reconocer al menos anomalías del tracto reproductivo (MacLaren, 1988) y además, considerando que el rendimiento espermático es proporcional al tamaño testicular, permite realizar una buena estimación de la producción de semen mediante la medición del tamaño testicular. Knight (1972) estimó que el semen producido está sobre una proporción de 20 millones de espermatozoides por gramo de testículo por día; en trabajos posteriores se ha demostrado que la medida de volumen, circunferencia y diámetro testicular puede dar igualmente buenas medidas de la producción de semen (Knight, 1972).

## 2.3 Fisiología espermática

La fertilidad del macho depende de la continua y diaria producción de millones de espermatozoides por el testículo, el cual para cumplir con dicho requerimiento depende de dos funciones: a) Exocrina y b) Endocrina. La Función exocrina testicular comprende la formación, almacenamiento y expulsión de los espermatozoides a partir de las espermatogonias, proceso denominado *espermatogénesis*. La función endocrina está relacionada con la producción de hormonas, responsables de regular la producción de los gametos.

### 2.3.1 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso bastante complejo por el que células germinales inmaduras experimentan los procesos de división, diferenciación y meiosis para dar paso a espermátides elongadas, haploides y altamente especializadas; mediante una serie de divisiones mitóticas y meióticas, elaborados pasos cito-diferenciales, e interacciones intercelulares constantemente cambiantes, todo esto supervisado por una interacción de factores autocrinos, paracrinos y endocrinos (McLachlan *et al.*, 1995). La espermatogénesis ocurre dentro de los túbulos seminíferos de los testículos, en asociación con las células somáticas del epitelio seminífero, las células de Sertolli (McLachlan *et al.*, 1995).

El proceso de la espermatogénesis en el carnero es similar al de todos los mamíferos y puede ser dividida en una fase inicial o proliferativa, durante la cual se determina el número de espermatozoides a producirse. Las espermatogonias primordiales se dividen en dos células, una se mantiene como célula de reserva y la otra,  $A_0$  ingresa al proceso de la espermatogénesis (Setchell, 1994), en sucesivas mitosis en  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $B_1$ ,  $B_2$ , cuando cesa la división, en la fase de pre-leptoteno del espermatocito primario.

Se pueden diferenciar tres etapas en este proceso: espermacitogénesis, espermiogénesis y espermiación.

### **2.3.1.1 Espermatocitogénesis**

Durante el desarrollo embrionario, las células germinales primordiales migran desde la región del saco vitelino del embrión hacia las gónadas no diferenciadas; allí se dividen muchas veces formando los gonocitos, iniciándose la fase de espermacitogénesis (Garner y Hafez, 2000). Los gonocitos se diferencian antes de la pubertad formando las espermatogonias tipo AO, que dan origen a las otras células germinales (Garner y Hafez, 2000). Las divisiones de las espermatogonias “madres” no ocurren al mismo tiempo, sino al contrario, cada una comienza una propia nueva onda de divisiones a intervalos regulares de tiempo, es así que al comenzar nuevos ciclos, siempre existirá un abastecimiento continuo de espermatoцитos (Coy, 1995).

Las células germinales más inmaduras, los espermatogonios, incluyen los tipos A (clasificados de A1 hasta A4), intermedios (tipo In), y tipos B, éstos últimos son los involucrados en la diferenciación de la meiosis. En todos los mamíferos, ambos tipos de espermatogonios A y B experimentan una serie de divisiones mitóticas para producir un gran número de células germinales listas para entrar en meiosis (McLachlan *et al.*, 1995). El tamaño de esta población es probablemente controlado por un balance de eventos proliferativos y anti-apoptóticos y es influenciado por factores endocrinos (McLachlan *et al.*, 1995); y es así que el tamaño de la población de espermatogonios se convierte en un factor determinante del número eventual de espermatozoides producidos (Garner y Hafez, 2000).

Los espermatogonios tipo B se dividen para formar los espermatoцитos primarios, los cuales duplican su ADN y experimentan cambios nucleares progresivos propios de la profase meiótica (proleptoteno, leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno) (Garner y Hafez, 2000). En la fase del pre-leptoteno, el ADN es replicado; mientras que, el emparejamiento de los cromosomas homólogos ocurre en la fase del cigoteno, resultando en células con

cromosomas completamente pareados que son llamados espermatocitos del paquitenio; a lo que sigue una breve fase de diploteno en donde los pares de cromosomas se separan parcialmente. Las células atraviesan la primera división para dar paso a los espermatocitos secundarios. Sin una síntesis posterior de ADN, los espermatocitos secundarios resultantes se dividen una vez más para formar las células haploides conocidas como espermátides (Garner y Hafez, 2000). El proceso divisional completo de la espermatogénesis, desde espermatogonios hasta espermátides, requiere unos 45 días en el toro (Garner y Hafez, 2000).

#### **2.3.1.2 Espermiogénesis**

La espermiogénesis es el proceso por el que las espermátides redondas haploides se transforman, sin más divisiones de ADN, en las espermátides elongadas a través de una serie de complejos pasos de cito diferenciación. Las diversas etapas de la transformación de las espermátides se dividen en cuatro fases: Golgi, encasquetamiento, acrosómica y de maduración (Garner y Hafez, 2000). En la fase de maduración, se da la transformación final de las espermátides alargadas en células que podrán ser liberadas en la luz del túbulo seminífero; estos cambios incluyen la condensación de la cromatina continua y la constitución de las protaminas, las que llenan de manera uniforme todo el núcleo espermático, asimismo, la formación alrededor del axonema de una vaina fibrosa y las nueve fibras gruesas subyacentes y la constitución de la vaina mitocondrial (Garner y Hafez, 2000).

#### **2.3.1.3 Espermiación**

Finalmente, la espermiación es la última fase de la espermatogénesis. Ésta involucra la eliminación del citoplasma sobrante del espermátide para dar paso al espermatozoide lineal (O'Donnell *et al.*, 2006), dicha eliminación está a cargo de las células de Sertoli, las que además deben eliminar cantidades considerables de células germinales degeneradas debido a que el proceso espermatogénico es relativamente ineficiente (Garner y Hafez, 2002). En esta

fase, también se da la retracción de las células de Sertoli lejos de las espermátides, y, posteriormente, la liberación de los espermátides maduros en el lumen tubular. Los espermatozoides recién formados no son móviles y no pueden fecundar al ovocito, sólo después de la maduración en el conducto epididimario adquieren la motilidad progresiva (Garner y Hafez, 2000).

### **2.3.2 Maduración del espermatozoide**

Los espermatozoides son liberados en la luz de los túbulos seminíferos en forma de espermatozoides inmaduros e inmóviles, por lo que para el tránsito hacia el interior del epidídimo es auxiliado por secreciones procedentes de la red testicular (células de Sertoli), por los elementos contráctiles de los testículos y por los cilios que revisten los conductos eferentes. Una vez en el epidídimo, el transporte de los espermatozoides depende de contracciones localizadas de la pared de dicho conducto a una frecuencia aproximada de tres por minuto. Esta espontánea actividad muscular aumenta por las fibras nerviosas adrenérgicas, y colinérgicas con angiotensina, vasopresina y oxitocina sanguínea. Los espermatozoides son transportados por el epidídimo en unos siete días en el toro, doce en el verraco y dieciséis en el carnero (Garner y Hafez, 2000).

Durante el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo, dichas células experimentan el proceso de maduración, en el que adquieren la capacidad potencial de fecundar óvulos. La modificación de los espermatozoides para lograr la maduración requiere enzimas son secretadas del epitelio del epidídimo en el fluido luminal (Amann *et al.*, 1981). Los cambios en el esperma asociados a la maduración se relacionan a las cuatro siguientes áreas: a) modificación del complejo proteína-ADN del núcleo para minimizar la probabilidad de daño ambiental o degradación prematura, b) modificación de la membrana plasmática, mitocondria, y componentes fibrosos y microtubulares de las piezas media y principal para permitir la transducción de energía por contracciones coordinadas para contracciones coordinadas de la cola y motilidad, c) desarrollo de las características de la superficie para

permitir una sobrevivencia prolongada dentro del tracto reproductivo de la hembra, y d) estabilización de las membranas plasmáticas y acrosómicas y desarrollo de múltiples proteínas aglutinantes para unirse con los receptores del óvulo (Amann *et al.*, 1981).

El proceso de maduración incluye cambios funcionales como el desarrollo del potencial para la motilidad sostenida y la maduración de organelos celulares (Garner y Hafez, 2000). Este desarrollo de la capacidad de motilidad espermática refleja cambios en los patrones metabólicos del aparato flagelar. Los espermatozoides epididimarios maduros son relativamente inactivos dentro del epidídimo, debido al Factor de inmovilidad en el toro, lo que prolonga la supervivencia de los espermatozoides impidiendo un metabolismo innecesario (Garner y Hafez, 2000). Asimismo, a medida que los espermatozoides van progresando a través del epidídimo, su metabolismo cambia gradualmente de un metabolismo oxidativo (aerobio) a uno glicolítico (anaerobio), ahorrando así energía (Coy, 1995). Incluso, la membrana del acrosoma es revestida de colesterol, sustancia contenida en grandes cantidades en las vesículas flotantes presentes en los túbulos seminíferos, fortaleciéndola e impidiendo la liberación de sus enzimas (Guyton y Hall, 2000).

Los espermatozoides ya maduros siguen su tránsito hasta llegar a la cola del epidídimo. El almacenamiento y el mantenimiento de los espermatozoides fértiles es el rol primario de la cola del epidídimo, llegando a contener el 70% de la cantidad total de gametos presentes en el epidídimo y conducto deferente, mientras que éste último contiene sólo el 2% (Garner y Hafez, 2000). Los dos mecanismos primarios para el almacenamiento de esperma son: a) fortaleciendo el estado de latencia metabólica, mediante la gran concentración de espermatozoides, la secreción de viscosas mucoproteínas que restringen el movimiento espermático, y la constante producción de ácidos para mantener el pH espermático intracelular bajo; y, b) previniendo la activación espermática prematura, con la protección de la membrana espermática mediante la secreción de factores decapacitantes (Baker *et al.*, 2005)



Mientras que los espermatozoides presentes en los testículos o en la cabeza del epidídimo son inmóviles e inmaduros, los que alcanzan la cola son generalmente móviles, maduros y capaces de fertilizar (Guerrero, 2006), sin embargo, cuando dichos espermatozoides abandonan el epidídimo, su actividad es frenada por múltiples factores que son secretados por los conductos genitales del macho, por tanto, inmediatamente después de su expulsión en el semen, son incapaces de fecundar el ovocito (Guyton y Hall, 2000).

## **2.4. Regulación Funcional de la espermatogénesis**

### **2.4.1 Ciclo espermatogénico**

La espermatogénesis está organizada en diferentes estadios celulares, las cuales se observan histológicamente en secciones transversales de los túbulos seminíferos. Al realizar un corte se puede observar el estadio celular quince, conjuntamente con el estadio siete de espermátide, espermatozocito primario en fases B<sub>2</sub> y A<sub>1</sub> (Setchell, 1994 ; Sharpe, 1994). Estas asociaciones celulares son conocidas como ciclos espermatogénicos y que en caso del carnero se van a repetir cada 10 días y se requieren aproximadamente 5 ciclos para completar la espermatogénesis, haciendo un total de 49 días de duración del ciclo (Ortavant *et al.*, 1988, Sharpe, 1994)

### **2.4.2 Onda espermática**

En secciones histológicas que se realizan a lo largo del tubo, se pueden observar asociaciones celulares idénticas y que se suceden en grado de madurez. Cada serie espacial de segmentos es llamada onda espermatogénica; sin embargo, en algunos sitios del túbulo, la onda espermática puede invertir su orden (Setchell, 1987; Ortavant, 1988).

## 2.5 Control Neuroendocrino de la Reproducción

En el carnero, como en los machos de los mamíferos, el eje inicial del control neuroendocrino es el hipotálamo, mediante la secreción pulsátil de GnRH, la cual es transportada por el sistema portal-hipofisiario hacia la hipófisis anterior para estimular la síntesis y secreción de las gonadotropinas LH y FSH (Ronchi, 2001).

La estructura que desempeña un rol importante son las neuronas situadas en el área pre-óptica del hipotálamo y que sintetizan la Hormona Liberadora de las Gonadotropinas (GnRH). Estas neuronas no se disponen en grupos compactos sino que forman estructuras reticulares (Sanford *et al.*, 1990). Las neuronas emiten proyecciones axonales y la más importante se dirige a la adenohipofisis, terminando en la porción más externa de la eminencia media del hipotálamo (Bielli, 2002).

