



**universidad
de león**

TESIS DOCTORAL

**Aplicación de la ultrasonografía en la evaluación
andrológica del semental ovino**

**Application of ultrasonography in the andrological
evaluation of ram**

Rafael Montes Garrido

Programa de Doctorado: Ciencias Veterinarias y de los Alimentos

Tutor: Luis Anel Rodríguez

**Directores: Luis Anel Rodríguez, María Mercedes Álvarez García y Luis
Anel López**

LEÓN, 2024

A mis padres

A mi hermana

“Es en el dar que recibimos”

San Francisco de Asís

Per aspera ad astra

Ad augusta per angusta

Agradecimientos

Intentar resumir en unas palabras la sensación de agradecimiento hacia todas y cada una de las personas que han participado de una manera o de otra en esta Tesis Doctoral se me hace muy difícil, más aún si cabe añadiendo un nudo en la garganta y una obnubilación mental. Ha sido una etapa dura, de formación constante y de sacrificios ya no solo míos, sino de los míos. Y cuando tu gente ha demostrado, ya no solo puntualmente, sino de manera constante, lo que les importas y la capacidad de sacrificio muchas veces sin saber por qué, no hay palabras de agradecimiento suficientes ni hechos en la vida que me quede para saldar la deuda que tengo con todos vosotros. En estos años habéis conseguido que recuerde una de las etapas más bonitas y la vez más duras, como la etapa en la que más acompañado me he sentido y, en muchas ocasiones, estando sin necesidad de estar cerca.

A continuación, voy a intentar expresar mi agradecimiento a todas y cada una de las personas que habéis formado parte de esta Tesis Doctoral. Porque sí, esta tesis también es vuestra ya que yo no soy sin vosotros.

En primer lugar, agradezco a la Universidad de León, al Ministerio de Economía, Comercio y Empresa, al Ministerio de Ciencia e Innovación, a la Junta de Castilla y León y al Fondo Social Europeo como fuentes de financiación. Quiero agradecer a mis directores de Tesis, Luis Anel Rodríguez (AR), Mercedes Álvarez García y Luis Anel López (AL). Gracias por darme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral y esta etapa de formación ya no solo en lo que compete a esta tesis, sino en docencia, investigación y clínica. Me habéis permitido formarme en las tres patas fundamentales para ser un profesional completo en el área de conocimiento en el que trabajamos y habéis conseguido despertar en mí el interés en todas ellas. Luis AR, te admiro como docente e investigador y me has enseñado el camino para buscar el equilibrio, ahora está en que sea posible, aunque espero que por falta de intención y ganas no sea. Luis AL, gracias por tu apoyo en esta etapa y por tu ayuda en aquellos aspectos en los que no domino, siempre con un trato cercano y amable. Merce, siempre has sido mi apoyo durante esta etapa en lo profesional y en lo personal. Gracias por ser un ejemplo para mí por tu dedicación, tus consejos, tus ganas de mejorar y por seguir siendo (como ya dije hace unos años) la mejor expresión del término que rige esta profesión: VOCACIÓN.

A los integrantes del grupo ItraULE. A Paulino, muchas gracias por tu ayuda, apoyo y confianza. Hay cosas que nunca olvidaré. A Juan Carlos Boixo, fuente de sabiduría académica y popular. A María Patrocinio, gracias por tus broncas, tus consejos y tus tortillas (espero poder seguir comiéndolas). A Aino, muchas veces mi sostén durante las fases más duras de la parte experimental, día y noche sacando semen. A Ceci, gracias por enseñarme a que nada es tan grave o a ver que lo que sí es grave, no tiene por qué serlo para todo el mundo. A Victoria, por tu ayuda y colaboración, una visión con perspectiva siempre ayuda. A Pedro, gracias por muchas cosas. Porque jamás me has dicho que no a ayudarme en algo, pero sobre todo por tu actitud, eres un ejemplo para mí en ese aspecto y espero que cuando leas esto sea riendo, como siempre, porque no hay temporal que no capees sacando el lado bueno. A Soriano-Úbeda, con tilde y con carácter murciano, savia nueva y ganas de tirar para adelante. Gracias por enseñarme a buscar lo justo, ni más ni menos. A Marta Neila, mi fiel compañera de pupitre en estos tediosos años de laboratorio, consulta, viajes, campo, quirófano y despacho. Gracias por complementarme laboralmente hablando, no sé lo que nos deparará el futuro, pero desde luego, si se separan los caminos espero que nosotros no lo hagamos ni profesional ni personalmente, tendría que reconocerte que te echaría de menos. A Cristi, compañera de carrera, colega de profesión y amiga de corazón. Gracias por entenderme en estos años y mirar por mi bienestar, eso solo lo hacen las buenas personas de verdad. Muchos años compartidos y, quien sabe, puede que nos queden otros tantos o que mañana nos separemos. Sea lo que sea, aquí tienes a un amigo más allá de un compañero de trabajo. Y por último en este apartado y, evidentemente, no por ello menos importante, quiero agradecer a Marta F. Riesco. Jefa, compañera de trabajo, amiga y una hermana mayor para mí. Vas delante, marcas camino y además ayudas a ver y a caminar a quien tienes al lado para seguir avanzando.

A la Asociación Española de Reproducción Animal y a sus socios, por permitirme complementar mi formación investigadora.

Bien, llegados a este punto, para poder desarrollar esta tesis, se necesita una infraestructura. Gracias en primer lugar a la Universidad de León, en segunda instancia a la Facultad de Veterinaria y, por último, al Hospital

Veterinario y a la Granja de la Universidad. Gracias a todas y cada una de las personas que lo forman con las que he tenido el placer de cruzarme y que de una manera u otra han colaborado y me han ayudado. A Maite, a la cabeza de esta nuestra Facultad por tantos años de trato cercano hacia mí. A todo el personal de la Facultad, personal de administración y servicios, personal de limpieza y profesorado. Sois muchos con los que he podido tener trato durante estos años y de los que he intentado aprender todo lo posible. Al personal del Hospital Veterinario y de la Granja de la Universidad, gracias por vuestra ayuda y vuestro tiempo, habéis formado parte de mi aprendizaje.

Quiero agradecer al CENSYRA, OVIGEN y ASSAF.E la colaboración durante estos años para poder realizar las diferentes experiencias de campo. Gracias a todo el staff que lo forma.

Y por supuesto, muchísimas gracias al eslabón imprescindible para poder desarrollar esta Tesis Doctoral: LOS GANADEROS. Sin vosotros y la colaboración de los colegas veterinarios de campo con los que hemos tenido la suerte de colaborar, esta tesis y, esta etapa de mi vida, no habría tenido sentido. A Pablo, Nico, Jesús, Gelo, Eduardo, Narci, José Antonio, Pío, Javi, Paco, Iván, Luis, Rubén, Tarzán... muchas gracias por vuestra colaboración y el trato recibido, espero que sigamos manteniendo el vínculo y que podamos trabajar juntos en el futuro.

Al Parque de la Naturaleza de Cabárceno por la colaboración estos años y permitirme complementar mi formación. Un agradecimiento especial a Santi, Patri y Prieto.

En esta tesis tuve la suerte de poder disfrutar de una estancia en uno de los países más increíbles del mundo, un país de contrastes y lleno de buena gente, Brasil. Es así que estoy muy agradecido al Dr. Arlindo A. Moura, por la oportunidad de formar parte de tu laboratorio y tu acogida como uno más. A Denise y Gildas por el recibimiento a Fortaleza y vuestra disposición de ayudar durante toda la estancia. A Wallison, por tus colectas de semen y tu afán por apropiarte de mis ovejas, aún te estoy esperando amigo para que dirijas la Fazenda. A Eduardo, por enseñarme que la Macarena es internacional. Ahora en tu estancia en España espero que tengamos algún momento para recordar

el día de las 4 caipiriñas x 2 además de intentar hacer ciencia, con la dificultad que conlleva. A Monica Khala y su familia, por su hospitalidad y por darnos a conocer a Grazi. Gracias por demostrar que se puede tener un corazón que no te cabe en el pecho, te deseo lo mejor y estoy deseando asistir a tu boda.

Y por supuesto, y como no podía ser de otra manera, quiero agradecer a todos y cada uno de los alumnos con los que he tenido la oportunidad de compartir tiempo durante las prácticas de las diferentes asignaturas. Ha sido para mí un placer disfrutar de ese tiempo y, aunque el camino posiblemente sea hacia un futuro de incertidumbre en cuanto al sistema educativo por el absentismo en las sesiones magistrales y el poco interés en las clases prácticas, aun guardo un rayo de esperanza al ver la cantidad de alumnos voluntarios que me he encontrado para hacer prácticas y ayudarme con una de las especies menos atractivas para ellos, la ovina. Porque sí, también habéis formado parte de esta Tesis Doctoral porque también me habéis ayudado de primera mano muchos de vosotros, los alumnos. Gracias a vosotros, durante esta etapa me he intentado formar en una de las facetas que no consideraba que pudiese sentirme cómodo por desconocimiento, y es la docencia. Me habéis hecho sentir realizado.

Entrando en lo personal y relacionando con uno de los consejos de mi director de Tesis, el equilibrio se consigue con una estabilidad profesional y personal. Es por esto que en esta sección de los agradecimientos quiero focalizar en aquellas personas que, aun siendo la mayoría de ellas ajenas a mi ámbito profesional, me han sustentado en lo personal para poder llegar a la etapa donde nos encontramos.

Empezando por el principio, ahí es donde quiero situar a las dos personas que me dieron la vida y que me han acompañado durante todo mi camino académico. Siempre firmes, incansables y siendo un ejemplo en la lucha diaria por sacar adelante familia y negocio, ambos de la mano con las dificultades que ello supone. Gracias. A mi padre, un agradecimiento especial por poner a nuestra disposición los animales de nuestra explotación para cualquier experimento que se terciase y a mi madre, un agradecimiento especial por ser tú misma, por luchar y por ser la mejor persona que conozco. A los dos, por ser

ejemplo y bastión. Y, por supuesto, muchísimas gracias a mi hermana. Eres una mujer hecha y derecha con los pies en la tierra y, aun siendo la pequeña de la familia, me queda mucho por aprender de ti.

A mi familia, mis tíos, mis primos, mi abuela y los que ya no están que me han dado fuerzas desde donde estén. Gracias por aguantar en esta etapa el vernos poco, pero aprovechar conmigo el poco tiempo que tuviéramos. Entendisteis que la situación lo requería y colaborasteis para poder concluir esta etapa.

A mis amigos de Segovia, a los de siempre, gracias porque habéis aguantado viéndome algún día suelto en estos últimos años y, aun así, seguís ahí.

A mis amigos de León, algunos aún conmigo por aquí y otros desperdigados por el mundo. Gracias por compartir esta etapa y gracias por recordarme de vez en cuando que “al que vuela sin alas, no le pueden vencer”. Sois muchos los que me habéis ayudado en esta etapa y os estaré eternamente agradecido, sois familia. A los Sergios, Lidias, Laura, Sandra, Cris, Aza, Pablo, Carlos, Juanqui, Miguel, Javis, Marina...

A vosotras.