La GnRH llega a la adenohipofisis donde estimula la producción de la Hormona Luteinizante (LH), cuyas concentraciones mantienen variaciones pulsátiles directamente relacionadas con la secreción de GnRH en la sangre del sistema porta-hipotálamo-hipofisiario, liberando también la Hormona Folículo Estimulante (FSH), cuyas concentraciones en sangre son más o menos constantes (Bielli, 2002) y parecen estar reguladas por un mecanismo dual (Werenko *et al.*, 1994). De este modo se señala que tanto la LH y la FSH regulan la producción de gametos y de hormonas testiculares, producidas por dos tipos principales de células: Células de Leydig y la célula de Sertoli.

Los ovinos son especies estacionales, por lo que la sensibilidad del eje hipotalámico - hipofisiario - gonadal está regulada por la luz, incrementando la sensibilidad a las hormonas androgénicas y la consiguiente disminución de la secreción pulsátil de la LH y FSH (Thatcher y Hansen, 1993; Sanford, 1990). Asimismo, la melatonina, secretada por la glándula pineal, juega un rol

importante en regular los efectos del cambio del fotoperiodo y estimular a las neuronas productoras de GnRH (Lincoln, 1990). Posiblemente, existe un efecto de la prolactina en la estacionalidad reproductiva de los carneros (Setchell *et al.*, 1994).

### **2.5.1 Hormona Luteinizante y Células de Leydig**

Las células de Leydig o intersticiales se encuentran fuera del túbulo seminífero en el intersticio testicular. La principal función es producir testosterona, importante para el mantenimiento de la espermatogénesis. La producción de testosterona es controlada por la LH, la que se une a los receptores de membrana de las células de Leydig y activa su cAMP. Este evento activa las proteinquinasa que catalizan la fosforilación de proteínas intracelulares y la metabolización de precursores de los esteroides, fundamentalmente por medio de la conversión de colesterol a pregnenolona. Si no se produce LH se detiene la producción de testosterona y a una gran reducción en el tamaño de las células de Leydig (Courot y Ortavant, 1981).

El sistema de retroalimentación negativa es muy sensible entre la LH y la testosterona. Los aumentos en la concentración de LH son seguidos por un aumento en la secreción de testosterona (Austin y Short, 1984), unos 30 – 60 minutos después del aumento de la LH y se prolonga por varias horas, dependiente de la especie, para luego ocurrir una inhibición de la secreción de LH por retroalimentación negativa a partir del aumento de testosterona y que produce una disminución en la síntesis de testosterona.

La testosterona producida por las células de Leydig llega hasta el túbulo seminífero por difusión simple y difusión facilitada y son necesarias para que exista una adecuada espermatogénesis, especialmente en lo referente a la fase de la meiosis (Rhim *et al.*, 1993). De otro lado, su circulación periférica es importante para la libido, actividad secretoria de los órganos sexuales secundarios y características secundarias del fenotipo del macho (Bielli, 2002).

La testosterona es una hormona que estimula la supervivencia de las células germinales y estudios señalan que la apoptosis de las células germinales ocurre después de una caída en los niveles de testosterona (Bielli, 2002). La presencia continua de LH es necesaria para que la actividad de espermatogénesis se desarrolle en forma normal.

### **2.5.2 Hormona FSH y Células de Sertoli.**

Las células de Sertoli son el órgano blanco para la FSH y testosterona, presenta receptores de membrana para la FSH (Griswold, 1993) y receptores a nivel del núcleo para la testosterona (Sar *et al.*, 1993). La FSH induce a la célula de Sertoli a producir una proteína ligadora de andrógeno (ABP), que es secretada en los espacios intercelulares del epitelio seminífero y en la luz del túbulo seminífero. Las evidencias sugieren que la ABP contribuye a mantener altas concentraciones de andrógenos en los túbulos seminíferos, que son de gran importancia para el desarrollo normal de la espermatogénesis así como para la actividad general de las células de Sertoli (Bielli, 2002).

Las células de Sertoli producen Inhibina, hormona proteica que tiene un efecto supresor de la secreción de FSH, probablemente por un efecto directo a nivel de las células de la hipófisis. Existen pocos reportes sobre su mecanismo de acción (Bielli, 2002). La FSH es necesaria para iniciar la espermatogénesis pero una vez que esta se inicia con la pubertad, la FSH parece no ser esencial para mantener la espermatogénesis, salvo cuando se detiene por razones fisiológicas, como el efecto inhibitorio del fotoperíodo, donde si resulta necesario para reiniciar la espermatogénesis.

Cada célula de Sertoli va a promover la producción de un determinado número de células germinales para su desarrollo hasta espermatozoide; en consecuencia, el número de células de Sertoli presentes en el testículo, determina teóricamente la máxima producción de espermatozoides. La replicación de las células de Sertoli ocurre en la vida fetal y en el caso del

carnero va a extenderse probablemente hasta las 6 ° a 10° semana pos natal. (Bielli, 2002)

La regulación del número de células de Sertolli parece ser el factor determinante de las diferencias en tamaño testicular entre especies, entre razas de una misma especie y entre individuos de una misma raza. En el caso de carneros, el número de células de Sertolli permanece constante durante la época de monta y en la época de no monta (Sharpe, 1994).

### **2.5.3 Eficiencia de la espermatogenesis**

Aún cuando las células de Sertolli es el factor clave en la determinación de la producción máxima de espermatozoides, otro factor clave es la eficiencia de la espermatogénesis, la cual puede ser estimada en base a la producción diaria de espermatozoides por gramo de testículo (DSP) (Amann, 1981) o por la relación espermátida elongada: células de Sertolli (Pendersen y Bur, 1994). Si comparamos estos factores de estimación encontramos que en el carnero la DSP es de 21 ( $10^6/g$ ) comparada con 13 en el toro y 4.4 en el hombre (Sharpe, 1994 ).

### **2.5.4 Otros factores hormonales y control paracrino de la espermatogenesis**

Además de la LH y FSH, otras hormonas deben influir en la espermatogenesis. Se ha reportado que la Prolactina estimula la espermatogenesis mediante un incremento de los receptores para la LH en las células de Leydig (Sharpe, 1994). En carneros, la prolactina parece tener un papel importante en el periodo de recuperación de las células de Leydig, antes del inicio de la temporada reproductiva, estimulando el desarrollo de la capacidad de estas células para responder al mayor estímulo de la LH (Bielli, 2002).

De otro lado, se ha comprobado la existencia de una serie de factores locales que influyen entre las células testiculares vinculadas directa o indirectamente

con la espermatogénesis (Maddocks *et al.*, 1995). Estos factores, mediados por parahormonas y metabolitos de vida media corta y de actividad local, determinan la existencia de microambientes metabólicamente distintos según el estadio del ciclo seminífero en que se encuentra el tejido testicular. Se tiene que el número de receptores de FSH en las células de Sertoli varía según el estadio del ciclo y que las células de Leydig varían su volumen citoplasmático según el estadio en que se encuentren las porciones de túbulo seminífero cercano a ellas (Sinha y Swerdloff, 1999).

Aun cuando la espermatogénesis asegura la producción de espermatozoides, hay que considerar que no solo es importante que produzca espermatozoides normales sino que los produzca en cantidad adecuada. El tamaño testicular de un macho es dependiente del número de células de Sertoli que contenga. Cada célula de Sertoli apoya metabólicamente a un número limitado de células germinales para que completen su diferenciación en espermatozoides y se considera que cada célula de Sertoli ofrece un nicho para las células germinales, con un microambiente adecuado (Bielli, 2002), por lo que el número de espermatogonias de un animal depende del número de células de Sertoli que contenga dicho individuo. Si además se considera que se produce muerte de las células germinales y que ocurre en distintas fases del desarrollo de las células germinales, la producción de espermatozoides será menor al máximo teórico de cada especie (Sharpe, 1994).

Existen otros factores que pueden inhibir la espermatogénesis y uno de ellos es la Inhibina, glicoproteína secretada por las células de Sertoli bajo estímulo de FSH y en ciertas circunstancias, como en el inicio de la pubertad puede regular negativamente la secreción de la FSH y parece inhibir una continua diferenciación de espermatogonias (Tjondronegoro *et al.*, 1996).

Otro factor regulador es la Vitamina A; estudios realizados señalan que ante deficiencias de Vitamina A en adultos se producen fallas en la espermatogénesis y desaparición en el túbulo seminífero de todos los tipos

celulares excepto las espermatogonias tipo A<sub>0</sub> (Sharpe y Bartlett, 1985, Gokdal *et al.*, 2012).

## 2.6 Características del espermatozoide

### 2.6.1 Morfología del espermatozoide

La morfología de los espermatozoides presenta partes bien diferenciadas, presentando dos estructuras básicas, la cabeza y la cola o flagelo, todo incluido en una membrana plasmática o plasmalema.

**2.6.1.1 Cabeza:** Estructura que contiene un núcleo con cromatina muy compacta y formada por DNA y proteínas (protaminas e histonas) que se encuentran unidas por puentes de disulfuro, muy estable transportando la mitad del mensaje genético que posteriormente contribuirá a la formación de un nuevo individuo, por lo que se le denomina Haploide (Gil, 2002). Está recubierta por una membrana nuclear doble, cubierta internamente por una malla proteica que permite mantener la cromatina (esqueleto nuclear) denominada lámina nuclear (Gil, 2002).

Después del núcleo se encuentra el acrosoma, estructura originada en el aparato de Golgi, que se puede definir como un lisosoma o vesícula de doble pared que se sitúa a modo de capucha en el extremo anterior de la cabeza. Consta de un capuchón anterior, un segmento ecuatorial y del risco apical, conteniendo más de 20 enzimas hidrolíticas (fosfolipasas, fosfatasa acida, peptidasas, siendo las más abundantes la hialuronidasa y la proacrosina, necesarias para el proceso de la fecundación (Yanagimachi, 1994).

**2.6.1.2 Cola o flagelo:** Estructura del espermatozoide que puede ser dividido en cuatro regiones: cuello, media, principal y terminal. El cuello es la porción que une la cabeza con la pieza intermedia. En la parte central y a lo largo de toda la extensión del flagelo se encuentra el **axonema**, compuesto de

9 pares de micro túbulos dispuestos radialmente alrededor de un par de micro túbulos centrales. El axonema y las fibras gruesas están cubiertas por la vaina mitocondrial dispuesta helicoidalmente en la pieza intermedia. Luego sigue el anillo que une la pieza intermedia con la pieza principal, que aún contiene el axonema y está cubierto por vainas fibrosas, formadas por la unión de las fibras gruesas a proteínas estructurales externas; la capa fibrosa termina cuando se inicia la pieza caudal, conteniendo el axonema cubierto por la membrana plasmática (Setchell, 1987).

El cuello y la cabeza se conectan mediante el *capitulum* y las columnas segmentadas. La pieza intermedia continua hasta el *annulus* y contiene las mitocondrias ordenadas helicoidalmente en torno al *axonema*, a efectos de una rápida provisión de energía. La pieza principal esta reforzada por la vaina fibrosa, dos columnas longitudinales estabilizadas por puentes de filamentos orientados circunferencialmente, a efectos de recibir los embates del flagelo. La pieza terminal es muy corta y en ella finalizan los microtubulos del *axonema* (Eddy y O'Brien, 1994).

### **2.6.2 Transito de los espermatozoides**

Después de la espermiación (pasaje de las espermatidas al lumen del túbulo seminífero), los espermatozoides son liberados a la luz del túbulo seminífero, pasando hacia la *rete testis* y luego al epidídimo a través del sistema de vasos eferentes. Los espermatozoides son inmóviles y para su transporte requieren de mecanismos pasivos (fluido testicular), las secreciones de las células de Sertoli y los cilios del conducto eferente, conjuntamente con las células mioideas que rodean al túbulo (Gil, 2002; Setchell, 2006).

Posteriormente, los espermatozoides son almacenados en el epidídimo para que adquieran motilidad y capacidad fertilizante, con la presencia de proteínas, glicoproteínas y lípidos (Setchell, 1998). Los espermatozoides son almacenados



según el orden en que son producidos; el transporte de los espermatozoides en el epidídimo en la cabeza y cuerpo dura entre 11 a 14 días y luego son almacenados, maduros, en la cola del epidídimo, hasta el momento de la eyaculación (Ortavant, 1988; Setchell, 1998). Estos periodos pueden variar por el manejo al cual se somete a los machos, como las montas frecuentes que pueden llegar a reducir entre un 10 a 20 % el tiempo que permanecen en el epidídimo (Byers, 1984). Este periodo tiene significancia clínica porque cualquier evento que afecte la espermatogenesis normal va a ser observado en los gametos eyaculados luego de 2 semanas como mínimo, determinando que el espermiograma tenga el carácter de estudio retrospectivo con respecto a la espermatogenesis (Baker y Aitken, 2005).

La motilidad de los espermatozoides está a cargo de proteínas específicas, presentes en el micro túbulos del axonema. Entre las más importantes tenemos la dineína, por su acción enzimática sobre el ATP para producir la energía necesaria para el movimiento del axonema, conjuntamente con la tubulina. Ambas contribuyen a los movimientos flagelares del espermatozoide (Setchell *et al.*, 1994)

### **2.6.3 Características físicas del semen**

Entre las características del semen se considera el volumen, que en caso de los carneros varía entre un rango de 0.6 - 1.5 ml, con variaciones dependiente de la raza; concentración, con valores entre  $1.9 \times 10^6$  ml -  $4.2 \times 10^6$  ml (Gil, 2002; Simplicio *et al.*, 1982), dependiente también de la raza y de la zona de trabajo.

El porcentaje de anormales varía entre 6.9 y 13.6 % dependiente de raza y variación individual; en tanto que la motilidad masal, en una escala de 0 a 5 varía entre 3.5 y 3.9 y la motilidad progresiva individual entre 51.4 y 87.9 %, dependiente de raza, técnica de colección y variación individual (Gil, 2002; Simplicio *et al.*, 1982).

## 2.7 Termorregulación testicular

Los mamíferos, como animales endotermos, mantiene una temperatura con un rango aproximada entre 35 a 39°C para mantener sus funciones vitales. Estas altas temperaturas que generalmente exceden la temperatura ambiental, es obtenida mediante su metabolismo, siendo que la temperatura corporal es regulada por un constante equilibrio entre producción y pérdida de calor para el medio ambiente mediante conducción, convección, radiación y evaporación (Hansen, 2009). En general los endotermos pueden soportar mejor las bajas temperaturas que las elevadas temperaturas (Heldmaier *et al.*, 2004).

La función testicular normal depende de la temperatura y en la mayoría de los mamíferos los testículos se mantienen entre 2 y 8°C por debajo de la temperatura corporal, alojándose en el escroto (Ungerfeld, 2002). En el ser humano, un aumento de la temperatura testicular puede ocurrir como consecuencia del estilo de vida, ocupación profesional o de un desorden clínico. Por ejemplo, se puede producir un aumento de la temperatura testicular en los hombres que trabajan bajo condiciones de temperaturas ambientales muy elevadas y también en profesiones en las que el trabajador permanece sentado durante largos periodos de tiempo, como les ocurre a los conductores profesionales (Hansen, 2009). Estudios recientes también señalan que determinadas costumbres, como por ejemplo llevar ropa muy ajustada pueden causar un aumento en la temperatura escrotal (Hansen, 2009).

En los machos, la posición de los testículos es ampliamente variable, existiendo incluso muchas especies de mamíferos con testículos intra-abdominales pero la gran mayoría mantiene los testículos fuera de la cavidad corporal en una bolsa, para facilitar un complicado mecanismo termo regulatorio que involucran cambios de calor de la sangre caliente que sale y la sangre fría que ingresa al testículo, siendo el grado de enfriamiento controlado por dos músculos, la túnica dartos y el cremaster (Hansen, 2009).

Se ha especulado que la evolución en la formación del escroto y el descenso testicular ocurre por la necesidad de las bajas temperaturas para la espermatogénesis, almacenamiento de espermatozoides o minimizar mutaciones en el DNA de los gametos (Bedford, 2004). El descenso testicular implica costos en el desarrollo e incluso muerte por problemas en el descenso. El descenso es necesario para permitir que los testículos estén en un medio con temperatura menor a la abdominal, porque en caso contrario se afectaría la espermatogénesis (Hansen, 2009). Ciertos desórdenes clínicos, entre los que se incluye la criptorquidia, en la que uno o dos testículos no logran descender al escroto y permanecen en la cavidad abdominal, provocan la exposición de los testículos a temperaturas más elevadas de lo normal.

Todos los tejidos son susceptibles de ser dañados por el calor, pero los testículos son muy sensibles y pueden sufrir daños, incluso irreversibles, a la temperatura corporal. Para obtener un funcionamiento eficaz, los testículos de los mamíferos domésticos deben mantenerse a una temperatura menor que la del cuerpo. Los carneros mantienen una temperatura testicular 2° C a 6° C debajo de la temperatura corporal (Coulter y Kastelic, 1993; Kastelic, 2001). Las células que son más sensibles al daño por efecto del estrés de calor son los espermatoцитos y espermátidas (Setchell, 1998). Una de las principales causas del daño es por el estrés oxidativo, por causar el daño térmico sobre las células espermatoгенicas y llevar a la apoptosis y detención de los cambios en el DNA de estas células (Perez-Crespo *et al.*, 2008).

Un aumento de la temperatura sobre el testículo produce efectos directos sobre las células testiculares y su actividad. Uno de los efectos más visibles es la reducción del peso testicular que puede llegar a pesar hasta un 40 % menor que un testículo normal, luego de 15 a 20 días de exposición a una temperatura de 40°C por 30 – 60 minutos e incluso puede llegar a ser irreversible si la exposición es más prolongada (Setchell, 1998).

El calor afecta las células espermatogónicas con un incremento de espermatoцитos anormales en paquitenio, tan pronto como una hora después de un aumento experimental de temperatura. A las 2 horas se pueden observar cambios a nivel enzimático (Setchell, 1998).

Los efectos sobre la funcionalidad endocrina del testículo dependen del grado del shock térmico, en términos de temperatura y de la duración del shock en el tiempo pero si el efecto se prolonga, disminuyen las concentraciones de testosterona aunque este efecto suele ser reversible. La concentración de espermatozoides en el rete testis disminuyen hasta 1000 veces a los 20 días del shock térmico, caen a los 10 días pero retornan a las cantidades normales a los 40 días pero es posible observar cambios en la ultra estructura y metabolismo a los 4 días después del shock (Setchell, 1998).

La regulación de la temperatura testicular se realiza por la irrigación sanguínea, presencia del escroto, túnica dartos y cremaster y respuestas sistémicas al shock de calor. En la piel del escroto existen receptores de temperatura y gracias a ello se regula la temperatura a la que tiene que estar el testículo. La regulación de la temperatura se lleva a cabo mediante el siguiente proceso: La arteria testicular es una estructura contorneada en forma de cono cuya base descansa en el polo craneal de los testículos. Esos espirales arteriales se enredan en el llamado *plexo pampiniforme* de las venas testiculares. En este mecanismo de contracorriente, la sangre arterial que entra a los testículos se enfría por la sangre venosa que sale de ellos (Setchell, 1987).

Esta disposición vascular es importante en la regulación de la temperatura escrotal. En primer lugar el pulso arterial es prácticamente eliminado y casi no existen cambios en la presión arterial; además, la unión estrecha entre arteria permite que la sangre arterial que transporta sangre a temperatura corporal es enfriada por la sangre venosa procedente del testículo, permitiendo que la sangre arterial llegue al testículo con una temperatura similar a la de la piel del escroto; simultáneamente, la sangre venosa es calentada a la temperatura

corporal (Wildeus y Entwistle, 1986). Evidencias recientes han demostrado que existe una anastomosis arteriovenosa en carneros, señalándose que hasta un 40 % de la sangre que fluye por la arteria testicular puede retornar por el sistema venoso sin pasar a través de los testículos (Satchell, 1994).

La piel del escroto carece de grasa subcutánea y está dotada de grandes glándulas sudoríparas adrenérgicas y su componente muscular (*túnica dartos*) la capacita para alterar el grosor y área superficial del escroto, y hacer que varíe la cercanía del contacto de los testículos con la pared del cuerpo. En algunas animales como en el caballo, esta maniobra es apoyada por el músculo liso del cordón espermático y de la túnica albugínea.

Para su óptimo funcionamiento, el testículo, requiere mantenerse a una temperatura de 4 a 5 grados menor que la corporal. El mecanismo para obtener esta disminución de la temperatura a nivel testicular lo realiza mediante intercambio de calor a nivel del cordón espermático. En el carnero, que tienen los testículos descendidos dentro del escroto, la arteria testicular mantiene su forma original desde la arteria aorta y se alarga conforme el testículo se desplaza al escroto. La elongación es mayor que la necesaria para poder seguir los movimientos del testículo, durante la regulación térmica (Setchell BP, 1994; Ellis, 1978).

## **2.8 Alteraciones en la función testicular**

Los estudios para reproducir las circunstancias que provocan un aumento de la temperatura escrotal y evaluar sus consecuencias, han requerido el diseño de modelos animales, como la exposición de todo el cuerpo del animal a una temperatura ambiental elevada, someter al animal a estrés térmico escrotal local, que puede ser realizado mediante la inducción de la criptorquidia, el aislamiento escrotal o el sometimiento a altas temperaturas (más de 40°C) durante un corto período de tiempo.

En la criptorquidia inducida, los testículos y los epidídimos se colocan dentro de la cavidad abdominal, los testículos se ven expuestos a la temperatura corporal durante largos periodos de tiempo (Ungerfeld, 2002). En animales domésticos de mayor tamaño, los testículos pueden ser sometidos a estrés térmico mediante el aislamiento del escroto, una técnica realizada en carneros, toros, caballos y cerdos. Sin embargo, introducir los testículos del animal, previamente anestesiado o sedado, en un baño de agua caliente (40-43°C) es el método más preciso de exponer los testículos a un aumento de temperatura (Setchell, 1998). Se ha observado que los distintos modelos elegidos para provocar una situación de estrés térmico escrotal provocan alteraciones en la función testicular (Setchell, 1998).

### **2.8.1 Anormalidades espermáticas**

Los espermatozoides deben tener una alta capacidad fertilizante, después de unirse con el plasma seminal y ser depositado en el tracto uterino de la hembra. Una alta eficiencia de la capacidad de los espermatozoides es sinónimo de alta fertilidad, con las consiguientes ventajas para la especie (Mandiki *et al.*, 1998, Kastelic, 2001).

La funcionalidad de los testículos puede ser afectada por diversos factores y los efectos que se producen pueden afectar el tejido testicular y los túbulos seminíferos y el grado de afección va a depender del grado de afección del factor causal (Wahid *et al.*, 1994; Galloway, 1997).

Las anormalidades de los espermatozoides son clasificadas en primarias y secundarias (Blom, 1950 citado por Arthur, 1966); entre las anormalidades primarias se incluyen defectos en cabeza y adicionalmente se incluyen anormalidades de pieza intermedia y cola (Sorensen, 1991). Entre las anormalidades secundarias se incluyen cola doblada, gota citoplasmática proximal, cabezas con acrosoma desprendido (Sorensen, 1991).

Las alteraciones primarias son las que ocurren en el proceso de la espermatogénesis y son atribuibles a daños a nivel de tejido testicular, mientras que las secundarias ocurren durante el transporte de los espermatozoides por el epidídimo (Sorensen, 1991; Galloway, 1988). En toros, se reporta un alto porcentaje de cabezas desprendidas después de un largo período de descanso sexual (Arthur *et al.*, 1996). Las colas dobladas se pueden producir por cambios bruscos de temperatura y pueden considerarse patológico cuando existe en alto porcentaje y acompañado de presencia de gota citoplasmática (Derivaux, 1982; Soderquist, 1998). Las gotas citoplasmáticas son indicadores de inmadurez de los espermatozoides.

El ADN del espermatozoide aporta la mitad del material genético a la descendencia y es necesario para la fecundación, el desarrollo del embrión y para el correcto desarrollo fetal y postnatal. Las alteraciones en el material genético espermático pueden incluir, entre otras: defectos en la maduración o condensación nuclear, deficiencias en las protaminas, fragmentación del ADN o defectos en la integridad del ADN (rotura de cadena simple o cadena doble del ADN), sustitución de sitios básicos y aneuploidías cromosómicas en el espermatozoide (Perreault *et al.*, 2003). Numerosos autores han descrito que existe una correlación negativa entre las alteraciones en la organización del material genómico en el núcleo espermático y el potencial fecundante de los espermatozoides, tanto *in vivo* como *in vitro* (Spano *et al.*, 2005). Estos resultados apoyan el hecho de que la estabilidad del ADN espermático, que le confiere al espermatozoide la capacidad de descondensarse en el momento adecuado en el proceso de fecundación (McCarthy y Ward, 2000), es uno de los criterios necesarios para considerar que un espermatozoide no tiene alterada su capacidad fecundante (Rodriguez-Martinez, 2007).

## **2.8.2. Factores que afectan la estructura nuclear del espermatozoide.**

Se han reportado factores endógenos y exógenos que pueden ocasionar alteraciones en la estructura de la cromatina espermática, entre los que mencionan las siguientes: Compactación incorrecta de la cromatina, defectos en el mecanismo de apoptosis y estrés oxidativo (Agarwal y Said, 2003; Lewis y Aitken, 2005).

### **2.8.2.1 Compactación incorrecta de la cromatina**

La compactación de la cromatina está referida a la estructura compleja y específica, en la que se organiza el ADN nuclear espermático para transmitir correctamente la información genética. Los defectos pueden originarse en cualquiera de los cuatro niveles de empaquetamiento, pero los más comunes se presentan en el reemplazo de las histonas por protaminas (Gorczyca *et al.*, 1993; Manicardi *et al.*, 1998).