Y no podía faltar en esta sección de agradecimientos los que no. Los que no son ese grupo de personas que durante toda mi vida han ido apareciendo y aportando su granito de arena en el montón opuesto de la balanza con mensajes subliminales dejando caer que no, que no iba a conseguir ser veterinario, que no iba a ser doctor, que no iba a conseguir llegar más allá de no sé dónde ellos consideraban... Pero también quiero mencionarlos y agradecerles ese “apoyo” que me ha ayudado a sacar fuerzas muchas veces de donde no quedaban para continuar luchando. Esta gente, que muchos de los que estéis leyendo esto sabréis a quien me refiero porque alguna vez lo hemos comentado, han sido pieza clave para llegar hasta este punto. Espero que sigan existiendo para poder ir consiguiendo otras metas y quemando etapas, ¡gracias!

Antes de concluir quiero agradecer a las personas que me han acompañado en el día a día en esta última fase cuanto menos difícil y tediosa.

A Carlos, hijo y amigo; a Miguel Ángel, siempre con una carcajada; a Mónica, fiel confidente; a Emma, noble canaria y grandísima amiga; y a Maritere, sostén y apoyo incondicional. Me has ayudado en todo lo que has podido y más. Gracias por ser tú y ponerme los pies en la tierra incluso cuando no había terreno sobre el que sostenerse.

Y para concluir, haciendo homenaje a uno de los imprescindibles...

“A Dios porque, aunque no creo, le temo”, “Leña al mono” y “A zumbar el parche”.

Financiación y Becas

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el grupo de investigación Itra-ULE y los experimentos se han enmarcado dentro de tres proyectos: "Diseño de un panel de evaluación andrológica en el carnero" cuya referencia es LE253P18, financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo, ejecutado entre el 01/01/2019 y el 31/12/2021, con Luis Anel Rodríguez como investigador principal en la Universidad de León; "Estrategias para mejorar la eficacia de la inseminación artificial ovina" cuya referencia es AGL2017-83098-R, financiado por el Ministerio de Economía, Comercio y Empresa, ejecutado entre el 01/01/2018 y el 31/12/2021, con Luis Anel Rodríguez como investigador principal en la Universidad de León; y "Nuevas tecnologías aplicadas a la interpretación práctica de los déficits funcionales del espermatozoide de carnero durante la conservación líquida a 5 °C hasta 72 horas", cuya referencia es PID2021-122470OBI00, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER, UE), ejecutado entre el 01/09/2022 y el 31/08/2026, con Luis Anel Rodríguez y Luis Anel López como investigadores principales en la Universidad de León.

Rafael Montes Garrido disfrutó de un contrato como "Titulado Investigador Superior" financiado por el proyecto AGL 2017-83098-R desde el 01/10/2018 hasta el 26/06/2019. Además, el doctorando disfrutó de una beca de la Junta de Castilla y León destinada a financiar la contratación predoctoral de personal investigador cofinanciada por el Fondo Social Europeo PO 14-20, cuya referencia es Orden de 29 de octubre de 2018 de la Consejería de Educación para desarrollar esta tesis doctoral y abarcó desde el 27/06/2019 hasta el 13/06/2023. Por consiguiente, el estudiante de doctorado disfrutó de un contrato como "Titulado Superior Investigador" financiado por el proyecto "Omics for improving the effectiveness of germplasm banks: the Brown bear (*Ursus arctos*) model", cuya referencia es TED2021-130774B-I00 desde el 14/06/2023 hasta la actualidad. Por último, el doctorando también ha realizado una estancia corta en el grupo de investigación "Fisiologia e Ciências Ômicas" de la Universidad Federal de Ceará en Brasil, desde el 01/07/2022 hasta el 30/09/2022 a cargo del programa propio de Investigación de la Universidad de León "Ayudas a la Investigación 2022".

Listado de publicaciones

La presente Tesis Doctoral por compendio de publicaciones incluye los siguientes artículos científicos para su consideración:

- Rafael Montes-Garrido, Luis Anel-Lopez, Marta F. Riesco, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Cristina Soriano-Úbeda, Juan Carlos Boixo, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez. (2023). *Does size matter? Testicular volume and its predictive ability of sperm production in rams. Animals*, 13, 3204.

<https://doi.org/10.3390/ani13203204>

- Mohamed A. A. Hassan, Ramy K. A. Sayed, Mohammed Abdelsabour-Khalaf, Enas A. Abd-Elhafez, Luis Anel-Lopez, Marta F. Riesco, Cristina Ortega-Ferrusola, Rafael Montes-Garrido, Marta Neila-Montero, Luis Anel y Mercedes Alvarez. (2022). *Morphological and ultrasonographic characterization of the three zones of suprastesticular region of testicular artery in Assaf rams. Scientific Reports*, 12, 8334.

<https://doi.org/10.1038/s41598-022-12243-z>

- Rafael Montes-Garrido, Marta F. Riesco, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Juan Carlos Boixo, Paulino de Paz, Cristina Ortega-Ferrusola, Mohamed A. A. Hassan, Luis Anel y Mercedes Alvarez. (2022). *Application of ultrasound technique to evaluate the testicular function and its correlation to sperm quality after different collection frequency in rams. Frontiers in Veterinary Science*, 9, 1035036.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1035036>

Índice

Resumen	1
Summary	7
Introducción	13
Justificación y Objetivos	25
Metodología y Resultados	29
Publicación I	33
Publicación II	39
Publicación III	45
Discusión general	51
Conclusiones	73
Conclusions	77
Bibliografía	81
Anexo I	97
Listado de abreviaturas	111

Resumen



La evaluación andrológica en el carnero es una práctica necesaria en los machos donantes de semen de los centros de reproducción y mejora genética y en los sementales de las explotaciones para conocer y optimizar sus capacidades reproductivas y, en última instancia, conseguir aumentar sus tasas de fertilidad. En la presente Tesis Doctoral, se realizaron varias experiencias en este contexto que dieron lugar a tres artículos científicos.

En el primer trabajo, se optimizó el método para calcular el volumen testicular a través de la elección de la herramienta más precisa para la obtención de las medidas testiculares y de la propuesta de una nueva fórmula basada en dichas medidas. Además, se estudió la relación del volumen testicular con la producción espermática. Para ello, los testículos se midieron *in vivo* y *post mortem* comparando calibre clásico y electrónico (integrado en el equipo de ultrasonografía) y dichas medidas se utilizaron para calcular el volumen testicular que se relacionó con el volumen real calculado mediante desplazamiento de agua. Las mediciones ecográficas presentaron menores desviaciones estándar y permitieron proponer una nueva fórmula (Volumen testicular = profundidad testicular x anchura testicular x longitud testicular x 0,61) que fue la única que no presentó diferencias estadísticamente significativas con el volumen real. Además, y durante un periodo de 4 años, se agruparon los sementales de un centro de inseminación artificial en tres grupos dependiendo de la frecuencia de recogida seminal y la época del año, todo ello en el contexto del habitual funcionamiento del centro. En estos machos, se midieron el volumen testicular total (TTV), la concentración de testosterona sérica (T) y la producción espermática total (SPERM) de dos eyaculados consecutivos en el mismo día, y se estableció la relación entre dichos parámetros. La producción espermática mostró fuertes correlaciones positivas y significativas con el volumen testicular total ($r = 0.587$, época no reproductiva -NBS-; $r = 0.773$, época reproductiva, 10 eyaculados/semana -BS10-) y con la testosterona ($r = 0.684$, época reproductiva, 4 eyaculados/semana -BS4-) y, en base a ello, se establecieron tres fórmulas para predecir la producción espermática en relación a la época y a la frecuencia de recogida; SPERM ($\times 10^9$ spz) en NBS = $0,02226 \times \text{TTV (mL)} - 2,977$; SPERM ($\times 10^9$ spz) en BS10 = $0,01858 \times \text{TTV (mL)} - 2,873$; SPERM ($\times 10^9$ spz) en BS4 = $0,80850 \times \text{T (ng/mL)} + 2,819$.



En el segundo trabajo, se estandarizó la medición del flujo sanguíneo testicular en el carnero mediante el estudio de las características histológicas, morfológicas y ultrasonográficas de la arteria testicular en tres zonas diferentes: proximal, media y distal. Se midió el diámetro arterial y la hemodinámica incluyendo la velocidad sistólica máxima (PSV) y la diastólica final (EDV), los índices de resistencia (RI) y de pulsatilidad (PI), el flujo sanguíneo arterial total (TABF) y su ratio (TABF rate). La arteria en la imagen ecográfica se caracterizó por su alta tortuosidad, tendiendo a una menor sinuosidad según se aproxima al testículo. Además, se observó un aumento significativo del diámetro arterial, PSV, RI y PI en la región supratesticular proximal y un aumento progresivo de EDV, TABF y TABF rate según avanzaba la arteria hacia el testículo. Por otro lado, se realizaron estudios histológicos en las mismas zonas para el estudio morfométrico de las diferentes estructuras anatómicas de la pared arterial, así como un análisis inmunohistoquímico para conocer la expresión de α -actina del músculo liso (α -SMA) y vimentina. Los estudios histomorfológicos mostraron un diámetro mayor de la *vasa vasorum* en la túnica adventicia y de la pared arterial en la zona proximal, mientras que los diámetros arterial exterior y luminal interno fueron mayores en la zona distal. Por último, la expresión de α -SMA y vimentina, marcadores de las células musculares lisas de la túnica media, fue más alta en la zona proximal comparada con las zonas media y distal, lo que implica un mayor grosor de la pared vascular a ese nivel. De entre los dos puntos con resultados más consistentes y representativos (medio y distal), y aunque existen diferencias entre ellos, debido a la dificultad técnica de la medición de flujo en ese punto distal (imposibilidad de medida en algunos animales) y en aras de diseñar un protocolo más aplicable en campo, reproducible y rápido, se recomienda la zona supratesticular media.

En el tercer trabajo, se aplicó la ultrasonografía en la evaluación de la función testicular y su relación con la cantidad y calidad seminal utilizando como escenario práctico diferentes frecuencias de recogida seminal. Para esto, los carneros se sometieron a tres frecuencias de recogida seminal consecutivas, de intensidad creciente, de un mes de duración cada una (abstinencia -AF-, estándar -SF-, intensiva -IF-). Al final de cada periodo, se evaluaron el volumen testicular, la ecotextura del parénquima y la hemodinámica de la arteria



testicular. Asimismo, sobre muestras de semen refrigeradas (15 °C, 6h), se evaluó la producción, motilidad, viabilidad, apoptosis y actividad mitocondrial. Además, se establecieron correlaciones entre parámetros ecográficos y seminales. Nuestros resultados mostraron un aumento significativo de la ecotextura y la hemodinámica de la arteria testicular (PSV, RI, PI, TABF) cuando se intensifica la frecuencia de recogida seminal. Por el contrario, la motilidad y funcionalidad espermática disminuyeron significativamente. En cuanto a las relaciones entre parámetros, se encontraron correlaciones moderadas y positivas entre parámetros ecográficos (ecotextura y parámetros Doppler) y parámetros de motilidad espermática en SF. En la segunda parte del trabajo, se realizó un estudio de fertilidad en campo en el que se consideraron los días de abstinencia sexual previos a la recogida seminal con la que se elaboraron dosis y se realizaron inseminaciones cervicales en ovejas previamente sincronizadas. En este estudio, la fertilidad más elevada se obtuvo de machos que tuvieron entre 2 y 5 días de abstinencia entre recogidas seminales.