### **2.8.2.2 Defectos en el mecanismo de la apoptosis**

La apoptosis tiene dos funciones primordiales durante el proceso de la espermatogénesis (Spano *et al.*, 2005); la primera es limitar la población de células germinales a cantidades que puedan ser tolerados por las células de Sertoli, mientras que la segunda es eliminar los espermatozoides defectuosos. Deficiencias en la maquinaria celular que contribuye a la apoptosis y que se pierde progresivamente durante la espermatogénesis, no permite la eliminación de las células germinales anormales durante la espermatogénesis y puede ser la causa de la presencia en el eyaculado de espermatozoides con su ADN dañado (Sakkas *et al.*, 2002).



### **2.8.2.3 Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo en el tracto reproductor masculino se produce como consecuencia de un exceso de los radicales libres de oxígeno, presentes en los fluidos del tracto genital masculino (Tesarik *et al.*, 2006) y que es atribuido a una deficiencia en la producción de radicales libres y la capacidad antioxidante (Wang *et al.*, 2003). Los espermatozoides son muy susceptibles al estrés oxidativo debido al alto contenido en ácidos grasos insaturados en sus membranas, así como debido al limitado almacenamiento de enzimas antioxidantes por lo que la susceptibilidad al estrés oxidativo se ve incrementada cuando la compactación de la cromatina es incorrecta, causando un mayor daño al genoma (Baker y Aitken, 2005). En condiciones fisiológicas, este tipo de daño no es preocupante ya que se produce un daño colateral peroxidativo de la membrana de los espermatozoides que asegura que los espermatozoides afectados no puedan participar en la fecundación (Baker y Aitken, 2005).

### **2.8.3 Efecto del daño nuclear espermático sobre la fertilidad**

Se ha reportado una correlación negativa entre los parámetros de motilidad y viabilidad espermática y los índices de fragmentación del ADN tanto en los animales como en los seres humanos (Huang *et al.*, 2005; Irvine *et al.*, 2000). Alteraciones en el núcleo espermático está asociado con problemas de fertilidad en humanos (Agarwal y Said, 2003; Aitken y Baker, 2004) aun cuando se señala que un pequeño porcentaje de espermatozoides de seres humanos fértiles poseen niveles detectables de daño en el ADN (Spano *et al.*, 2000; Zini *et al.*, 2001). Similar correlación entre el daño nuclear espermático y un descenso en la fertilidad ha sido reportado en animales (Boe-Hansen *et al.*, 2008; 2004; Kasimanickam *et al.*, 2006; Morrell *et al.*, 2008).

Situaciones que originan un bajo estrés oxidativo, producen daño en el ADN espermático, pero los espermatozoides siguen manteniendo su capacidad

fecundante intacta (Aitken *et al.*, 1998) pero un elevado estrés oxidativo que produce un daño severo en el ADN espermático, los espermatozoides pierden su capacidad fecundante debido al estrés oxidativo colateral de la membrana plasmática (Aitken *et al.*, 2004).

## **2.9 Estudios sobre el efecto del calor en la función testicular**

### **2.9.1 Métodos de evaluación**

Existen diversos métodos para realizar estudios sobre el efecto del calor en la función testicular de las especies domésticas. La inmersión testicular en agua caliente es una de las técnicas que se utilizaron tiempo atrás; sin embargo, hay que señalar que se requiere una constante renovación del agua a la temperatura deseada y no siempre es posible mantener la temperatura constante por largos períodos (Waites y Setchell, 1964; Braden y Mattener, 1970).

El incremento de la temperatura ambiental es una técnica utilizada por diversos autores (Karagiannidis *et al.*, 2000); sin embargo, esta técnica implica la presentación de efectos no controlables, como la reacción fisiológica propia del animal al estrés del calor, el cual puede afectar la función testicular y los posibles cambios en el intercambio de calor a nivel testicular, por una exposición de los animales al calor. (Setchell *et al.*, 1994; Byers, 1984).

El aislamiento escrotal mediante bolsas térmicas adaptada a especies como el carnero o toro con presencia de testículos pendulantes, (Byers y Glover, 1984) es fácilmente aplicable en estos animales y restringe el efecto del incremento de la temperatura a nivel testicular.

### 2.9.2 Efectos sobre el tamaño testicular y espermatogénesis

El estrés térmico escrotal producen alteraciones en la función testicular, como un descenso en el peso testicular, pérdida de células germinales, un incremento en la apoptosis celular (Lue *et al.*, 1999), un descenso en la concentración, viabilidad y motilidad espermática (Banks *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2004) y una reducción de la capacidad fecundante de los espermatozoides que da lugar a un período de infertilidad parcial o completa del animal (Setchell, 1998; Yaeram *et al.*, 2006). Las células afectadas por el estrés térmico escrotal son las células germinales presentes en el testículo y que participan en el proceso de espermatogénesis y los espermatozoides presentes en el epidídimo (Banks *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2004).

El efecto del estrés térmico sobre las células de la línea germinal masculina depende de la capacidad de estas células de responder al estrés, de reparar su ADN y de la posibilidad de sufrir apoptosis o necrosis (Rockett *et al.*, 2001). Las células de cada una de las fases de la espermatogénesis tienen propiedades únicas en cuanto a síntesis de ADN, estructura de las proteínas asociadas a los cromosomas y capacidad de reparar el daño en el ADN, observándose que algunas de las células presentes en el testículo en el momento del estrés térmico se eliminan mediante apoptosis (Banks *et al.*, 2005), muchas otras células germinales, en cambio, completan su desarrollo y dan lugar a espermatozoides motiles con daño en su ADN (Banks *et al.*, 2005). Varios estudios han identificado que los espermatozoides son las células más vulnerables al estrés térmico (Banks *et al.*, 2005; De Vita *et al.*, 1990; Paul *et al.*, 2008).

En el ratón, se ha reportado alteraciones en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, así como un empaquetamiento anormal de la cromatina y una reducción de la integridad del ADN espermático (Banks *et al.*, 2005) como consecuencia del incremento de la temperatura escrotal. A nivel molecular, se describe una reducción en la expresión génica, particularmente de genes

implicados en la reparación del ADN y la recombinación, la regulación del ciclo celular y la respuesta al estrés (Rockett *et al.*, 2001). La reducción de la expresión de estos genes puede causar que las células germinales sean más susceptibles al daño durante la hipertermia.

Diversos reportes señalan el efecto del incremento de la temperatura sobre el tamaño del testículo, entre un rango del 40 a 60 % de su tamaño normal y por lo general los cambios se observan durante la segunda semana después del tratamiento térmico, (Byers *et al.*, 1984; Sanford *et al.*, 1990). La reducción del testículo es atribuida a una disminución significativa del diámetro del túbulo seminífero, pero no de longitud, así como por disminución del volumen total del tejido intersticial (Hansen, 2009).

Observaciones histológicas señalan que las primeras células afectadas son los espermatocitos primarios (Setchell, 1994; Galloway, 1992) y el grado de alteración va a depender de la magnitud del efecto térmico. Los espermatozoides presentes en el epidídimo sufren un daño relativo, el cual explica que los animales sometidos a alteraciones térmicas, recién presenta anomalías espermáticas a las dos semanas (Setchell, 1994)

### **2.9.3 Cambios en la función endocrina y características del semen**

El incremento de la temperatura a nivel testicular produce reducción del tejido intersticial, donde se encuentran las células de Leydig, las que disminuyen en número y pueden no sufrir cambios o aumento en el volumen (Byers y Glovers, 1984).

Existen pocos estudios referentes a los cambios ocasionados por el estrés térmico sobre la secreción de hormonas que controlan los eventos reproductivos. Datos en toros y verracos señalan que el calor origina una disminución de las concentraciones circulantes de testosterona pero que estos niveles vuelven a los niveles previos si continúa el estrés térmico (Hansen,

2009). La disminución de testosterona a nivel sanguíneo, puede ser explicada por una disminución en el número de receptores a nivel de las células de Leydig y un incremento en los niveles sanguíneos de LH y FSH (Byers y Glover, 1984). En hembras, el estrés térmico altera la secreción de LH aun en la ausencia de ovarios y se sugiere que puede presentar una conducta similar en el macho (Hansen, 2009).

Respecto a las características del semen, no se reportan cambios en el volumen del semen (Karagiannilis *et al.*, 2000). El inicio de presencia de alteraciones en la concentración varía entre 14 y 16 días, siendo una característica muy sensible al calor (Setchell, 1987; Mc Laren, 1998). Una alta incidencia de anormalidades en cabeza y cola, entre 50% y 80 % son reportados por efecto del calor (Williamson, 1974).

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1.- Lugar de desarrollo fase experimental**

El experimento fue realizado en el Centro Clínico Veterinario de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Melbourne - Australia, localizado en la localidad de Werribee a 35 Km de la ciudad de Melbourne. La fase experimental comprendió el período entre el 30 de Enero y al 10 de Marzo. La temperatura ambiental media, durante el período de estudio fue de  $35.3 \pm 3.8^{\circ}\text{C}$

### **3. 2.- Animales**

Se utilizaron 12 carneros de raza Merino, con una edad promedio de 18 meses, sexualmente maduros y en buena condición corporal. Los animales fueron distribuidos al azar en dos grupos: uno control y otro para ser sometido a aislamiento escrotal.

Los animales fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de manejo y alimentación, siendo colocados en jaulas colectivas y con alimentación a base de heno de alfalfa y agua a discreción.

### **3.3 Diseño Experimental**

Para efectos del desarrollo del estudio, el experimento fue dividido en dos fases:

- a) Fase pre - experimental: Periodo desde una semana previa al inicio del experimento hasta el inicio de la fase experimental, donde se realizaron las evaluaciones clínicas testiculares y características seminales.
- b) Fase Experimental: Período comprendido desde la colocación de las bolsas por 48 horas hasta 35 días después del retiro de las mismas.

Para efectos del experimento, los animales fueron divididos al azar en dos grupos:

- T1: (n = 4): Control, sin aislamiento escrotal
- T2: (n = 8): Tratado, con aislamiento escrotal

Para producir el aislamiento escrotal, los testículos de los animales fueron cubiertos con una bolsa escrotal. Esta fue fabricada con algodón y cubierta con bolsas de plástico para permitir una temperatura escrotal de  $39\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; estas bolsas fueron colocadas por un período de 48 horas.

### **3.4. Evaluaciones efectuadas**

Se realizaron las siguientes evaluaciones clínicas:

#### **3.4.1 Evaluación de consistencia testicular**

Se efectuaron tres evaluaciones pre - experimentales y en la fase experimental cada tres días, conjuntamente con la colección de semen. Las

evaluaciones de la consistencia testicular se realizaron acorde a la técnica reportada por McGowan et al (1995), considerando las variables de elasticidad y firmeza (Cuadro 1)

**Cuadro 1.- Evaluación de la consistencia testicular**

<b>Evaluación de la consistencia testicular</b>		
<b>Valores</b>	<b>Firmeza</b>	<b>Elasticidad</b>
1	Muy firme	Muy alta
2	Firme	Alta
3	Moderada	Moderada
4	Baja	Baja
5	Muy baja	Muy baja

Valores de firmeza y elasticidad de 2:2; 2:3; 3:3 considerados normales.

Adicionalmente, se registro la medición de la circunferencia escrotal de ambos testículos, basado en la técnica descrita por Chenoweth y Ball (1980).

### **3.4.2 Colección de semen**

La colección de semen se realizó mediante la técnica de electroeyaculación, con la ayuda de un Electroeyaculador de ovinos Marca Bailey de 06 voltios. La técnica para la colección incluye la aplicación de estímulos eléctricos vía rectal por 6 segundos, seguido de un período de descanso de 2 segundos y reinicio de los ciclos de estímulo en orden creciente, hasta conseguir la erección y posterior eyaculación. El semen fue colectado en tubos de vidrio graduados e inmediatamente colocados a temperatura de 35 °C para la evaluación.



### **3.4.3 Evaluación de semen:**

Las características físicas del semen fueron evaluadas de acuerdo a la técnica descrita por Evans y Maxell (1987) citado Por Galloway 1997, considerando las variables siguientes:

- a) Volumen: Expresada en ml en los tubos graduados.
- b) Color
- c) Motilidad Masal: Expresada en una escala de 0: sin motilidad a 5: muy alta motilidad y a una observación de 10X
- d) Motilidad Individual: Expresada en porcentaje (0 a 100 %) y con observación a 40X.
- e) Concentración: Determinado con la ayuda del hemocitómetro o cámara de Neubauer
- f) Porcentajes de espermatozoides vivos y muertos: colocándose una gota en solución de nigrosin - eosin y se determina la viabilidad del espermatozoide por la coloración tomada por el espermatozoide.
- g) Porcentajes de espermatozoides anormales de cola y cabeza: Una gota del semen fue colocado en una solución de formaldehído y fijado para la determinación de anormalidades. Además, se realizaron frotis de cada eyaculado.

En el caso de la evaluación del porcentaje de anormalidades y porcentaje de muertos/vivos se realizaron conteos mínimos de 200 espermatozoides / campo

### **3.4.4 Determinación de Hormonas : LH y Testosterona**

Para la determinación de los niveles de Testosterona y LH, se realizaron 4 muestreos en todos los animales, en base al siguiente cronograma:

- Muestra 1:       Día - 01 (pre aislamiento escrotal)  
Muestra 2 :       Día  07 (después de aislamiento escrotal).  
Muestra 3 :       Día  14  
Muestra 4 :       Día  28

El protocolo para la colección de sangre comprende la canulación de la vena yugular un día antes del muestreo, una extensión de la cánula fue fijada a la parte dorsal del animal, de modo que no produzca molestia alguna. Los animales fueron colocados en jaulas individuales y el día siguiente se realizó el muestreo por un período de 06 horas, a intervalos de 10 minutos, obteniéndose un total de 36 muestras por animal.

Se colectó una muestra de 10 ml. de sangre en tubos con solución de heparina al 0.9 %; esta fue colocada inmediatamente en hielo y centrifugada en un período de tiempo no mayor de 10 minutos. La muestra de plasma fue colocada en congelación a - 20°C hasta su análisis en el Laboratorio. Para el análisis de LH se utilizaron todas las muestras obtenidas (n = 36) y las concentraciones de LH fueron determinadas mediante la técnica de radioinmunoanálisis. Para el análisis de testosterona, se utilizó un pool de las muestras tomadas en cada muestreo y las concentraciones se determinaron mediante la técnica del RIA usando KITS DPC. Los niveles de testosterona fue expresada en pg/ml y la de LH fueron expresadas en ng/ml.

### **3.5 Análisis estadístico**

Para la evaluación de los resultados y determinar el efecto del incremento de la temperatura escrotal sobre las variables continuas (Volumen, concentración y circunferencia escrotal) se utilizo la prueba T student para comparar diferencias entre los tratamientos (control y con aislamiento escrotal) en cada una de las semanas post aislamiento.

Para las variables discontinuas (Consistencia, Motilidad masal, motilidad progresiva, porcentajes de espermatozoides anormales y muertos) se realizaron pruebas de mediante CHI Cuadrado comparando ambos grupos.

Los resultados de testosterona y LH fueron analizados para determinar diferencias entre los diferentes muestreos mediante análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias (TUKEY).

## IV. RESULTADOS

### 4.1.- Evaluación clínica testicular

Los resultados obtenidos en la evaluación clínica, referentes a los cambios en la circunferencia escrotal y consistencia testicular se presentan en el cuadro 2. Los resultados nos reportan cambios en la circunferencia escrotal a partir de la segunda semana posterior al inicio de la fase experimental, en los animales sometidos a aislamiento escrotal, variación que se mantiene hasta el final de la evaluación (quinta semana, día 35). Los valores varían de  $30.43 \pm 1.1$  cm al inicio del estudio y se reducen en forma significativa a partir de la segunda semana con valores de  $28.19 \pm 1.2$  y alcanzando valores hasta de  $25.0 \pm 0.5$  cm en la quinta semana; diferentes de los valores presentados por los animales del grupo control, sin registrarse cambios significativos

Sin embargo, cuando se observa los cambios en la determinación de la consistencia testicular, no se determinaron cambios significativos y en ningún momento se observaron valores de 3,4 o 4,4; considerados como anormales. Los resultados de la evaluación de la consistencia testicular varían en un rango de 2:2; 2:3 y en algún momento se llegó a determinar valores de 3:3 en los animales tratados pero sin ser considerados anormales.

**Cuadro 2.- Circunferencia escrotal y consistencia testicular**

Periodo	Grupo Control		Aislamiento escrotal	
	Circunferencia (cm ± DS)	Consistencia (1 - 5)	Circunferencia (cm ± DS)	Consistencia (1 - 5)
Inicio	29.81 ± 1.3 <sup>a</sup>	2,0	30.43 ± 1.1 <sup>a</sup>	2,0
Semana 1	30.25 ± 1.2 <sup>a</sup>	2,0	29.61 ± 1.8 <sup>a</sup>	2,0
Semana 2	30.55 ± 1.3 <sup>a</sup>	3,0	28.19 ± 1.2 <sup>b</sup>	3,0
Semana 3	30.16 ± 1.2 <sup>a</sup>	3,0	26.10 ± 1.2 <sup>b</sup>	2,0
Semana 4	29.42 ± 0.6 <sup>a</sup>	2,0	25.58 ± 0.6 <sup>b</sup>	3,0
Semana 5	30.42 ± 0.4 <sup>a</sup>	3,0	25.00 ± 0.5 <sup>b</sup>	2,0

- Consistencia Testicular de 2,2; 2,3; 3,3 son considerados normales.
- Letras diferentes en la misma fila son diferentes estadísticamente ( P < 0.01)

#### 4.2.- Volumen seminal y concentración espermática

El cuadro 3 presenta los resultados del volumen de semen obtenidos durante el período de evaluación. No se determinó diferencias significativas en volumen entre semanas y los valores varían entre  $0.73 \pm 0.32$  a  $0.92 \pm 0.10$  en los animales bajo aislamiento escrotal y entre  $0.70 \pm 0.29$  a  $0.97 \pm 0.08$  en los animales del grupo control (ns). Los volúmenes colectados en contadas ocasiones excedieron 1 ml en media y el método de colección utilizado fue mediante electroeyaculación.

**Cuadro 3.- Volumen de semen colectado**

Semana	Grupo Control (ml. ± DS)	Aislamiento escrotal (ml. ± DS)
Inicio	0.70 ± 0.29	0.73 ± 0.32
1	0.71 ± 0.33	0.75 ± 0.21
2	0.97 ± 0.08	0.87 ± 0.18
3	0.96 ± 0.10	0.92 ± 0.10
4	0.86 ± 0.22	0.86 ± 0.21
5	0.93 ± 0.10	0.91 ± 0.22

Respecto a la concentración espermática, los resultados se presentan en el cuadro 4 y se observan diferencias significativas en el grupo sometido al aislamiento escrotal, disminuyendo de un valor inicial de  $3.08 \pm 0.43$  para disminuir a  $2.81 \pm 0.41$  en la segunda semana y continuar disminuyendo hasta alcanzar valores de  $1.04 \pm 0.19$  en la quinta semana. Se reportan diferencias significativas entre los valores del grupo control y tratado ( $P < 0.01$ ).

**Cuadro 4.- Concentración espermática (  $n \times 10^6$  /ml)**

<b>Semana</b>	<b>Grupo Control X <math>\pm</math> DS</b>	<b>Aislamiento escrotal X <math>\pm</math> DS</b>
INICIO	$2.88 \pm 0.37^a$	$3.08 \pm 0.43^a$
SEMANA 1	$3.02 \pm 0.60^a$	$2.81 \pm 0.41^a$
SEMANA 2	$2.96 \pm 0.42^a$	$1.92 \pm 0.34^b$
SEMANA 3	$3.10 \pm 0.19^a$	$1.34 \pm 0.20^b$
SEMANA 4	$3.17 \pm 0.30^a$	$1.41 \pm 0.23^b$
SEMANA 5	$3.06 \pm 0.23^a$	$1.04 \pm 0.19^b$

- Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa entre promedios (  $P < 0.01$  )

#### **4.3.- Motilidad masal y motilidad individual progresiva**

Los resultados de motilidad masal, durante el período experimental en ambos grupos, se presentan en el Cuadro 5. Se observan diferencias en Motilidad Masal en el grupo control respecto al grupo con aislamiento escrotal a partir de la primera semana, con valores de  $5.8 \pm 0.51$  y  $3.8 \pm 0.43$ , respectivamente, alcanzando valores de 0 en las semanas 2,3 y 4, para iniciar un leve incremento en la quinta semana ( $0.33 \pm 0.51$ ).

En lo referente a la motilidad individual progresiva (Cuadro 6) en el grupo tratado con aislamiento escrotal, se observan cambios a partir de la primera semana, con una disminución a  $56.3 \pm 4.36$  % y valores de cero ( $2.45 \pm 3.1$ ) desde la segunda hasta la cuarta semana e iniciar un leve incremento de la motilidad individual en la quinta semana ( $1.22 \pm 2.73$ ).

**Cuadro 5.- Motilidad masal (0 a 5) durante la fase experimental**

Semana	Control	Aislamiento escrotal
INICIO	5.6 ± 0.40 <sup>a</sup>	5.5 ± 0.35 <sup>a</sup>
SEMANA 1	5.8 ± 0.51 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.43 <sup>a</sup>
SEMANA 2	5.7 ± 0.32 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>
SEMANA 3	5.5 ± 0.42 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>
SEMANA 4	5.8 ± 0.34 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>
SEMANA 5	5.4 ± 0.53 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.51 <sup>b</sup>

\* Letras diferentes en la misma fila son estadísticamente diferentes ( P < 0.001)

**Cuadro 6.- Motilidad progresiva individual (%) durante la fase experimental**

Semana	Control	Aislamiento escrotal
INICIO	88.7 ± 4.50 <sup>a</sup>	85.5 ± 5.2 <sup>a</sup>
SEMANA 1	85.4 ± 5.25 <sup>a</sup>	56.3 ± 4.3 <sup>b</sup>
SEMANA 2	85.8 ± 4.37 <sup>a</sup>	2.45 ± 3.1 <sup>b</sup>
SEMANA 3	85.6 ± 4.52 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>
SEMANA 4	73.5 ± 5.20 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>
SEMANA 5	83.5 ± 4.21 <sup>a</sup>	1.22 ± 2.73 <sup>b</sup>

\* Letras diferentes en la misma fila son estadísticamente diferentes ( P < 0.001)

#### 4.4- Características morfológicas de los espermatozoides

El efecto del aislamiento escrotal sobre la morfología de los espermatozoides se presenta en los cuadros 7, 8 y 9. En el Cuadro 7 se puede observar las variaciones semanales en la proporción de espermatozoides anormales en los animales del grupo control y grupo tratado. El porcentaje de espermatozoides anormales en el grupo tratado se incrementa a partir de la segunda semana, alcanzando valores desde 22.8 ± 18.4 % hasta alcanzar un máximo de 99 % de espermatozoides anormales en las tres últimas semanas.

En lo referente al tipo de anomalía presente, las principales anomalías en los animales del grupo control son las anomalías de cuerpo y cola (Cuadro 8); mientras que en los animales tratados, existe un alto porcentaje de anomalías de cuerpo y cola y presencia de cabezas solas, luego siguen las alteraciones con presencia de gota citoplasmática (Cuadro 9).

**Cuadro 7.- Presencia de espermatozoides anormales (%) en los animales en estudio**

	<b>Control (% ± DS)</b>	<b>Aislamiento escrotal (% ± DS)</b>
INICIO	08.25 ± 04.8 <sup>a</sup>	10.75 ± 04.4 <sup>a</sup>
SEMANA 1	07.50 ± 05.4 <sup>a</sup>	22.8 ± 18.4 <sup>b</sup>
SEMANA 2	06.50 ± 08.3 <sup>a</sup>	82.3 ± 29.3 <sup>b</sup>
SEMANA 3	09.75 ± 06.7 <sup>a</sup>	99.7 ± 0.02 <sup>b</sup>
SEMANA 4	10.25 ± 08.2 <sup>a</sup>	99.1 ± 0.05 <sup>b</sup>
SEMANA 5	21.00 ± 07.3 <sup>a</sup>	99.1 ± 0.06 <sup>b</sup>

\* Letras diferentes en la misma fila presentan diferencias estadísticas Significativas (P < 0.01)



**Cuadro 8.- Anormalidades espermáticas observadas en el grupo control**

<b>Tipo de anomalía</b>	<b>SEMANA</b>				
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Gota proximal	<b>1.75</b>	<b>1.25</b>	<b>1.75</b>	<b>1.00</b>	<b>1.75</b>
Gota distal	<b>1.25</b>	<b>0.00</b>	<b>1.75</b>	<b>2.25</b>	<b>1.25</b>
Cabeza sola	<b>2.75</b>	<b>1.00</b>	<b>1.50</b>	<b>3.50</b>	<b>15.25</b>
Doble simple	<b>2.25</b>	<b>1.25</b>	<b>3.50</b>	<b>2.50</b>	<b>1.75</b>
Doble doble	<b>0.25</b>	<b>0.50</b>	<b>0.00</b>	<b>0.25</b>	<b>0.75</b>
Cola corta	<b>0.00</b>	<b>0.25</b>	<b>0.75</b>	<b>0.75</b>	<b>0.25</b>
Anormalidad cabeza	<b>0.00</b>	<b>2.25</b>	<b>0.50</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
% Vivos	<b>91.75</b>	<b>92.50</b>	<b>94.00</b>	<b>80.50</b>	<b>85.50</b>

**Cuadro 9.- Anormalidades espermáticas observadas en el grupo tratado**

<b>Tipo de Anormalidad</b>	<b>Semana</b>				
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Gota Proximal	2.00	5.65	06.50	06.75	04.80
Gota Distal	3.25	3.50	05.75	03.25	05.25
Cabeza sola	14.25	53.25	66.75	63.50	58.50
Doble simple	2.50	8.25	4.25	05.40	6.80
Doble doble	0.80	8.50	09.00	11.45	13.25
Cola corta	0.00	0.90	3.75	05.75	5.25
Anormalidad cabeza	0.00	2.25	3.75	3.00	5.25
% vivos	80.50	35.50	13.50	28.50	19.75

#### 4.5.- Características endócrinas

##### 4.5.1.- Perfiles hormonales de testosterona

El Cuadro 10 presenta las concentraciones medias de testosterona. En el primer muestreo se observaron valores similares en ambos grupos de animales pero a partir de la segunda semana se observaron una disminución de las concentraciones de testosterona en las muestras plasmáticas.