En resumen, la evaluación andrológica, a través de un estudio multiparamétrico que incluya una evaluación ultrasonográfica completa midiendo el volumen testicular con la fórmula ItraULE específica para ovino y la hemodinámica testicular en la zona supratesticular media, además de la valoración seminal, es una herramienta muy útil para categorizar a los carneros en función de su potencial de producción seminal y poder maximizar su rendimiento reproductivo con el fin de incrementar su fertilidad y por ende la productividad en las granjas.

Palabras clave:

Ultrasonografía, volumen testicular, Doppler, arteria testicular, flujo sanguíneo testicular, calidad espermática, carnero, evaluación andrológica, rendimiento reproductivo, inseminación artificial, fertilidad.

Summary



Andrological evaluation in rams is a necessary practice in semen donor males in breeding and genetic improvement centers and in farm rams to know and optimize their reproductive capacities and, ultimately, to increase fertility rates. In this Doctoral Thesis, several experiments were carried out in this context, which gave rise to three scientific articles.

In the first paper, the method for calculating testicular volume was optimized by choosing the most accurate tool for obtaining testicular measurements and proposing a new formula based on these measurements. In addition, the relationship between testicular volume and sperm production was studied. For this purpose, the testes were measured *in vivo* and *post mortem* by comparing classic and electronic calipers (integrated in the ultrasonography machine) and these measurements were used to calculate the testicular volume, which was related to the accurate testicular volume calculated by water displacement. Ultrasonographic measurements showed lower standard deviations and allowed proposing a new formula (Testicular volume = testicular depth x testicular width x testicular length x 0.61) which was the only one that did not show statistically significant differences with the accurate testicular volume. In addition, and over a period of 4 years, rams from an artificial insemination center were grouped into three groups depending on the frequency of semen collection and the time of the year, all in the context of the usual operation of the center. In these males, total testicular volume (TTV), serum testosterone concentration (T) and total sperm production (SPERM) from two consecutive ejaculates on the same day were measured and the correlations between these parameters were established. Sperm production showed strong positive and significant correlations with total testicular volume ($r = 0.587$, non-breeding season -NBS-; $r = 0.773$, breeding season, 10 ejaculates/week -BS10-) and with testosterone ($r = 0.684$, breeding season, 4 ejaculates/week -BS4-) and, based on this, three formulas were established to predict sperm production in relation to the season and semen collection frequency; SPERM ($\times 10^9$ spz) in NBS = $0.02226 \times \text{TTV (mL)} - 2.977$; SPERM ($\times 10^9$ spz) in BS10 = $0.01858 \times \text{TTV (mL)} - 2.873$; SPERM ($\times 10^9$ spz) in BS4 = $0.80850 \times \text{T (ng/mL)} + 2.819$.



In the second paper, the measurement of testicular blood flow in the ram was standardized by studying the histological, morphological and ultrasonographic characteristics of the testicular artery in three different zones: proximal, middle and distal. Arterial diameter and hemodynamics including peak systolic (PSV) and end-diastolic velocities (EDV), resistive index (RI) and pulsatility index (PI), total artery blood flow (TABF) and its ratio (TABF rate) were measured. The artery was characterized on ultrasound imaging by high tortuosity, tending to less sinuosity as it approaches the testis. In addition, a significant increase in arterial diameter, PSV, RI and PI was observed in the proximal supratesticular region and a progressive increase in EDV, TABF and TABF rate as the artery advanced towards the testicle. On the other hand, histological studies were performed in the same areas for the morphometric study of the different anatomical structures of the arterial wall, as well as an immunohistochemical analysis to know the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and vimentin. Histomorphological studies showed a larger diameter of the *vasa vasorum* in the tunica adventitia and of the arterial wall in the proximal zone, whereas the outer arterial and inner luminal diameters were larger in the distal zone. Finally, the expression of α -SMA and vimentin, markers of tunica media smooth muscle cells, was higher in the proximal zone compared with the middle and distal zones, implying greater vascular wall thickness at that level. Between the two points with more consistent and representative (middle and distal), and although there are differences between them, due to the technical difficulty of measuring flow at that distal point (impossibility of measurement in some animals) and in order to design a more applicable, reproducible and fast protocol in the field, the middle supratesticular zone is recommended.

In the third paper, ultrasonography was applied in the evaluation of testicular function and the correlations between ultrasonography measurements and seminal quantity and quality parameters using different semen collection frequencies as a practical scenario were calculated. For this, rams were subjected to three consecutive semen collection frequencies, of increasing intensity, each lasting one month (abstinence -AF-, standard -SF-, intensive -IF-). At the end of each period, testicular volume, parenchyma



echotexture and testicular artery hemodynamics were evaluated. Likewise, on refrigerated semen samples (15 °C, 6h), production, motility, viability, apoptosis and mitochondrial activity were evaluated. In addition, correlations between ultrasonographic and semen parameters were also established. Our results showed a significant increase in echotexture and testicular artery hemodynamics (PSV, RI, PI, TABF) when semen collection frequency was intensified. In contrast, sperm motility and sperm functionality decreased significantly. Regarding the correlations between parameters, moderate and positive correlations were found between ultrasonography parameters (echotexture and Doppler parameters) and sperm motility parameters in SF. In the second part of the work, a fertility study was carried out in the field in which the days of sexual abstinence prior to the experimental semen collection for elaboration of doses for cervical inseminations of previously synchronized ewes were considered. In this study, the highest fertility rates were obtained from males that had 2 to 5 days of abstinence between semen collections.

In summary, andrological evaluation, through a multiparametric study that includes a complete ultrasonographic evaluation by measuring testicular volume with the ovine-specific ItraULE formula and testicular hemodynamics in the middle suprastesticular area, in addition to semen evaluation, is a very useful tool to categorize rams according to their semen production and to maximize their reproductive performance in order to increase their fertility and therefore the productivity in the farms.

Keywords: Ultrasonography, testicular volume, Doppler, testicular artery, testicular blood flow, sperm quality, ram, andrological assessment, reproductive performance, artificial insemination, fertility.

Introducción



1. Importancia del semental ovino en la reproducción

La importancia socioeconómica del sector ovino está fuera de toda discusión. Se trata de una especie con sistemas de explotación sostenibles, muy ligada al suelo, que genera un bajo impacto medioambiental y que constituye una base sólida para fijar población en el medio rural. España cuenta con un total de 14,9 millones de cabezas (SITRAN, 2023) y es el país con mayor censo de ovino de la Unión Europea, contribuyendo con el 25% del censo total (EUROSTAT, 2023). Aun pareciendo estos datos esperanzadores, desde el año 2007, el número de cabezas de ganado ha descendido en un 35,3% pasando de 23 millones a menos de 15. El año 2012 fue el punto crítico donde los censos cayeron un 13,7% (MAPA, 2023a). En la comunidad autónoma de Castilla y León se censa el 16,3% de los animales, entre los que se encuentran 776.467 ovejas de aptitud lechera (37% del censo nacional), que lideran la producción nacional desde el año 2000 (actualmente el 53%). En cuanto a los datos productivos, el total de litros de leche de oveja se mantiene a lo largo de los años y el valor de la producción de leche de oveja se ha visto incrementado en un 10,6% en el año 2021 con respecto al año 2020 (MAPA, 2023b). Aun siendo un sector menos tecnificado en comparación con el bovino y el porcino, estos datos confirman la exponencial profesionalización del sector ovino y, concretamente, del sector ovino lechero. Con esta información queda suficientemente demostrada la importancia estratégica del sector en nuestra región y la necesidad de implantar mejoras y avances para favorecer la tecnificación del colectivo y conseguir profesionalizar y hacer competitivo el sector a nivel mundial. Para conseguir este avance, diferentes campos de la producción animal han colaborado activamente en la mejora de los parámetros productivos. El sistema de producción se ha intensificado y las explotaciones con un mayor grado de tecnificación son aquellas que tienen todos los aspectos bajo control, como son la nutrición, las instalaciones adecuadas, el manejo de los animales, la genética y la reproducción como piedra angular.

La reproducción es una función de lujo para el individuo y una función esencial para la supervivencia de la especie. Un animal puede estar perfectamente alimentado, alojarse en unas instalaciones ideales, ser



manejado de forma correcta y tener un alto valor genético; pero, si no es capaz de generar nuevos individuos para transmitir sus genes nos encontramos con un animal con una capacidad finita y sin trascendencia en el rendimiento global de la explotación. Esta capacidad se define como fertilidad. Evidentemente, existen una serie de factores (intrínsecos y extrínsecos) que influyen en la fertilidad y sobre los que se trabaja constantemente para conseguir aumentar los rendimientos reproductivos de las explotaciones. Entre ellos, encontramos los factores ambientales; como la estación, el año y los factores propios de cada granja como el estado sanitario o el manejo reproductivo; los factores dependientes de la hembra como la edad, el intervalo parto-parto, el número de partos o las enfermedades previas y, con un gran peso dentro del cómputo global, los factores dependientes del macho como la estacionalidad, la calidad espermática o la libido (Anel *et al.*, 2005, 2006; Alvarez *et al.*, 2019). Tradicionalmente, el semental ha sido el gran olvidado en el ámbito de la reproducción y, en la especie ovina, con más razón por el poco valor unitario en comparación con otras especies como los équidos o los bóvidos (MacLaren, 1988). En los estudios publicados hace unos 30 años, se ha referenciado que el cincuenta por ciento del potencial reproductivo de un rebaño lo aporta el morueco (MacLaren, 1988), lo que afecta en gran medida a la rentabilidad de la granja (Pardos *et al.*, 2008). En la actualidad, la importancia de un macho como individuo en el éxito reproductivo se considera mayor que la de la hembra, en tantas veces como intervenga ese macho en el binomio hembra-macho para generar nuevos individuos. Esta actuación es diferente si el macho es utilizado en una cubrición por monta natural, en la inseminación artificial por vía vaginal con semen refrigerado o en la inseminación artificial por vía laparoscópica utilizando semen descongelado (Maquivar *et al.*, 2021; Montes-Garrido *et al.*, 2023). La inseminación artificial, aun siendo la técnica de reproducción asistida con mayor difusión en esta especie, presenta un grado de aplicación muy bajo (menos del 1%). A la hora de analizar los factores que determinan esta baja difusión, la alta variabilidad de los resultados de fertilidad obtenidos no resulta un estímulo para aumentar su uso. Esta situación genera un complejo escenario multifactorial que requiere de un análisis en profundidad. A los factores descritos anteriormente, se suman los que tienen una implicación directa con



la inseminación artificial y son los relacionados con la hembra (manejo, estacionalidad, morfología genital -cérvix-, tipo de celo -inducido o natural-, estado productivo, etc.), con la granja (manejo, condiciones sanitarias, condiciones ambientales), con el macho (estacionalidad, calidad seminal, conservación seminal -tipos de diluyentes y temperaturas de conservación-, etc.) y con la propia técnica (vía de aplicación, nº de espermatozoides/dosis, técnico, etc.) (Donovan *et al.*, 2004; Paulenz *et al.*, 2004; Anel *et al.*, 2005, 2006; Emsen *et al.*, 2011). En este escenario, considerando la multitud de factores dependientes del macho, la optimización del trabajo y el rendimiento de los carneros de los centros de sementales podrá fomentar la difusión de la inseminación artificial. Para ello, la mejora de ciertos aspectos de la evaluación andrológica nos permitirá esa optimización del rendimiento de nuestros sementales donantes.

2. Valoración andrológica

El estudio de la capacidad reproductiva de un macho se puede abordar realizando un examen básico en el que se analicen aspectos esenciales o mediante una valoración más especializada y avanzada. Establecer diferentes niveles de valoración andrológica se hace imprescindible para adaptar el examen a los machos localizados tanto en las granjas como en los centros de reproducción. La evaluación clínica de la capacidad reproductiva de los carneros se puede desglosar en los siguientes aspectos: (a) historial reproductivo del animal y evaluación del ratio “hembra-macho” en el rebaño, (b) examen general del animal y examen clínico y ecográfico del aparato genital externo, (c) evaluación seminal y, por último, (d) evaluación de la capacidad del macho para la monta mediante la libido (Gouletsou and Fthenakis, 2010). Con un examen básico, se ha demostrado que entre el 15 y el 20% de los sementales presentan lesiones severas y se consideran animales para descartar (Mozo *et al.*, 2015). En el examen andrológico avanzado, la ultrasonografía supone una herramienta indispensable, ya que aporta información en tiempo real y secuencial sobre el rendimiento reproductivo del macho, además de ser una técnica no invasiva, no ionizante e indolora (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2014; Gouletsou, 2017). La ultrasonografía presenta diferentes modos útiles en el



campo de la reproducción: modo B y modos Doppler color y pulsado. El modo B ha sido utilizado en diferentes especies domésticas como una herramienta válida para estimar proporciones testiculares y la ecotextura del parénquima además de ayudar a identificar hallazgos clínicos inciertos, como pueden ser estadios iniciales de procesos patológicos macroscópicos o monitorizar cambios en lesiones (Gouletsou, 2017). Dentro de estas variables a estudiar con este modo ecográfico, cabe destacar el volumen testicular, objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral.

3. Estudio del volumen testicular

Tradicionalmente, el tamaño de los testículos ha sido una variable a tener en cuenta en la determinación de la capacidad reproductiva de los carneros (Cameron *et al.*, 1986). En este contexto, la circunferencia escrotal ha sido el parámetro más estudiado y se relacionó positivamente con la producción (Langford *et al.*, 1989) y negativamente con las morfoanomalías espermáticas en el carnero (Mickelsen *et al.*, 1982). Varios estudios han evaluado la influencia del volumen y el peso testicular en la cantidad y calidad seminal (Aguirre *et al.*, 2007; Hussein *et al.*, 2022), y en la fertilidad de la especie ovina (Cameron *et al.*, 1986). El volumen testicular ha sido un parámetro clave para estimar la producción espermática diaria (DSO) en diferentes especies como caballo (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2014), carnero (El-Alamy *et al.*, 2001) y toro (Brito *et al.*, 2004). Además, dicha DSO ha sido empleada para conocer la eficiencia espermática (DSO real/DSO estimada), un índice utilizado de forma tradicional para diagnosticar desórdenes testiculares (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2014). La predicción de la DSO se puede calcular con una fórmula general para varias especies: $DSO = 0,024 \times \text{Volumen Testicular total} - 0,76$ (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2014). Aunque se trata de una fórmula general, su uso no está extendido ni estandarizado, lo que significa que la DSO calculada de esta manera no es comparable entre estudios y su análisis no es lo suficientemente sólido como para considerarse un factor indicativo del rendimiento reproductivo en el carnero.

En la actualidad, se están utilizando diferentes herramientas de medida del volumen testicular. Por un lado, el calibre clásico se ha utilizado en



diferentes especies como toro (Lunstra and Cundiff, 2003), perro (Gouletsou *et al.*, 2008) y carnero (Milczewski *et al.*, 2015). Por otro lado y como herramienta relativamente reciente, la ultrasonografía con calibres electrónicos incorporados se ha utilizado en caballo (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2014; Pozor *et al.*, 2014), perro (Zelli *et al.*, 2013), macho cabrío (Samir *et al.*, 2015), carnero (Camela *et al.*, 2019) y hombre (Hsieh *et al.*, 2009). Con carácter residual, existen otras herramientas de medida, que son los orquidómetros descritos previamente por Prader (1966) y Rochester (1983), cuyo uso ha sido fundamentalmente en la especie humana y no ha trascendido de manera significativa a la especie ovina.

Del mismo modo que existen diferentes herramientas de medida para estimar las proporciones del testículo y que son objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral, también encontramos una gran variedad de fórmulas descritas en la bibliografía para calcular el volumen testicular. La fórmula del elipsoide ($TV = \text{Largo (L)} \times \text{Alto (H)} \times \text{Ancho (W)} \times 0,523$) es la más aplicada (Gouletsou *et al.*, 2008) y su uso se ha extendido a carnero (Camela *et al.*, 2019), perro (de Souza *et al.*, 2014, 2015; England *et al.*, 2017) y caballo (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2014; Pozor *et al.*, 2014). La fórmula del esferoide ($TV = L \times H^2 \times 0,523$) también se ha utilizado en varios estudios como son los descritos en toro (Bailey *et al.*, 1998; Brito *et al.*, 2004) y carnero (Auclair *et al.*, 1995). Otra fórmula, que se ha utilizado en un gran número de trabajos, es la fórmula empírica de Lambert (1951) ($TV = L \times H \times W \times 0,71$). Esta fórmula ha sido utilizada en multitud de especies entre las que se encuentran el carnero (Hedia *et al.*, 2019), perro (Zelli *et al.*, 2013; Moxon *et al.*, 2015), macho cabrío (Samir *et al.*, 2015), toro (Strina *et al.*, 2016) y hombre (Schiff *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2008). En el caso de la especie ovina, existen otras fórmulas descritas en la bibliografía para el cálculo del volumen testicular que hacen aún más difícil el consenso para establecer una fórmula definitiva y poder comparar estudios. Por un lado, tenemos la fórmula ($TV = 0,0396 \times L \times (\text{circunferencia escrotal})^2$) utilizada en los estudios de Giffin *et al.* (2014) y Steger *et al.* (1994) y, por otro, se describe la fórmula ($TV = 2 \times ((W/2)^2 \times \mu \times L)$) empleada por Ribeiro *et al.* (2017).



En ciencia aplicada, que es la desarrollada principalmente por nuestro grupo de investigación durante más de 30 años, es fundamental responder a la siguiente pregunta: ¿para qué? Y es que, en la materia a tratar en esta Tesis Doctoral, medir el tamaño de los testículos no tiene una explicación jerárquica o social, sino que se fundamenta en la relación con la producción espermática en diferentes escenarios prácticos. Para conocer la producción espermática teórica de un animal, además de saber el volumen testicular, se necesita saber la densidad y la producción por gramo de parénquima testicular. En la especie ovina no se tienen referencias sobre la densidad testicular, mientras que sí hay estudios en humana, 1,038 g/mL (Handelsman and Staraj, 1985) y en perro y toro, 1,04 g/mL (Rivkees *et al.*, 1987). Por el contrario, sí se ha publicado que la producción diaria de espermatozoides por gramo de parénquima testicular en el carnero es de 21 a 25 x 10⁶ espermatozoides (Amann and Hammerstedt, 1993). Estos espermatozoides son producidos por las células espermáticas (desde espermatogonia hasta espermátida) que ocupan el 70-80% del volumen testicular. El resto lo forma el tejido intersticial, que incluye abundante número de células de Sertoli como soporte y células de Leydig productoras de testosterona (Giffin *et al.*, 2009). Por todo esto, los cambios en el volumen testicular pueden reflejar profundas implicaciones en la espermatogénesis (Fernandez-Abella *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2015), así como variaciones en la producción de testosterona (Elmaz *et al.*, 2007). Todo lo mencionado anteriormente forma parte de la evaluación andrológica básica, pilar sobre el que se asienta la evaluación andrológica avanzada.

4. Ultrasonografía en la evaluación de los sementales

En la evaluación andrológica avanzada y utilizando la ultrasonografía modo B, el parénquima testicular es otra variable objeto de estudio. La posibilidad de analizar la ecogenicidad mediante vídeos del parénquima permite tener una visión más objetiva y completa del órgano. Varios estudios han evaluado la ecotextura testicular utilizando diferentes software que analicen las imágenes y vídeos capturados durante la valoración del semental (Brito *et al.*, 2003; Giffin *et al.*, 2009; Abecia *et al.*, 2020). En la especie ovina, Abecia *et al.* (2020) utilizaron el software Ecotext[®] para evaluar los cambios en



la ecotextura testicular en presencia o ausencia de hembras en estro durante la época no reproductiva; Chandolia *et al.* (1997), el software Synergyne[®] para valorar el desarrollo del tracto reproductivo y los efectos del acetato de leuprolide en corderos jóvenes; y Bartlewski *et al.* (2017) y Camela *et al.* (2019) emplearon el software Image Proplus[®] para estudiar los cambios ecográficos en el inicio de la espermatogénesis y durante la pubertad en machos jóvenes.

De la misma manera que el modo B está incluido en la totalidad de los equipos ecográficos utilizados a nivel de campo, los modos Doppler color y pulsado están incorporados cada vez en más equipos y sirven para caracterizar y cuantificar el flujo sanguíneo testicular (Pozor and McDonnell, 2004). La cantidad y calidad seminal está afectada por la hemodinámica de la arteria testicular, que es la principal vía de aporte de oxígeno, nutrientes, hormonas reguladoras y productos secretores hacia y desde los testículos (Samir *et al.*, 2021; Velasco and Ruiz, 2021). Se origina directamente de la cara ventral de la arteria aorta abdominal y su diámetro es más amplio en el carnero que en otros animales de talla media o pequeña (Noordhuizen-Stassen *et al.*, 1985). A nivel anatómico, se define de cuatro maneras según su curso: abdominal, funicular, marginal y parenquimatosa. La parte abdominal se extiende desde su origen hasta la abertura interna del canal inguinal, mientras que la parte funicular, también conocida como suprategesticular, ocupa el cordón espermático poniendo fin en el extremo proximal del testículo. La parte marginal es la continuación de la parte funicular, localizándose en el margen epididimario del testículo y se extiende entre los extremos proximal y distal del testículo. Por último, la parte parenquimatosa, también llamada intrategesticular, está formada por un grupo de ramas que discurren por el parénquima testicular hacia el mediastino (Sary *et al.*, 2020). La arteria testicular es considerada como una arteria muscular y su pared está formada por tres capas o tunicas. La túnica íntima está formada por el endotelio, una fina capa de tejido conjuntivo laxo y la lámina elástica interna. La túnica media está formada principalmente por células musculares lisas, con fibras elásticas, laminillas elásticas y fibras reticulares. Por último, la túnica adventicia está constituida por colágeno y fibras elásticas, y contiene una red de fibras nerviosas vasomotoras autónomas no mielinizadas (Mescher, 2013).