**Cuadro 10.- Concentraciones promedio ( $n \pm ds$ ) de testosterona (pg/ml)**

	Control	Tratado
Muestra D 0	436 $\pm$ 202 <sup>a</sup>	483 $\pm$ 237 <sup>a</sup>
Muestra D 7	487 $\pm$ 219 <sup>a</sup>	280 $\pm$ 83 <sup>b</sup>
Muestra D14	408 $\pm$ 201 <sup>a</sup>	231 $\pm$ 67 <sup>b</sup>
Muestra D 28	459 $\pm$ 238 <sup>a</sup>	201 $\pm$ 63 <sup>b</sup>

- Promedios con letras diferentes en filas presenta diferencias ( $P < 0.01$ )

##### 4.5.2.- Cambios en las concentraciones de LH

Las concentraciones medias de LH se presentan en el cuadro 11, así mismo se presentan los números de pulsos de LH en las 6 horas de muestreo. Los valores se mantienen más o menos constantes en el grupo control a lo largo de los muestreos pero en los animales tratados se observaron aumentos en la concentración de LH desde  $0.07 \pm 0.06$  ng/ml hasta alcanzar  $2.29 \pm 0.88$  ng/ml en el tercer muestreo (Día 14). También se observaron aumentos en el número de pulsos, pasando de valores de  $0.04 \pm 0.40$  hasta  $1.32 \pm 0.43$  pulsos/6 horas en la semana 4 (día 28).

**Cuadro 11. - concentraciones promedio de hormona luteinizante (ng/ml)**

	CONTROL		TRATADO	
	LH (ng/ml)	Pulsos (n)/ 6 horas	LH (ng/ml)	Pulsos (n)/ 6 horas
Muestra 1 (D 0)	0.07 ± 0.06	0.04 ± 0.40	0.07 ± 0.06	0.04 ± 0.40
Muestra 2 (D 7)	0.08 ± 0.07	0.05 ± 0.40	0.96 ± 0.72	0.92 ± 0.33
Muestra 3 (D 14)	0.07 ± 0.07	0.04 ± 0.40	2.29 ± 0.88	1.20 ± 0.37
Muestra 4 (D 28)	0.08 ± 0.06	0.04 ± 0.40	2.11 ± 0.92	1.32 ± 0.43

## V.DISCUSIÓN

Los carneros, como los mamíferos en general, han desarrollado una capacidad para realizar sus funciones a temperaturas elevadas y que se encuentran en un rango de 35°C a 38°C, temperatura que normalmente excede la temperatura ambiental. La temperatura corporal está regulada por un mecanismo que le permite perder calor hacia el medio ambiente mediante el mecanismo de la conducción, convección, radiación y evaporación. Los mamíferos pueden por lo general soportar mejor las bajas que las altas temperaturas y disponen de un mecanismo de regular la temperatura corporal.

Existen situaciones en la que se produce un incremento de la temperatura ambiental y que afecta la capacidad del individuo para regular la temperatura corporal o que al lograr controlarla afecta otros procesos fisiológicos, situación conocida como estrés de calor. El estrés de calor puede llevar a disturbios en los procesos reproductivos mediante dos mecanismos, un primer mecanismo mediante los cambios homocinéticos que afecta la función reproductiva porque redistribuye el flujo sanguíneo hacia la superficie corporal y un segundo mecanismo mediante la reducción del consumo de alimentos, pero estos mecanismos afectan la actividad reproductiva en las especies, especialmente en la hembra, afectando la calidad de los gametos y la sobrevivencia embrionaria, según lo menciona Hansen (2009).

En el macho, el efecto adverso de la elevación de la temperatura sobre la función de los testículos en los mamíferos ha sido reconocida desde tiempo atrás e incluso se considera que moderadas elevaciones térmicas pueden producir alteraciones en la espermatogénesis (Blackshaw, 1977). Si bien se conoce que todos los tejidos son susceptibles de ser afectados por el calor, los testículos son especialmente sensibles y pueden llegar a sufrir daños irreversibles por una elevada temperatura, afectando los espermatocitos y las espermatidas, según lo señala Setchell (1998) y que por acción del estrés oxidativo puede afectar las células espermatogénicas y llevar a la apoptosis y detención de los cambios del ADN en estas células.

El estudio del efecto del calor nos permite obtener información que puede contribuir a plantear alternativas de control. Uno de los métodos de estudio se realiza por aislamiento testicular, mediante cubiertas de algodón forradas con bolsas de plástico, colocadas a nivel del escroto en ovinos, produce diversos cambios en las características clínicas, seminales y endócrinas, según ha sido descrito por diversos autores (Waites y Setchell, 1964; Byers y Glover 1984; Byers 1984; Blanchard et al 1996).

La elevación de la temperatura aproximadamente a 40°C durante 1.5 a 2.0 horas, a nivel escrotal, causa un incremento en la proporción de espermatozoides morfológicamente anormales en el eyaculado a los 14 a 16 días después (Braden y Mattner 1970), por lo que con el uso de las cubiertas plásticas para elevar la temperatura hasta los 39° C, por 48 horas fue posible producir alteraciones morfológicas en los espermatozoides.

### **5.1.- Evaluación clínica testicular**

El aumento de la temperatura sobre el testículo produce efectos directos sobre las células testiculares y su actividad, siendo uno de los efectos más visibles la disminución hasta del 40 % del peso testicular. En el presente estudio, se puede observar una reducción de la circunferencia escrotal de los animales sometidos al aislamiento escrotal, coincidente con lo reportado por diversos autores (Gomes et al 1971; Byers 1984; Hochereau - de -Reviere et al 1993, Setchell 1998). Esta reducción de la

circunferencia escrotal se explica porque la acción del calor origina alteraciones a nivel de los túbulos seminíferos, con una reducción de la luz del túbulo pero no de la longitud (Hochereau - de Reviere et al 1993).

Estas alteraciones del tejido testicular se deberían reflejar en una alteración de la consistencia testicular, porque al existir una reducción de la luz de los túbulos, según lo reportado por Hochereau de Reviere et al 1993, se debería sentir un grado de consistencia testicular anormal; sin embargo, los resultados observados en el presente experimento no coinciden con lo esperado y si bien al inicio del trabajo los animales registraron valores en consistencia testicular de 2:2; 2:2 y posteriormente se registraron consistencias de 2:3; 3:3 en el grupo tratado, no llegando a determinarse animales con consistencia testicular de 3:4; 4:4, valores compatibles con testículos anormales, según lo descrito por Galloway (1977). Entre las posibles explicaciones para que no se haya registrado una consistencia testicular anormal es que si bien existe reducción de la luz de los túbulos, éstos túbulos aun contienen espermatozoides, aunque en menor cantidad y de otro lado, se produce una reducción de los túbulos pero no se produce una reducción del tejido intersticial, según ha sido señalado por Hochereau de reviere et al 1993.

## **5.2 Características seminales**

Los resultados observados en lo referente a las características del volumen de semen señalan que no se observan diferencias significativas entre las diferentes semanas en estudio y el volumen promedio del semen colectado varía entre 0.70 y 0.98 ml. Esta no existencia de variación en el volumen de semen ha sido reportado y coincide por lo señalado por otros autores, como Dutt y Hamm, 1957; Brooks y Ross, 1962; Howarth 1969; quienes tampoco reportan variaciones significativas del volumen seminal en animales expuestos a elevaciones de temperatura. Hay que señalar que las ligeras variaciones pueden explicarse por la técnica empleada, electroeyaculación; aún cuando se señala que en el caso de los carneros no existen diferencias marcadas entre las técnicas de colección.

Respecto a la concentración de espermatozoides, los rangos considerados normales en la concentración de espermatozoides en los carneros varían en un rango de 1.5 a 3.0 millones/ml (Hafez 1995). En el presente trabajo se han reportado valores mínimos de  $1.04 \pm 0.19$  millones de espermatozoides/ml. coincidente con los reportes de Dutt y Ham (1957) y Brook y Rose (1962). Existen diferencias entre el grupo control y el tratado y los cambios en la concentración se observan a partir de la segunda semana, continuando hasta el final del período experimental, explicable por que las alteraciones a nivel del testículo se producen inmediatamente, siendo los espermatoцитos primarios las primeras células en ser afectadas, sin embargo; el efecto del aislamiento escrotal no es tan marcado a nivel del epidídimo (Setchell 1994), lugar de almacenamiento de los espermatozoides producidos y éstos, son los espermatozoides que se van liberando en los eyaculados durante las dos primeras semanas; posteriormente, al haberse afectado los espermatoцитos primarios, no se producen espermatozoides en las cantidades normales.

El incremento de la temperatura tiene efecto sobre la motilidad masal, atribuido a una disminución de la concentración de espermatozoides y a las formas anormales y espermatozoides muertos presentes en el eyaculado. La motilidad individual está afectada porque el calor afecta las proteínas específicas dineina y tubulina, necesarias para estimular la motilidad espermática, quienes se encargan de ejercer una acción enzimática sobre el ATP, para producir energía necesaria para el movimiento del axonema (Setchell 1987; McLaren 1994). Similares cambios en la motilidad espermática han sido reportados por otros autores Dutt y Hamm, 1957; Brooks y Ross 1962; Moule y Waites 1963.

El calor aplicado a nivel testicular tiene marcado efecto sobre los espermatoцитos primarios, reportándose que entre los 14 a 16 días es posible observar las alteraciones en el eyaculado, según lo señalado por Moule y Waites (1963); Waites y Setchell (1964), coincidente con lo encontrado en el presente estudio (Cuadro 5), donde se observan alteraciones a partir de la segunda semana y llegando a un 99 % en las semanas 3,4 y 5. Las anomalías más frecuentes fueron las de cabezas solas y colas dobladas, las cuales pueden clasificarse como anomalías primarias (Arthur 1996),

debido a que la alteración se produce a nivel del proceso espermatogénico (Sorensen 1991). Las células afectadas por el estrés térmico escrotal son las células germinales presentes en el testículo y que participan en la espermatogenesis y los espermatozoides presentes en el epidídimo (Bank et al 2005; Zhu et al 2004). La intensidad del efecto del estrés térmico sobre las células de la línea germinal es dependiente de la capacidad de estas células en responder al estrés y reparar el ADN y la posibilidad de sufrir apoptosis o necrosis (Rockett et al 2001).

El porcentaje de espermatozoides muertos se incrementa a partir de la segunda semana pos aislamiento escrotal, explicable porque ya ha sido liberado la totalidad de espermatozoides almacenados en el epidídimo y deberían ser reemplazados por los espermatozoides que se producen mediante el proceso espermatogénico (Sorensen 1991).

### **5.3 Perfiles hormonales**

Respecto a las características endócrinas, el incremento de la temperatura testicular produce una reducción del tejido intersticial, lugar donde se encuentran las células de Leydig, produciendo una disminución en el número, como lo señala Byers y Glovers (1984), por lo que si consideramos la relación existente entre las células de Leydig y la producción de testosterona, estos reportes pueden explicar los cambios observados en los perfiles de testosterona en el grupo tratado, con una disminución en la concentración a partir de la segunda semana después del aislamiento escrotal ( $280 \pm 83$  pg/ml) y que posteriormente disminuyen hasta  $201 \pm 63$  pg/ml. Estos valores encontrados coinciden con lo reportado por Byers y Glover (1984), quienes también encontraron variaciones en las concentraciones de testosterona después de la segunda semana posterior a la aplicación del calor.