Existen varios estudios sobre el uso de la ecografía modo Doppler para la evaluación del flujo sanguíneo de la arteria testicular en carneros (Batissaco *et al.*, 2014; Ntemka *et al.*, 2018; Camela *et al.*, 2019; Hedia *et al.*, 2019), y sus implicaciones sobre la función testicular. En estudios recientes en caballo y perro, se han utilizado con frecuencia las regiones supratesticular, marginal e intratesticular para la evaluación del flujo sanguíneo testicular en procedimientos clínicos rutinarios, describiéndose diferencias entre estas regiones (Carrillo *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2014; Ortiz-Rodriguez *et al.*, 2017; Trautwein *et al.*, 2020). En el caso de la especie ovina, son muy pocos los estudios que utilicen la parte marginal para cuantificar el flujo sanguíneo por su dificultad de medida y su poca practicidad (Elbaz *et al.*, 2019), considerándose la región supratesticular la más adecuada para este fin en el carnero (Ntemka *et al.*, 2018; Hedia *et al.*, 2019). En este área, la arteria testicular es muy tortuosa prácticamente en todas las especies, demostrándose en varios estudios como por ejemplo, en camello (Kutzler *et al.*, 2011), caballo (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2014), perro (Carrillo *et al.*, 2012) y, de una forma más pronunciada, en el carnero (Elweza *et al.*, 2021; Samir *et al.*, 2021, 2023). La medición de la arteria testicular en la especie ovina se ha realizado en zonas aleatorias de la región supratesticular, capturándose de 2 a 4 mediciones (Batissaco *et al.*, 2014; Hedia *et al.*, 2019; El-Shalofy *et al.*, 2021; Samir *et al.*, 2023) o incluso sin especificar la región de medida (Ntemka *et al.*, 2018). Por lo citado anteriormente, se hace necesario un consenso y una estandarización de la región de medida de la arteria testicular de carnero para una mayor objetivación de los resultados que se obtengan.

5. Aplicaciones en escenarios prácticos

Del mismo modo que se requiere una estandarización de la región de medida del flujo sanguíneo de la arteria testicular, es importante conocer la aplicación práctica de la cuantificación de la hemodinámica testicular. En este sentido, diferentes estudios han puesto de manifiesto una asociación entre el flujo sanguíneo testicular y la calidad espermática en varias especies, como los homínidos (Biagiotti *et al.*, 2002), los équidos (Pozor *et al.*, 2014; Ortiz-Rodriguez *et al.*, 2017) y los óvidos (Batissaco *et al.*, 2014; Hedia *et al.*, 2019).



En el caso de los camélidos (Kutzler *et al.*, 2011) y los cánidos (Zelli *et al.*, 2013), se han utilizado parámetros Doppler para estimar tasas de fertilidad. Además de estandarizar la región de medición, conocer la mayor información posible acerca del macho es necesario para obtener unos resultados que sean aplicables y reproducibles en los diferentes escenarios prácticos. Uno de los aspectos útiles a conocer puede ser el ritmo de recogida seminal de los machos donantes en los centros de sementales, como demostraron Ollero *et al.* (1996), quienes observaron que diferentes periodos de abstinencia sexual pueden afectar a la calidad espermática en términos de viabilidad, motilidad e integridad acrosomal. En consonancia, las variaciones en la frecuencia de eyaculación inducen por un lado, cambios en el proceso de maduración y en las características funcionales espermáticas y, por otro, en la composición iónica y en la actividad enzimática del plasma seminal (Ollero *et al.*, 1996; Kaya *et al.*, 2002). Según nuestro conocimiento, no existen estudios con un gran número de machos que utilicen técnicas innovadoras y predictivas, como sería la ultrasonografía, junto con el análisis seminal, en términos cualitativos y cuantitativos, para evaluar la capacidad reproductiva de los carneros, utilizando como modelo de trabajo diferentes frecuencias de recogida seminal.

Justificación y Objetivos



El correcto manejo de los sementales y de forma muy notable en los centros de sementales, requiere de una evaluación íntegra del animal incluyendo un examen exhaustivo del complejo testicular y una evaluación seminal completa. El objetivo de esta Tesis Doctoral es definir estrategias de mejora de la Inseminación Artificial Ovina, a través de la evaluación la capacidad reproductiva de los sementales, mediante el diseño de un panel de evaluación andrológica, con valor predictivo cualitativo y cuantitativo de la producción espermática y de la fertilidad.

Este objetivo general se abordará a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Optimizar el método para calcular el volumen testicular del semental ovino eligiendo la mejor herramienta de medida testicular, con el fin de obtener una nueva fórmula específica para estimar de forma precisa la producción espermática.
2. Estandarizar el protocolo de medición del flujo sanguíneo testicular en el carnero mediante el estudio de las características histológicas, morfológicas y ultrasonográficas de la región supratesticular de la arteria testicular en tres regiones diferentes.
3. Valorar la eficacia de la ultrasonografía en la evaluación de la función testicular del semental ovino a través del estudio de la morfometría, ecotextura y vascularización testicular, comprobando su relación con la cantidad y calidad seminal.

Metodología y Resultados



La metodología empleada, así como los resultados obtenidos en cada uno de los trabajos realizados en esta Tesis Doctoral, se describirán en detalle en cada uno de los siguientes capítulos que se relacionan con cada una de las publicaciones.

La Publicación I se centra en evaluar la reproducibilidad del calibre clásico y el electrónico de los equipos de ultrasonografía en la medición de dimensiones testiculares, desarrollar una fórmula específica y adaptada a la especie ovina y relacionar el volumen testicular con la producción espermática.

La Publicación II se centra en la estandarización de la región de medida del flujo sanguíneo de la arteria testicular en su zona supratesticular mediante estudios ultrasonográficos y anatómicos.

La Publicación III, por su parte, se centra en valorar la eficacia de la técnica ecográfica para la evaluación de la capacidad reproductiva de los sementales ovinos.

Publicación I

Does size matter? Testicular volume and its predictive ability of sperm production in rams



Información sobre el artículo

- **Título:** Does size matter? Testicular volume and its predictive ability of sperm production in rams.
- **Autores:** Rafael Montes-Garrido, Luis Anel-Lopez, Marta F. Riesco, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Cristina Soriano-Úbeda, Juan Carlos Boixo, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.
- **Estado:** Publicado.
- **Revista:** Animals.
- **Año de publicación:** 2023.
- **DOI:** 10.3390/ani13203204.
- **Factor de impacto de la revista en 2022:** 3,0.
- **Puesto en la categoría “Veterinary Sciences” en 2022:** 13/144 (Q1).
- **Política de difusión de artículos:** De acuerdo con la política de acceso abierto de Animals, no es necesario un permiso especial para reutilizar todo o parte del artículo, incluidas las figuras y tablas.



SUMMARY

Over the years, testicular volume has been used to evaluate the reproductive capacity of rams and the effects of different factors related to reproductive performance. The aim of this study was to determine the most suitable tool and formula to calculate testicular volume under field conditions to guarantee a more accurate determination of sperm production. First, testicles from 25 rams ($n = 50$) were measured in vivo and postmortem using calipers and ultrasonography during the breeding season (BS). The accurate testicular volume (ATV) was calculated through water displacement. In addition, the sexual status of donor rams was evaluated during a period of four years in a reproduction center, and the three most crucial groups in terms of genetic value and seminal collections were studied in the second part of this experiment: ER-NBS (Elite rams during the non-breeding season), ER-BS-S (Elite rams with a standard frequency of seminal collection), and ER-BS-O (Elite rams with a high frequency of seminal collection). The total testicular volume (TTV), testosterone (T), and total spermatozoa obtained from two consecutive ejaculates in the same day (SPERM) were measured, and the relationship between SPERM and TTV and T was analyzed to predict SPERM. Although all published formulas revealed statistically significant differences ($p \leq 0.05$) from the ATV, our proposed formula (ItraULE) ($\text{Testicular volume} = L \times W \times D \times 0.61$) did not show significant differences. In the second part of the study, in the ER as a model donor ram for its high genetic value and high demand from farmers, TTV and T showed strong positive correlations with SPERM ($r = 0.587$, $p = 0.007$ NBS; $r = 0.684$, $p = 0.001$ BS-S; $r = 0.773$, $p < 0.0001$ BS-O). Moreover, formulas were established to predict SPERM in these practical scenarios. In conclusion, the use of ultrasonography and a new formula adapted to rams could improve the prediction of SPERM considering crucial factors such as season and semen collection frequency.

Keywords: caliper; ultrasonography; breeding soundness examination; reproductive performance; artificial insemination

Publicación II

Morphological and ultrasonographic characterization of the three zones of supratesticular region of testicular artery in Assaf rams



Información sobre el artículo

- **Título:** Morphological and ultrasonographic characterization of the three zones of suprastesticular region of testicular artery in Assaf rams.
- **Autores:** Mohamed A.A. Hassan, Ramy K.A. Sayed, Mohammed Abdelsabour-Khalaf, Enas A. Abd-Elhafez, Luis Anel-Lopez, Marta F. Riesco, Cristina Ortega-Ferrusola, Rafael Montes-Garrido, Marta Neila-Montero, Luis Anel y Mercedes Alvarez.
- **Estado:** Publicado.
- **Revista:** Scientific Reports.
- **Año de publicación:** 2022.
- **DOI:** 10.1038/s41598-022-12243-z.
- **Factor de impacto de la revista en 2022:** 4,6.
- **Puesto en la categoría “Multidisciplinary Sciences” en 2022:** 22/73 (Q2).
- **Política de difusión de artículos:** De acuerdo con la política de acceso abierto de Scientific Reports, no es necesario un permiso especial para reutilizar todo o parte del artículo, incluidas las figuras y tablas. Se permite su uso, intercambio, adaptación, distribución y reproducción en cualquier medio o formato, siempre que se cite a los autores originales y la fuente.



SUMMARY

To fully understand the histological, morphometrical and hemodynamic variations of different suprastesticular artery regions, 20 mature and healthy Assaf rams were examined through ultrasound and morphological studies. The testicular artery images of the spermatic cord as shown by B-mode analysis indicated a tortuous pattern along its course toward the testis, although it tends to be less tortuous close to the inguinal ring. Doppler velocimetric values showed a progressive decline in flow velocity, in addition to pulsatility and vessel resistivity when entering the testis, where there were significant differences in the Doppler indices and velocities among the different regions. The peak systolic velocity, pulsatility index and resistive index were higher in the proximal suprastesticular artery region, followed by middle and distal ones, while the end diastolic velocity was higher in the distal suprastesticular region. The total arterial blood flow and total arterial blood flow rate reported a progressive and significant increase along the testicular cord until entering the testis. Histological examination revealed presence of *vasa vasorum* in the tunica adventitia, with their diameter is higher in the proximal suprastesticular zone than middle and distal ones. Morphometrically, the thickness of the suprastesticular artery wall showed a significant decline downward toward the testis; meanwhile, the outer arterial diameter and inner luminal diameter displayed a significant increase distally. The expression of alpha smooth muscle actin and vimentin was higher in the tunica media of the proximal suprastesticular artery zone than in middle and distal ones.

Publicación III

Application of ultrasound technique to evaluate the testicular function and its correlation to the sperm quality after different collection frequency in rams



Información sobre el artículo

- **Título:** Application of ultrasound technique to evaluate the testicular function and its correlation to the sperm quality after different collection frequency in rams.
- **Autores:** Rafael Montes-Garrido, Marta F. Riesco, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Juan Carlos Boixo, Paulino de Paz, Cristina Ortega-Ferrusola, Mohamed A.A. Hassan, Luis Anel y Mercedes Alvarez.
- **Estado:** Publicado.
- **Revista:** Frontiers in Veterinary Science.
- **Año de publicación:** 2022.
- **DOI:** 10.3389/fvets.2022.1035036.
- **Factor de impacto de la revista en 2022:** 3,2.
- **Puesto en la categoría “Veterinary Sciences” en 2022:** 12/144 (Q1).
- **Política de difusión de artículos:** De acuerdo con la política de acceso abierto de Frontiers, no es necesario un permiso especial para reutilizar todo o parte del artículo, incluidas las figuras y tablas.



SUMMARY

The frequency of semen collection is a crucial factor to consider in the rams performance inside breeding centers workout. To evaluate this factor, ram Breeding Soundness Evaluation could include sperm quality evaluation and new predictive and non-invasive tools such as ultrasound technique. In this work, an advanced ultrasonography technology, analyzing the testicular volume, echotexture, and vascular function, was used in three different frequencies of semen collection (abstinence frequency, AF; standard frequency, SF; and intensive frequency, IF). Semen samples were cooled (15 °C, 6 h) and evaluated in terms of production, motility, viability, apoptosis, and content of reactive oxygen species. Correlation coefficients were calculated between ultrasonography measurements of echotexture and blood flow and sperm quality parameters. Our results showed an increase in the testicular echotexture when the frequency of semen collection was intensified. Doppler parameters (PSV, RI, PI, TABF) increased ($P \leq 0.05$) when the frequency of semen collection was intensified. The sperm motility and functionality decreased in the samples of IF ($P \leq 0.05$), evidencing the frequency of semen collection's influence. Moreover, moderate positive correlations were established among echotexture and different Doppler parameters with motility parameters in SF. Furthermore, the influence of abstinence days on AI success was analyzed in a field assay. The highest fertility rates were obtained when males had two to five abstinence days. To conclude, frequency of semen collection could be influenced in terms of semen quantity and sperm quality, showing changes in parenchyma echotexture and testicular vascularization. The standard semen collection frequency was the most adequate option. In addition, ultrasonography may be a predictive tool for estimating variations in the sperm quality of donor rams subjected to different frequencies of semen collection in reproduction centers.

Keywords: Doppler, fertility, ovine, semen collection frequency, sperm quality, ultrasonography

Discusión general



En esta Tesis Doctoral hemos tratado de abordar, en el ámbito de la producción ovina, aspectos relativos a la valoración andrológica de los carneros con el objetivo final de aportar conocimientos que permitan mejorar la evaluación clínica de los sementales y aumentar la difusión y la tasa de fertilidad de la inseminación artificial ovina.

En el primer estudio de la presente Tesis Doctoral, centramos nuestros esfuerzos en conocer la capacidad de producción espermática de los carneros para optimizar la gestión de un centro de reproducción. Lo ideal sería encontrar y establecer una medida rápida y fiable con capacidad predictiva del rendimiento productivo del testículo, planteándose el volumen testicular para tal fin. Además, por otro lado, sería de interés conocer un parámetro medible y con un impacto considerable en la producción espermática, como por ejemplo la testosterona (Aguirre *et al.*, 2007; Zamiri *et al.*, 2010).

Como primer paso, para poder obtener resultados reproducibles, se debe elegir la herramienta de medida. En nuestro caso, se utilizaron los calibres clásico y electrónico, y se vio que las mediciones realizadas mediante ultrasonografía mostraron menores desviaciones estándar de forma significativa en comparación con las realizadas con el calibre clásico. Por lo tanto, la técnica ecográfica sería la herramienta más fiable y reproducible. En concordancia con nuestros resultados, Pricking *et al.* (2017) demostraron diferencias significativas entre el volumen testicular calculado mediante calibre clásico y ecografía en équidos. Por otro lado, Paltiel *et al.* (2002) observaron una desviación estándar significativamente mayor en los volúmenes testiculares de cánidos calculados con métodos clínicos en comparación con los ecográficos. Aunque las medidas con calibre convencional son fiables, baratas y sencillas (Bailey *et al.*, 1998), la ecografía en modo B ofrece una serie de ventajas adicionales, como su carácter no invasivo, no ionizante, visualización en tiempo real, información secuencial y almacenamiento para futuras evaluaciones (Gouletsou, 2017). Asimismo, la técnica ecográfica es útil para interpretar hallazgos clínicos inciertos, detectar estadios tempranos de procesos patológicos, monitorizar cambios en las lesiones y estudiar la ecogenicidad del parénquima (Gouletsou, 2017; Camela *et al.*, 2019; Montes-Garrido *et al.*, 2022). Por todas estas razones, la elección de la ecografía como la herramienta



más precisa y reproducible ha sido avalada en otras especies como perros (Paltiel *et al.*, 2002; Gouletsou *et al.*, 2008), toros (Abdel-Razek and Ali, 2005), caballos (Pricking *et al.*, 2017) y humanos (Lin *et al.*, 2009). Hoy en día, los equipos de ecografía con calibres electrónicos son muy accesibles para todos los técnicos veterinarios, y la determinación de las medidas testiculares podría ser añadida a la práctica clínica diaria.

Continuando con la estandarización de las mediciones ecográficas dentro de la evaluación andrológica, el siguiente paso para conocer con mayor precisión el volumen testicular es establecer la fórmula más específica para la especie ovina. Se han utilizado varias fórmulas (Steger and Wrobel, 1994; Auclair *et al.*, 1995; Elmaz *et al.*, 2007; Giffin *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2017; Camela *et al.*, 2019; Hedia *et al.*, 2019), pero según nuestros resultados, ninguna es lo suficientemente precisa para calcular el volumen testicular en el carnero. En varios estudios, la fórmula utilizada no es importante porque se trata de estudios comparativos, como son los llevados a cabo a lo largo del tiempo teniendo en cuenta las variaciones estacionales (Avdi *et al.*, 2004), entre diferentes edades (Camela *et al.*, 2019) o con diferentes frecuencias de recogida seminal (Montes-Garrido *et al.*, 2022). Además, tanto los resultados obtenidos en nuestro estudio como los obtenidos en otros grupos de investigación (Paltiel *et al.*, 2002; Pricking *et al.*, 2017), demuestran que existe correlación positiva entre las fórmulas descritas en la literatura y el volumen testicular medido por desplazamiento de agua; sin embargo, la fórmula desarrollada por nuestro grupo (fórmula ItraULE: $TV = L \times W \times D \times 0,61$) fue la única que no demostró diferencias significativas entre los valores obtenidos en mediciones *in vivo* y el valor *post mortem* medido por desplazamiento de agua en los mismos testículos. Por lo tanto, si se quiere saber si el volumen testicular puede ser un factor clave en la predicción de la producción de espermatozoides, debemos mejorar la exactitud de su cálculo y gracias a la fórmula desarrollada por nuestro grupo alcanzamos este objetivo.

Una vez determinada la herramienta de medida y la fórmula para calcular el volumen testicular, se trató de aplicar en condiciones de campo. Considerando que los túbulos seminíferos ocupan el 67-83% del parénquima testicular y que la mayoría de las células que forman los túbulos son células



espermáticas en sus diferentes estadios de desarrollo (Giffin *et al.*, 2009), la principal aplicación práctica del volumen testicular sería la predicción de la producción de espermatozoides. Para ello, se realizó un estudio retrospectivo en un centro de sementales durante los años 2018-2021 que sirviese para establecer el diseño experimental de nuestro trabajo y que fuese lo más representativo posible de la realidad de estos centros. En dicho estudio dividimos las recogidas seminales por estación y los machos en los de alto valor genético (carneros élite) y los que estaban utilizándose para las pruebas de progenie. De ahí, en nuestro diseño incluimos los carneros élite en época no reproductiva, y en época reproductiva con una frecuencia de recogida seminal estándar e intensiva. Este estudio mostró que el potencial reproductivo de los carneros élite está infravalorado por el excesivo régimen de recogida de semen debido a la alta demanda de dosis seminales por parte de los ganaderos. La elevada demanda de determinados machos hace que los rendimientos reales de estos carneros sean inferiores a los que podrían tener con un mejor manejo reproductivo. A pesar de todo, es interesante considerar el impacto económico en las ganaderías de determinados carneros donantes y la necesidad de utilizarlos para acelerar la mejora genética. Por lo tanto, se consideraron los machos sobreexplotados (con un ritmo de recogida seminal elevado, de 8 a 10 saltos a la semana) como modelo para formar uno de los grupos experimentales durante la época reproductiva para estimar la producción espermática. Actualmente, no existe un consenso claro sobre la variación de la producción espermática a lo largo del año. Coincidiendo con los resultados obtenidos en nuestro estudio en carneros no sobreexplotados (ritmo de recogida estandarizado para la especie), Kafi *et al.* (2004) demostraron que la producción total de espermatozoides es constante a lo largo del año, sin variaciones estacionales. Sin embargo, otros estudios han demostrado diferencias significativas en la producción espermática entre los distintos meses del año, obteniendo mayores volúmenes de eyaculado y concentración espermática, al igual que porcentajes más altos de motilidad progresiva y más bajos de morfoanomalías espermáticas durante la estación reproductiva (Taha *et al.*, 2000; Zamiri *et al.*, 2010). A pesar de ello, todos los estudios coinciden en que el tamaño testicular varía significativamente a lo largo del año,



registrándose el valor más alto durante la época reproductiva (Avdi *et al.*, 2004; Kafi *et al.*, 2004; Zamiri and Khodaei, 2005; Tajangookeh *et al.*, 2007). Esto podría deberse a la influencia hormonal, al coincidir en dicha época reproductiva los niveles más elevados de hormonas sexuales como la testosterona o el estradiol (Hedia *et al.*, 2019). Esto justifica que no sea posible establecer una fuerte correlación positiva entre el volumen testicular y la producción espermática que sea válida durante todo el año.

En nuestro trabajo, se observó una fuerte correlación positiva entre el volumen testicular y la producción espermática en los machos donantes durante la época no reproductiva. En esta estación, planteamos la hipótesis de que el volumen testicular depende directamente del número de células espermáticas (desde espermatogonia hasta espermátida) disponibles para producir espermatozoides; ya que la testosterona, que es otro de los factores importantes que influye en la espermatogénesis, presenta los niveles más bajos en este momento del año (Kafi *et al.*, 2004; Zamiri *et al.*, 2010; Hedia *et al.*, 2019). Además, basándonos en esta correlación, nuestro grupo desarrolló una fórmula para predecir la producción de espermatozoides bajo estas condiciones. Por el contrario, volumen testicular y producción espermática no correlacionan positiva y significativamente en carneros que tienen una frecuencia de recogida seminal estándar durante la época reproductiva. Al ampliar nuestro estudio y analizar la testosterona sérica, en este último grupo se demostró una fuerte correlación positiva con la producción espermática y este resultado puede estar relacionado y ser justificable con la variación en la secreción de melatonina en la especie ovina a lo largo del año.