Respecto a los cambios ocasionados por el estrés térmico sobre la secreción de las hormonas que controlan los eventos reproductivos, los resultados registrados señalan cambios en los niveles de hormona luteinizante (LH), la cual se incrementan a partir de la segunda semana y no sólo en la cantidad de hormona, sino también en el número de



pulsos/ 6 horas. Estos cambios pueden explicarse por la relación existente entre el número de células de Leydig y la disminución de los perfiles de testosterona circulante. Hay que recordar que las hormonas testosterona y Hormona Luteinizante están reguladas mediante un mecanismo de retroalimentación negativa y que al disminuir los niveles de testosterona, no existe un efecto de retroalimentación negativa de la testosterona sobre el eje hipotalámico - hipofisario y la secreción de LH es continua, coincidiendo con lo reportado por Byers y Glover 1984.

## VI. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en las que se realizó el presente trabajo, se concluye que el incremento de la temperatura testicular en carneros con bolsas térmicas produce:

- Cambios en las características clínicas, seminales y endocrinas que se producen a partir de la segunda semana
- Disminución de la circunferencia escrotal a partir de la tercera semana.
- No se registran cambios en la consistencia testicular, compatibles con evaluaciones clínicas de anomalías testiculares.
- No se registran cambios significativos en el volumen del eyaculado.
- Cambios en la concentración de espermatozoides desde la primera semana, siendo estadísticamente diferentes a partir de la tercera semana.
- Disminución de la motilidad masal a partir de la primera semana y llega a estar ausente a partir de la segunda semana. Similar cambio se registra en motilidad individual.
- Incremento del porcentaje de espermatozoides anormales a partir de la tercera semana y las principales anomalías corresponden a cabezas solas, cola doblada y gota citoplasmática.
- Disminución de las concentraciones hormonales de testosterona a partir del segundo muestreo (día 7 pos aislamiento), similares cambios se producen en la concentración de LH y número de pulsos/ 6 horas.

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. Abdou MS, Hassun TM, El-Sawaf SA. 1978. Testicular and epididymal sperm numbers and related parameters in the developing awassi ram. *Aust. J. Biol. Sci.* 31: 257-266.
2. Agarwal A, Said TM. 2003. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update.* 9:331-45.
3. Aitken RJ, Baker MA. 2004. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev.* 16:581-8.
4. Aitken RJ, Baker MA. 2006. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol.* 250:66-9.
5. Ammann RP. 1981. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics *Journal of Andrology* 2: 37-58.
6. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H, Parkinson TJ. 1996. *Veterinary Reproduction and Obstetrics.* Seventh Edition. W.B. Saunders. 726 p.
7. Austin and Short 1984. *Reproduction in Mammals: Volume 3, Hormonal Control of Reproduction.* Ed. Cambridge University Press pp. 260.
8. Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT. 2005. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction.* 129:505-14.
9. Baker MA, Aitken RJ. 2005. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 3:67.
10. Bielli A. 2002. Regulacion Homonal de la funcion reproductiva en el macho EN: Reproducción en los animales domésticos Rodolfo Ungerfeld (Ed) Tomo 1 pp 79-92.

11. Blackshaw AW. 1977. Temperature and seasonal influences. IN the testis Vol 4 pp 517 - 545. Eds. W.D. Gomes & A.D. Johnson. Academic Press. New York.
12. Braden AWH, Mattner PE. 1970. The effects of scrotal heating in the ram on semen characteristics, fecundity, and embryonic mortality. *Aust J Agric Res.* 21:509–518.
13. Brito L, Silva A, Rodriguez LH, Vieira FV, Deragon AG, Kastelic JP. 2002. Effect of age and genetic group on characteristics of scrotum, testis and testicular vascular cone and on sperm production and semen quality of AI Bulls in Brazil. *Theriogenology* 58:1175-1186.
14. Byers SW. 1984. Effect of scrotal insulation on the ability of rams testes to produce testosterone in vitro. *J. Reprod. Fert.* 71: 17 - 21
15. Byers SW, Glover TD. 1984. Effect of scrotal insulation on the pituitary - Testicular axis of the ram. *J. Reprod. Fert.* 71: 23 – 31.
16. Boe-Hansen GB, Christensen P, Vibjerg D, Nielsen MB, Hedeboe AM. 2008. Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology.* 69:728-36.
17. Campos MB, Vitale ML, Calandra RS, Chiocchio SR. 1990. Serotonergic innervations of the rat testis. *J.Reprod. Fert.* 88: 475 -479.
18. Carmenate CY, Hernández JJ. 1982. Comportamiento de las características físicas y morfológicas del semen ovino durante las diferentes épocas del año. *Rev Cub. Reprod. Anim.* 8 (1): 17 - 29.
19. Carr WR, Land RB. 1975. Plasma luteinizing hormone levels and testis diameters of ram lambs of different breeds. *J. Reprod. Fertil.* 42: 325-333.
20. Castrillejo A, Moraña A, Bielli A, Gastel T, Molina JR, Forsberg M, Rodríguez - Martinez H. 1995. *Acta Vet. Scand.* 36: 161 - 173.
21. Chenoweth PT, Ball L. 1980. Breeding soundness evaluation in bulls. IN *Current therapy in theriogenology.* Ed. By D.A. Morrow, USA pp 330 - 339.
22. Collins PM, Collins WP, McNeilly AS, Tsang WN. 1978. Plasma FSH, LH and Testosterone levels in the male rat during degeneration of the epithelium caused by severe heat treatment or ligation of the vasa efferentia. *J. Reprod. Fert.* 54: 285 - 291.
23. Courot M, Ortavant R. 1981. Endocrine control of spermatogenesis in the ram. *J. Reprod. Fertil.* 30: 47-60, Suppl.

24. Coulter G, Kastelic J. 1993. Fisiología de la espermatogenesis y la regulación de la temperatura testicular en el toro: En: Simposio Internacional de Reproducción Animal 2-4 Junio, Córdoba – Argentina.
25. Coy P. 1995. Reproducción en ovejas y cabras. En: Garcia S., A.; Castejón M., F.; de la Cruz P., L.; Gonzalez G., J.; Murillo L. y M.; Salido R., G. (eds). Fisiología Veterinaria. Mc Graw-Hill – Interamericana, Madrid, pp 937-950.
26. Davis JR, Horowitz AM. 1978. Effects of various exposure times to hyperthermia and hypothermia on spontaneous contractions of the adults rabbit isolated testicular capsule. *Biology Reprod.* 21: 413 - 417.
27. Davis JR, Langford GA. 1969. Response of the testicular capsule to acetylcholine and noradrenaline. *Nature* 222: 386 - 387.
28. Davis JR, Langford GA. 1969. Response of the testicular isolated capsule of the rat to autonomic drugs. *J. Reprod. Fert.* 19: 595 - 598.
29. Davis JR, Langford GA. 1971. Comparative response of the isolated testicular capsule and parenchyma to autonomic drugs. *J. Reprod. Fertil.* 26: 241 - 246.
30. Derivaux J. 1982. Evaluación de la fertilidad masculina. En: Reproducción de los animales domésticos 2da. Ed. España Acribia pp. 144 – 168.
31. D’Occhio MJ, Schanbacher BD, Kinder JE. 1982. Testosterone feedback on FSH secretion in male sheep. *J. Reprod. Fert.* 66: 699-702.
32. Dufour JJ, Fahmy MH, Minvielle F. 1984. Seasonal changes in breeding activity, testicular size, testosterone concentration and seminal characteristics in rams with long or short breeding season. *J. Anim. Sci.* 58: 416-422.
33. Dutt RH, Hamm PT. 1957. Effect of exposure to high environmental temperature and shearing on semen production of rams in winter. *J. Anim. Sci.* 16: 328 - 334.
34. Eddy EM, O’Brien DA. 1994. The spermatozoa. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E. Neil DJ (Eds). Raven Press Ltd. NY EEUU.
35. Ellis LC, Buhrlay LE, Hargrove JL. 1978. Species differences in contractibility of seminiferous tubules and tunica albuginea as related to sperm transport through the testis. *Arch. Andrology.* 1: 139 - 146.
36. Flores JM, Sánchez MA, Rodríguez A, Mateos RE. 1996. Histopathological alterations of lamina propria and sertolli cells in severe testicular hypoplasia in polled goats. *Reprod. Dom. Anim.* 31: 349 - 352.

37. Finocchiaro R, Van Kaam JB, Portolano B, Misztal I. 2005. Effect of heat stress on production of Mediterranean dairy sheep. *J. Dairy Sci.*, 88: 1855-1864.
38. Fuentes V, Sánchez V, González H, Fuentes P, García A, Rosiles R. 1997. La función endocrina del testículo en el carnero criollo mexicano durante las diferentes épocas del año y su control opioidinérgico durante el anestro. *J. Vet. Med.* 44: 259-563.
39. Gallegos SJ, Malpaux B, Thiery JC. 1998. Control of pulsatile LH secretion during seasonal anoestrus in the ewe. *Reprod. Nutr. Dev.* 38: 3-15.
40. Garner DL, Háfes ESE. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. En: Háfes ESE. and Háfes B (eds)., *Reproduction in farm animals*, 7 th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 96-109.
41. Galloway D. 1997. Some aspects of male reproductive physiology. IN *Memorias I Symposium Internacional: Avances en reproducción de rumiantes*. APPA, Lima.
42. Galloway DB, Wright PJ, De Kretser D, Clarke IJ. 1992. An Outbreak of gonadal hypoplasia in a sheep flock: clinical, pathological and endocrinological features and aetiological studies. *Vet. Record* 131: 506 - 512.
43. George FW, Wilson JD. 1994. Sex determination and differentiation. IN: Knobil E. And Neill J.D. *The Physiology of the reproduction* Vol. 1. Second Edition. Raven Press.
44. Gil J. 2002. El espermatozoide, desde la espermiación hasta la fecundación. En: *Reproducción en los animales domésticos TOMO 1*: Ed. Rodolfo Ungerfeld pp 93 – 111.
45. Gomes WR, Buttler WR, Johnson AD. 1971. Effect of elevated ambient temperature on testis and blood levels and in vitro biosynthesis of testosterone in the ram. *J. Anim. Sci.* 33:804 - 807.
46. Gokdal O, Atay O, Kum S, Yilmaz A, Eren V. 2012. The Effects of Supplemental Vitamin E on Reproductive Development of Prepubertal Karya Male Lambs. *Egyptian Journal of Sheep & Goat Sciences*, Vol. 7 (1), P: 11-17, 2012.
47. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. 1993. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.* 53:1945-51.
48. Griswold MD 1993. Action of FSH on Mammalian Sertolli cell. En: *The sertolli cell* Russell LD, Griswold MD Eds. Cache River Press. Clearwater FL, EEUU.

49. Guyton A, Hall J. 2000. Tratado de Fisiología Médica. Mc Graw-Hill – Interamericana de España, Madrid. 10a edición, pp 1280.
50. Hansen P. 2009. Effects of heat stress on mammalian reproduction. Review Phil. Trans. R. Soc. B. 364, 3341–3350.
51. Heldmaier G, Ortmann S, Elvert R. 2004. Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. Respir. Physiol. Neurobiol. 141, 317–329.
52. Hochereau - de - Reviere MT, Locatelli A, Perreau C, Pisselet C, Setchell BP. 1993. Effect of a single brief period of moderate heating of the testes on seminiferous tubules in hypophysectomized rams treated with pituitary extract. J. Reprod. Fert. 97: 381 - 387.
53. Howles CM, Craigon J, Haynes NB. 1982. Long-term rhythms of testicular volume and plasma prolactin concentrations in rams reared for 3 years in constant photoperiod. Journal of Reproduction and Fertility, 65: 439-446.
54. Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS. 2005. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril*. 84:130-40.
55. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. 1999. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Reprod*. 61:393-9.
56. Ibrahim SA. 1997. Seasonal variations in semen quality of local and crossbred rams raised in the United Arab Emirates. Anim. Reprod. Sci. 49, 161 - 167.
57. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. 2000. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*. 21:33-44.
58. Karagiannidis A, Varsakeli S, Alexopoulos C, Amarantidis I. 2000. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. Small Ruminant Research 37: 125 -130
59. Kastelic JP, Coulter GH, Cook RB. 1995. Scrotal surface, subcutaneous, intratesticular, and intraepididymal temperature in bulls. Theriogenology 44: 147 – 152.
60. Kastelic JP, Cook RB, Coulter GH. 1997. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. Anim Reprod Sci, 45:255-261.