En este sentido, estudios previos demostraron que la producción de hormonas sexuales (testosterona y estradiol) varía claramente con la secreción de melatonina (Casao *et al.*, 2013), la cual activa el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal y, como consecuencia, provoca el aumento de la producción de testosterona en las células de Leydig del carnero dependiente de la producción de GnRH hipotalámica y LH hipofisaria (Rekik *et al.*, 2015). Además, es capaz de promover la producción del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I y disminuir la síntesis de estrógenos en las células de Sertoli (Deng *et al.*, 2018), que desempeñan un papel importante en la regulación de la producción de



testosterona (Meehan *et al.*, 2000). Es ampliamente conocido que tanto los niveles de melatonina como las concentraciones seminales, sanguíneas y pineales de testosterona además de otras hormonas relacionadas con la reproducción son mayores según aumenta la duración nocturna (fase oscura del ciclo luz-oscuridad) (Reiter, 1980, 1991; Hedia *et al.*, 2019); por lo que la señal luminosa resulta ser antigonadotrópica en animales de día corto, como el carnero (Frungeri *et al.*, 2017). Entre las hormonas reproductivas, la testosterona desempeña un papel clave en la espermatogénesis como ya se comentó anteriormente y se justifica de una manera detallada a continuación. Aunque la concepción clásica es que la FSH estimula la espermatogénesis y la LH la producción de testosterona (Shalet, 2009), se observó que en ratas inmunizadas contra la GnRH (Awoniyi *et al.*, 1992), la espermatogénesis se mantuvo cualitativa y cuantitativamente sólo con testosterona. Este hecho también se demostró en hombres con una mutación que inactivaba el gen FSH-R (Tapanainen *et al.*, 1998) y en un ratón deficiente en FSH-B (Kumar *et al.*, 1997). Además, otro estudio determinó que los niveles basales de producción de espermatozoides y células germinales se mantenían gracias a la testosterona intratesticular (Plant and Marshall, 2001). Por todo lo expuesto anteriormente, la FSH no es esencial para la fertilidad del macho y el nivel sérico de testosterona puede ser el predictor más adecuado de la producción de espermatozoides. En este sentido y ratificando lo expuesto, sabiendo que la producción diaria de espermatozoides por gramo de parénquima testicular se estima entre 21 y 25×10^6 espermatozoides (Amann and Hammerstedt, 1993; Senger, 2012) durante la época reproductiva, los espermatozoides eyaculados por un macho donante con una frecuencia de recogida seminal estándar podrían ser inferiores a los que el macho produce fisiológicamente (Montes-Garrido *et al.*, 2022), y es por esto que el tamaño testicular no es el parámetro más fiable para predecir la producción espermática.

Por último, considerando los machos de alto valor genético y la alta demanda de sus dosis seminales durante la época reproductiva, el volumen testicular vuelve a tener un peso significativo para predecir la producción espermática. En este escenario, en nuestro trabajo demostramos una fuerte correlación positiva entre volumen testicular y producción espermática.



Nuestra hipótesis es que la cantidad de espermatozoides eyaculados podría ser prácticamente la misma que la de espermatozoides producidos en las gónadas. Estas condiciones experimentales se aproximan a las utilizadas en otras especies como caballo (Kavak *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2004; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2014; Pricking *et al.*, 2017) o burro (Magalhaes *et al.*, 2021), donde la producción espermática diaria esperada (DSO) se calcula tras sobreexplotar a los animales con varias recogidas seminales; por lo tanto, la producción de espermatozoides depende únicamente del tamaño testicular (Pricking *et al.*, 2017).

Continuando con la estandarización de las mediciones ecográficas para poder conseguir unos resultados objetivos, representativos y aplicables en el mayor número de individuos y situaciones posibles, en el segundo trabajo de la presente Tesis Doctoral se evalúa la caracterización de las mediciones morfológicas y ultrasonográficas de la arteria testicular en la región supratesticular.

Como premisa y justificación de la medición de la hemodinámica testicular en una región concreta, hay que considerar que el testículo está formado por un tejido metabólicamente muy activo que es muy sensible a pequeñas variaciones en su suministro nutritivo. Este aporte se realiza a través de la arteria testicular. Al originarse directamente de la aorta abdominal, presenta una alta resistencia al flujo en los tramos iniciales, la cual disminuye hasta conseguir en última instancia una presión capilar intratesticular más baja que la de otros órganos, y sólo ligeramente superior a la presión venosa (Bergh and Damber, 1993; Bergh *et al.*, 2001). La concentración de oxígeno en el testículo es baja (Setchell, 1990), por lo tanto, los tejidos de los túbulos seminíferos de alto metabolismo se adaptan a este entorno de baja tensión de nivel de oxígeno y baja presión sanguínea. Esta situación sugiere que cualquier alteración de la perfusión sanguínea y de la hemodinámica puede inducir daño isquémico y comprometer las funciones testiculares (Bergh *et al.*, 2001). Aun así, los estudios previos que investigaron el flujo sanguíneo testicular no fueron precisos sobre la localización exacta de la medición en la región supratesticular y no describieron las regiones supratesticulares proximal y distal (Batissaco *et al.*, 2014; Camela *et al.*, 2019; Elbaz *et al.*, 2019; Elweza *et al.*, 2021).



Antes de utilizar un grupo de animales que sirvan para estandarizar este tipo de mediciones, es necesario que pasen un examen andrológico de una entidad menor, ya que debemos asegurarnos de que no presentan ningún proceso patológico o alteración. Por este motivo, en este trabajo también se analizaron otros parámetros físicos de los animales que se detallan a continuación. Se evaluó la circunferencia escrotal de nuestros carneros de raza Assaf y los valores obtenidos estaban en consonancia con los que observaron Batissaco *et al.* (2014) en carneros de raza Santa Inés y Camela *et al.* (2019) en machos de raza Dorper. Un estudio previo informó de la alta correlación entre la circunferencia escrotal ovina y bovina con la producción de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides normales, pero no lo encontró en su propio análisis en verracos (Clark *et al.*, 2003). Continuando con la valoración inicial y utilizando la ecografía en modo B, el volumen testicular (calculado a través de la longitud, anchura y profundidad testicular) mostró valores próximos a los comunicados previamente en carneros (Batissaco *et al.*, 2014; Camela *et al.*, 2019) y es el indicador principal de la producción espermática, donde los túbulos seminíferos son el principal constituyente testicular (Minter and DeLiberto, 2008; Condorelli *et al.*, 2013; Ehala-Aleksejev and Punab, 2017; Elweza *et al.*, 2021). Por otro lado, el cordón espermático aparecía como una zona circular anecoica, rodeada de regiones hiperecoicas; mientras que, en el Doppler color, el paquete vascular formado por la arteria testicular y el plexo pampiniforme se detectaba como grandes manchas con un grado variable de color rojo y azul durante la exploración, coincidiendo estos hallazgos con los descritos anteriormente en carneros (Camela *et al.*, 2019; Elbaz *et al.*, 2019; Hedia *et al.*, 2019). En el último punto de la valoración inicial y utilizando el modo Doppler pulsado, pudimos apreciar que los testículos derechos e izquierdos no presentaban diferencias en cuanto al flujo sanguíneo. Este hecho concuerda con estudios recientes, donde se observa un desarrollo simétrico de los testículos en los carneros (Camela *et al.*, 2019); además, se obtuvieron resultados similares en carneros de las razas Barki (Elbaz *et al.*, 2019), Dorper (Camela *et al.*, 2019) y egipcios de cola grasa (Hedia *et al.*, 2019). Por otro lado, los índices Doppler de la arteria testicular no se vieron afectados significativamente por el peso corporal, la edad ni la frecuencia del pulso (Elbaz



et al., 2019). Como hecho reseñable, en este estudio hemos realizado un análisis Doppler de la zona marginal de la arteria testicular (en el borde epididimario del testículo). Sin embargo, el equipo de ultrasonidos no pudo interpretar las ondas Doppler obtenidas debido al pequeño tamaño del vaso y la menor velocidad del flujo sanguíneo en esa zona. No ocurrió lo mismo en la especie canina, donde se evaluaron las medidas hemodinámicas de la arteria testicular en 5 regiones diferentes: supratesticular distal, media y proximal, marginal e intratesticular (Trautwein *et al.*, 2020). Centrándonos en las regiones objeto de estudio del presente trabajo, la zona supratesticular proximal presentó dificultades en la medición de la hemodinámica por dibujar algunas formas de onda altamente resistivas con flujo retrógrado al final de la diástole y grandes variaciones velocimétricas entre ondas consecutivas como las descritas previamente por Pozor y McDonnell (2004) en el caballo. En la medición del flujo sanguíneo en la zona supratesticular distal, nos encontramos con ondas monofásicas no resistivas con un patrón rectilíneo que imposibilitó la medición de los parámetros Doppler por no discernir marcadamente las fases del ciclo cardiaco como ya describieron otros autores (Camela *et al.*, 2019; Elbaz *et al.*, 2019; Hedia *et al.*, 2019). Sin embargo, en la zona supratesticular media no se encontró ninguna problemática en este sentido.

Una vez evaluadas las consideraciones previas y confirmada la ausencia de alteraciones en nuestro grupo de animales se procedió a la caracterización de la arteria testicular *per se* en los carneros en los cuales fue posible realizar la medición de la hemodinámica en las tres regiones (65%). Las imágenes de ultrasonografía en modo B revelaron variaciones significativas entre los diámetros de las arterias testiculares en el cordón espermático en las tres localizaciones estudiadas. El diámetro aumentó progresivamente a lo largo de su recorrido hasta entrar en el testículo. Este aumento progresivo del diámetro junto con una mayor tortuosidad permite una mayor superficie de intercambio de calor para mantener la temperatura testicular en los carneros aproximadamente 4 °C por debajo de la temperatura corporal (Coulter *et al.*, 1988). En cuanto a los índices Doppler, RI y PI son dos indicadores hemodinámicos medidos en la arteria testicular que se correlacionaron con la calidad de semen en caballos (Ortiz-Rodriguez *et al.*, 2017), perros (Zelli *et al.*,