61. Kastelic JP. 2001. Termorregulación del testículo del toro En Cuarto simposio Internacional de Reproducción Animal 22-24 Junio, Córdoba –Argentina.
62. Kasimanickam RV, Kasimanickam CD, Thatcher W, Nebel RL, Cassell BG. 2006. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. *Theriogenology*.67:4:1004-1012.
63. Knight TW. 1972. A study of factors which affect the potential Fertility of the ram. PhD Thesis, University of Western Australia.
64. Land RB and Carr WR. 1975. Testis growth and plasma LH concentration following hemicastration and its relation with female prolificacy in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 45: 495-501.
65. Langford GA, Shrestha JNB and Marcus GJ. 1989. Repeatability of scrotal size and semen quality measurements in rams in a short-day light regime. *Anim. Reprod. Sci.* 19: 19-27.
66. Lewis SE and Aitken RJ. 2005. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res.* 322:33-41.
67. Lindsay DR, Pelletier J, Pisselet C and Courot M. 1984. Changes in photoperiod and nutrition and effect on testicular growth of rams. *J. Reprod. Fertil.* 71:351-356.
68. Lincoln GA and 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.
69. Lincoln GA, Lincoln CE and MacNeilly AS. 1990. Seasonal cycles in the plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in ram of wild, feral and domesticated breeds of sheep. *J. Reprod. Fertil.* 88: 623-633.
70. Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS, Im P, Taing KS, Bui T, Leung A, Wang C. 1999. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology.* 140:1709-17.
71. MacLaren APC. 1988. Ram Fertility in south-west Scotland. *British Vet. J.* 144:45-54.



72. McGowan M, Galloway D, Taylor E, Entwistle K, Johnston P. 1995. The veterinary examination of bulls. Australian Association of Cattle Veterinarian. Indooroopilly Q 4068, Australia.
73. Mandiki SNM, Derycke G, Bister JL, Paquay R. 1998. 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, semen quality and reproductive capacity. *Small Rumin. Res.* 28, 67 - 79.
74. Manicardi GC, Tombacco A, Bizzaro D, Bianchi U, Bianchi PG, Sakkas D. 1998. DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem J.* 30:33-9.
75. Martin GB, Tjondronegoro S, Blackberry MA. 1994. Effect of nutrition on testicular size and the concentration of gonadotrophins, testosterone and inhibin in plasma of mature male sheep. *J. Reprod. Fertil.* 101:121-128.
76. McLachlan RI, Wreford NG, Robertson DM, De Kretser DM. 1995. Hormonal control of spermatogenesis *TEM* 6:95-101.
77. McCarthy S, Ward WS. 2000. Interaction of exogenous DNA with the nuclear matrix of live spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 56:235-7.
78. Mickelsen WD, Paisly LG, ahmen JJ. 1982. Seasonal variation in scrotal circumference, sperm quality, and sexual ability in rams. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181: 376-380.
79. Morrell JM, Johannisson A, Dalin AM, Hammar L, Sandebert T, Rodriguez-Martinez H. 2008. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Vet Scand.* 50:2.
80. Nunez JF, Dias Silva AEF, Riera S, De Assis Melo F, Ponce de León FA. 1994. Preliminary report on observed differences in goat sperm characteristics based on scrotal morphology. *Reprod. des Rumin. In zone tropicale* 8 - 10 junio.
81. Nowakowski, P., Cwikla, A., 1994. Seasonal variation in testis size in Polish Merino rams and its relationship to reproductive performance in spring. *Theriogenology* 42, 613±622.
82. Ortavant, R., Boquier, F., Pelletier, J. Thimonier, J. and Volland-Nail, P. 1988. Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod. *Aust. J. Biol. Sci.* 41:69-85.

83. Ozawa, M., T. Matsuzuka, M. Hirabayashi, and Y. Kanai. 2004. Redox status of the oviduct and CDC2 activity in 2-cell stage embryos in heat-stressed mice. *Biol Reprod.* 71:291-6.
84. Paul, C., A.A. Murray, N. Spears, and P.T. Saunders. 2008. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction.* 136:73-84.
85. Panter K.E.; Lames L.F.1989. Transient testicular degeneration in rams fed locoweed (*Astragalus lentiginosus*). *Vet. Hum. Toxicol* 31 (1) :February 1989.
86. Pérez, C. R., Forsberg, M. and Rodriguez, H. M. 1998. Seasonal variation in live weight, testis size, testosterone, LH secretion, melatonin and thyroxine in Merino and Corriedale rams in subtropical climate. *Acta Vet. Scand.* 39:35-47.
87. Pérez-Crespo, M., Pintado, B. & Gutiérrez-Adán, A. 2008. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Mol.Reprod. Dev.* 75, 40–47.
88. Pendersen RA, Burdsal CA 1994. Mammalian embryogenesis. En: *The Physiology of the reproduction* Vol. 1. Knobil E. And Neill J.D. Second Edition. Raven Press.
89. Perreault, S.D., R.J. Aitken, H.W. Baker, D.P. Evenson, G. Huszar, D.S. Irvine, I.D. Morris, R.A. Morris, W.A. Robbins, D. Sakkas, M. Spano, and A.J. Wyrobek. 2003. Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Adv Exp Med Biol.* 518:253-68.
90. Pomares CC; Galloway DB; Holmes JHG ; Clarke IJ; Tilbrook A.J. 1995. Lupin and cowpea supplements for growth, wool production and reproduction in rams. *Aust. J. of Exp. Agric.* 35: 447 - 452
91. Prabhakar J.; Chimbombi M.; Malmgren L.and Fredriksson. 1990. Effects on testosterone and LH concentrations of induced testicular degeneration in Bulls. *Acta Vet Scand.* 31: 505 - 507.
92. Rege, J. E., Toel, F., Mukasa-Mugerwa, E., Tembely, S., Anindo, D., Baker, R. L. and Lahlou-Kassi, A. 2000. Reproductive characteristics of Ethiopian highland Sheep. II. Genetic parameters of semen characteristics and their relationships with testicular measurements in ram lambs. *Small Rumin. Res.* 37: 173-187.
93. Rhim T.J., Kuehl D., Jackson GL 1993. Seasonal changes in the relationships between secretion of GnRH, LH and Testosterone in the rams. *Biology of reproduction*, 48: 197-204.

94. Rockett, J.C., F.L. Mapp, J.B. Garges, J.C. Luft, C. Mori, and D.J. Dix. 2001. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biol Reprod.* 65:229-39.
95. Ronchi B, Stradaioli G, Verini Supplizi A, Bernabucci U, Lacetera N, Accorsi PA, Nardone A and Seren E 2001. Influence of heat stress and feed restriction on plasma progesterone, estradiol-17b, LH, FSH, prolactin and cortisol in Holstein heifers. *Livestock Production Science* 68, 231–241.
96. Rodriguez-Martinez, H. 2007. State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod Fertil Dev.* 19:91-101.
97. Sanford, L.M., Howland, B. E. and Palmer, W. M. 1984. Seasonal changes in the endocrine responsiveness of the pituitary and tests of male sheep in relation to their patterns of gonadotropic hormone and testosterone secretion. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62:827-833.
98. Sanford, M. L. and Baker, J. S. 1990. Enhanced testosterone secretion in adult rams after establishment of a high-frequency, low-amplitude pattern of LH pulses in the nonbreeding season occurs without changes in the number or binding affinity of testicular LH receptors. *Acta Endocrinol.* 122: 55-61.
99. Sar M, Hall SH., Wilson EM, French FS, 1993. Androgen regulation of sertoli cells. En: *The sertolli cell* Russell LD, Griswold MD Eds. Cache River Press. Clearwater FL, EEUU.
100. Sakkas, D., O. Moffatt, G.C. Manicardi, E. Mariethoz, N. Tarozzi, and D. Bizzaro. 2002. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod.* 66:1061-7.
101. Schanbacher, B. D. and 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.
102. Setchell B.P. 1978. *The Mammalian Testis*. First Edition. London.
103. Setchell B.P. 1987. Spermtogenesis and spermatozoa IN : *Germ cells and fertilization. Reproduction in mammals.* ED.- by C.R. Austin and Short. Geat Britain. Cambridge University Press. pp 63 - 101.
104. Setchell B.P. 1998. The parkes lecture. Heat and the testis. *J. Reprod. fert.* 114 : 179 - 194.
105. Setchell B.P.; Maddocks S. and Brooks D.E. 1994. *Anatomy, Vasculature, Innervation, and fluids of the Male Reproductive Tract.*..1063 - 1047. IN: *Knobil*

- E. And Neill J.D. The Physiology of the reproduction Vol. 1. Second Edition. Raven Press.
106. Setchell BP 2006. The effects of heat on the testes of mammals. *Anim. Reprod.* v.3, n.2, p.81-91.
  107. Sharpe RM 1994. Regulation of the spermatogenesis. EN: The physiology of Reproduction Knobil, E. Neill JD (Eds.) Raven Press Ltd. NY EEUU.
  108. Sharpe, R. & Bartlett, J. (1985) Intratesticular distribution of testosterone in rats and the relationship to the concentrations of a peptide that stimulates testosterone secretion. *Journal of Reproduction and Fertility*, 73, 223–236.
  109. Simplicio, A. A. Riera, G. S., Nelson, E. A. and Pant, K. P. 1982. Seasonal variation in seminal and testicular characteristics of Brazilian Somali rams in the hot semiarid climate of tropical northeast Brazil. *J. Reprod. Fertil.* 66:735-738.
  110. Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. 1999. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Review of reproduction* 4:38-47
  111. Soderquist L. 1998. Reduced fertility after artificial Insemination in a ram with a high incidence of knobbed acrosome. *Veterinary record.* 143: 227 - 228.
  112. Sorensen A.M. 1991. Reproducción animal. Principios y Prácticas. México. McGraw - Hill 539 pp.
  113. Spano, M., E. Seli, D. Bizzaro, G.C. Manicardi, and D. Sakkas. 2005. The significance of sperm nuclear DNA strand breaks on reproductive outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 17:255-60.
  114. Spano, M., J.P. Bonde, H.I. Hjollund, H.A. Kolstad, E. Cordelli, and G. Leter. 2000. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril.* 73:43-50.
  115. Tesarik, J., R. Mendoza-Tesarik, and C. Mendoza. 2006. Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online.* 12:715-21.
  116. Thatcher W.W. and Hansen P.J. 1993. Environment and reproduction in: *Reproduction in domestic animal.* Ed. G.J. King. Elsevier. Amsterdam. 433 - 437.
  117. Ronchi S.; Martin G.B. Sutherland R.D. and Boukhliq R. 1996. Interactions between nutrition, testosterone and Inhibin in the control of gonadotrophin secretion in immature rams. *Reprod. Fert.Dev.* 8: 855 - 862.

118. Ungerfeld R. 2002. Termorregulación testicular. En: Reproducción en los animales domésticos Rodolfo Ungerfeld (Ed) Tomo 1 pp 114-118
119. Vandemark N.L. & Free M.J. 1970 Temperature effects In the Testis vol 3 pp 233 - 312. Eds- A.D. Johnson, W.D. Gomes & N.L. Vandemark. Academic Press, New York.
120. Wang, X., R.K. Sharma, S.C. Sikka, A.J. Thomas, Jr., T. Falcone, and A. Agarwal. 2003. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril.* 80:531-5.
121. Wahid S.A, and Yanus J.M. 1994. Correlation between testicle measurements and libido and semen quality in rams. *Asian Aust. J. of Anim Sci.:*2, 175 - 178
122. Waites G.M.H. and Setchell B.P. 1964. Effect of local heating on blood flow and metabolism in the testis of conscious ram. *J. Reprod. Fert.* 8: 339 - 349
123. Watson E.D.; Clarke C.J. Else R.W. and Dixon P.M. 1994. Testicular degeneration in 3 stallions. *Equine Vet. Joun.* 26(6) 507 - 510
124. Werenko D. ; Nowakowski P. And Cwikla AS. 1994. The relationship between the reproductiveness of ewes and testicle size of related rams. *J. Anim. and Feed. Sci.* 3:3, 171 - 180.
125. Wells, P.G., P.M. Kim, R.R. Laposa, C.J. Nicol, T. Parman, and L.M. Winn. 1997. Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutat Res.* 396:65-78.
126. Wierzbowski S. and Kareta W. 1993. An Assessment of sperm estimation for evaluation in rams. *Theriogenology* 10: 205 - 209.
127. Wildeus S. and KW Entwistle 1986. Effects of scrotal insulation and unilateral vasoligation on ejaculate characteristics ad sperm reserves in the bull. *Anim. Reprod. Sci.* 10: 11 - 21
128. Williamson P. 1974. The fine structure of ejaculated ram spermatozoa following scrotal heating. *J. Reprod. Fert.* 40: 191 - 195.
129. Yaeram, J., B.P. Setchell, and S. Maddocks. 2006. Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. *Reprod Fertil Dev.* 18:647-53.
130. Yanamigachi R. 1994. Mammalian fertilization. En: *The Physiology of Reproduction.* Knobil E. Neil DJ (Eds). Raven Press Ltd. NY EEUU.

131. Zhu, B., S.K. Walker, H. Oakey, B.P. Setchell, and S. Maddocks. 2004. Effect of paternal heat stress on the development in vitro of preimplantation embryos in the mouse. *Andrologia*. 36:384-94
132. Zini, A., R. Bielecki, D. Phang, and M.T. Zenzes. 2001. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril*. 75:674-7.
133. Zini, A., and J. Libman. 2006. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *Cmaj*. 175:495-500.