2013) y carneros (Batissaco *et al.*, 2014; Elweza *et al.*, 2021). Recientemente, RI y PI han proporcionado datos útiles para predecir la futura función testicular y la producción espermática de los carneros (Camela *et al.*, 2019; Hedia *et al.*, 2019). En nuestro estudio, el patrón de flujo sanguíneo testicular medido por ultrasonografía modo Doppler pulsado reveló variaciones significativas en RI y PI entre las tres zonas estudiadas, marcando una resistencia del vaso y una pulsatilidad de las ondas de alta a intermedia en las zonas suprategicular proximal y media; mientras que, en la zona suprategicular distal, los valores fueron bajos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente en carneros (Batissaco *et al.*, 2014; Camela *et al.*, 2019; Elbaz *et al.*, 2019; Hedia *et al.*, 2019; Elweza *et al.*, 2021). Por otro lado, Hedia *et al.* (2019) informaron que los valores del flujo sanguíneo testicular, incluidos RI y PI, aumentaban durante el verano, con una disminución del volumen testicular. Esta variación podría atribuirse a la resistencia vascular y/o a la variación del nivel de testosterona, así como a la variación estacional. Además, no se encontraron diferencias significativas en los valores de los índices Doppler, incluidos RI y PI, en carneros prepúberes y postpúberes (Camela *et al.*, 2019), debido a que podría ocurrir lo mismo que en la especie humana, donde se demostró que la disposición vascular macroscópica de los testículos al nacer ya es similar a la observada en los testículos de individuos adultos (Suoranta, 1971). Los hallazgos de los valores de RI y PI aquí comunicados pueden explicarse por el hecho de que algunos órganos parenquimatosos como los testículos presentan normalmente un flujo sanguíneo continuo, asociado a una disminución gradual del periodo diastólico y sin flujo diastólico inverso que asegure una perfusión sanguínea constante para su correcto funcionamiento (Carvalho *et al.*, 2008). Considerando el tipo de perfusión sanguínea de los testículos, en este trabajo analizamos las diferentes formas de onda que se presentan a lo largo de la arteria testicular en las diferentes regiones que se evaluaron. Las formas de onda del flujo sanguíneo fueron bifásicas y resistivas en la zona suprategicular proximal, tendiendo a ser bifásicas con resistividad intermedia en la zona suprategicular media; mientras que la zona suprategicular distal mostró formas de onda monofásicas y no resistivas. En este sentido, y en contraste con nuestros hallazgos, algunos estudios llevados a cabo previamente encontraron



una forma de onda monofásica no resistiva en la zona supratesticular de la arteria testicular de los carneros, pero no se referenció la ubicación exacta de la medición (Elbaz *et al.*, 2019; Hedia *et al.*, 2019). Por su parte, en el caso de la especie equina, el flujo sanguíneo de la parte más proximal y tortuosa de la arteria testicular dentro del cordón espermático reveló un carácter resistivo y bifásico (Pozor and McDonnell, 2004). Estas diferencias de las formas de onda podrían atribuirse a variaciones de especie, raza, posición testicular, estación o disposición de los vasos sanguíneos (Velasco and Ruiz, 2021). Así, la región supratesticular de la arteria muestra algunas diferencias en la medición de varios parámetros del flujo sanguíneo, probablemente relacionadas con las circunvoluciones y la tortuosidad (Trautwein *et al.*, 2020). Como se detectó en nuestro estudio, las velocidades sanguíneas medidas mediante ultrasonografía modo Doppler pulsado mostraron una disminución progresiva y significativa, además de la pulsatilidad y la resistividad de los vasos cuando entran en el testículo. PSV y EDV fueron más altas en la zona supratesticular proximal mientras que los valores más bajos se registraron en la zona supratesticular distal. Estos hallazgos fueron bastante similares a los observados por Camela *et al.* (2019). Este hecho, a su vez, permite un mayor tiempo de contacto con la sangre venosa para el intercambio de calor y de gases con el tejido (Batissaco *et al.*, 2014). Además, los parámetros TABF y TABF rate mostraron un incremento significativo a medida que se evalúan más próximos al testículo, observándose los valores más altos en la zona supratesticular distal. Curiosamente, TABF y TABF rate se utilizan como indicadores fiables de la perfusión testicular, y son más sensibles que otras velocidades o índices similares para la detección de pequeños cambios en la perfusión testicular (Ortiz-Rodriguez *et al.*, 2017).

Tras la evaluación ecográfica de la morfometría de la arteria testicular en las tres zonas de la región supratesticular, se realizaron cortes histológicos en muestras *post mortem* de los mismos animales. El análisis morfométrico de las distintas capas de la pared arterial testicular reveló variaciones significativas de grosor entre las distintas zonas, donde los grosores de las tunicas arteriales eran mayores en la zona supratesticular proximal y disminuían distalmente. El mayor grosor de la túnica media, además del menor diámetro



luminal interno de la arteria testicular en la zona supratesticular proximal, explica el hecho de la elevada resistencia sanguínea encontrada normalmente en la evaluación hemodinámica. Además, la resistividad sanguínea disminuye normalmente según se mida en una zona más próxima al testículo debido al aumento de la prolongación y tortuosidad de la arteria testicular, con una reducción del grosor del endotelio vascular hasta entrar en el testículo (Trautwein *et al.*, 2020). Los diámetros arteriales externos medidos en las secciones histológicas fueron inferiores a los registrados mediante ultrasonografía en modo B *in vivo* en las mismas regiones. Estas variaciones pueden atribuirse al efecto de contracción de la fijación en formol y al procesamiento tisular de las muestras de la arteria testicular para los análisis histológicos. Esto fue revelado en un estudio previo en perro donde se observó una disminución del diámetro de los vasos sanguíneos por el procesamiento histológico (Dobrin, 1996). En cuanto a la túnica adventicia, desempeña un papel esencial en el estado saludable de la pared arterial. Está formada principalmente por fibras de colágeno y contiene tejidos linfáticos, fibras nerviosas y una red de microvasculatura conocida como *vasa vasorum*, que es responsable del suministro de nutrientes y oxígeno a la propia pared vascular (Li *et al.*, 2020). En ella, se encuentran una gran diversidad de células, como macrófagos, linfocitos, células dendríticas, células progenitoras de antígenos de células madre, mastocitos y fibroblastos (Mazurek *et al.*, 2017). Morfométricamente, el diámetro de la *vasa vasorum* era mayor en la región supratesticular proximal de la arteria testicular, y disminuía gradualmente en dirección distal hacia el testículo. Estos hallazgos confirmaron el hecho de que el grosor de la pared vascular es un factor importante para determinar la presencia o ausencia de *vasa vasorum* (Mescher, 2013; Tonar *et al.*, 2016). En cuanto a la túnica media, las células musculares lisas (SMCs) son el principal tipo celular y regulan el tono vascular y el flujo sanguíneo mediante la contracción y relajación celular dinámica. La α -actina del músculo liso (α -SMA) se considera el primer marcador de SMC que se expresa durante la embriogénesis, y es la proteína más abundante en las SMCs (Mazurek *et al.*, 2017). Considerando la importancia de la α -SMA como marcador, en este trabajo se realizó la técnica inmunohistoquímica para evaluar su presencia y la



de la vimentina. En cuanto a la expresión de α -SMA, fue mayor en la túnica media de la zona suprastesticular proximal de la arteria testicular que en las zonas suprastesticular media y distal. Esta reducción de la expresión en estas últimas puede atribuirse a la disminución gradual del grosor de la túnica media en la región más distal próxima al testículo. En cuanto a la vimentina, es una proteína maestra de los filamentos intermedios de las células musculares lisas y los tejidos y regula el citoesqueleto de actina en el músculo liso (Tang, 2018). Además, la vimentina también se expresa en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, lo que la convierte en un buen marcador de la distribución microvascular, ya que las células endoteliales de los vasos sanguíneos de todos los tamaños, desde los capilares hasta las arterias, son fuertemente reactivas (Sarnat and Flores-Sarnat, 2013). Cabe destacar que la vimentina mostró inmunorreactividad en la capa endotelial de todas las zonas suprastesticulares estudiadas. En el caso de la zona suprastesticular proximal, la túnica media mostró una mayor expresión de vimentina que en las zonas suprastesticulares media y distal. Los datos morfológicos y hemodinámicos mostraron en gran medida que las zonas suprastesticulares media y distal son prácticamente similares, no existiendo diferencias significativas entre ambas zonas en aproximadamente el 60% de los datos obtenidos. A pesar de esto, los parámetros que se diferenciaban se consideran importantes en la valoración clínica (velocidades sanguíneas e índices Doppler), a lo que hay que sumar la dificultad de medición en la región suprastesticular distal por las características del flujo sanguíneo en dicha región. Por el contrario, había grandes diferencias significativas entre las zonas suprastesticulares proximal y distal en todos los datos obtenidos. De acuerdo con estos resultados, se propone que la zona suprastesticular media puede utilizarse como región de referencia para evaluar la hemodinámica de la arteria testicular en el diagnóstico clínico de rutina.

Una vez estandarizadas las diferentes medidas ecográficas utilizadas para la valoración de los sementales, en la presente Tesis Doctoral se incluye un trabajo utilizando las mediciones tomadas mediante ultrasonografía en todos los niveles de complejidad aplicables en condiciones de campo junto con una evaluación seminal considerablemente compleja estudiando la motilidad y funcionalidad espermática. Todo ello, tratando de trasladar la realidad que se



vive en los centros de sementales. Uno de los problemas importantes de dichos centros es el excesivo ritmo de trabajo testicular que tienen algunos sementales de alto valor genético. Esta situación se convierte en rutina por la demanda de dosis de esos machos por parte de los ganaderos y, al tratarse de una situación que es difícilmente cambiable, se plantea un tercer trabajo utilizando como escenario práctico diferentes frecuencias de recogida seminal. Para contextualizarlo, se realizó un estudio retrospectivo a lo largo de cuatro años aprovechando la colaboración activa de nuestro grupo de investigación con el centro de sementales OVIGEN. En este estudio se utilizaron los datos recogidos desde el año 2018 al 2021 de la frecuencia de eyaculaciones de los 130 machos de raza Assaf alojados en el centro.

La mejora de los carneros donantes de semen, en términos de calidad y rendimiento espermático en los centros de reproducción, es una alternativa factible para incrementar los resultados de fertilidad de la inseminación artificial. En este contexto, la frecuencia de recogida de semen es un factor comúnmente estudiado en varias especies como el carnero (Aguirre *et al.*, 2007), el verraco (Frangé *et al.*, 2005), el caballo (Gamboa *et al.*, 2011), la paloma (Klimowicz *et al.*, 2005) o el ser humano (AlAwlaqi and Hammadeh, 2017). En nuestro estudio, la producción de espermatozoides y los parámetros de calidad disminuyeron al aumentar la frecuencia de recogida de semen. Estas evidencias concuerdan con los hallazgos de otros estudios realizados en carnero (Kaya *et al.*, 2002) o en el ser humano (Mayorga-Torres *et al.*, 2015), en los que también se informó de que el aumento de la frecuencia de recogida de semen tenía un impacto negativo en el recuento espermático. Nuestros hallazgos actuales concuerdan con los de un estudio realizado por Ollero *et al.* (1996), en el que se obtuvo aproximadamente un 27% menos de volumen de eyaculado tras 1 ó 2 días de abstinencia en comparación con una abstinencia de 3 días, y la concentración de espermatozoides disminuyó significativamente a medida que disminuía el periodo de abstinencia. En nuestro estudio, 72 horas de abstinencia sexual fueron suficientes para una recuperación parcial del volumen eyaculado y de la producción de espermatozoides, lo que nos permitió descartar un fenómeno de pérdida de funcionalidad testicular. En consonancia con nuestros resultados sobre la cantidad de espermatozoides, la motilidad



espermática, que se utiliza en la evaluación de rutina (Ollero *et al.*, 1996), mostró una disminución significativa en la frecuencia intensiva de recogida seminal (IF), lo que demuestra la influencia de la frecuencia de recogida seminal en los parámetros de motilidad espermática concordando con otros estudios en carneros (Kaya *et al.*, 2002) y verracos (Frangeî *et al.*, 2005).

En cuanto a la funcionalidad espermática, no hubo diferencias significativas en la viabilidad de los espermatozoides. En cambio, los parámetros de funcionalidad espermática más avanzados utilizados para valorar la conservación seminal y medidos mediante citometría de flujo mostraron cambios interesantes. La actividad de las caspasas 3 y 7, que son cisteinil aspartato proteasas específicas y ejecutan la ruptura de proteínas estructurales y DNA (Martí *et al.*, 2006), presentó el valor más alto en IF. Por ello, este hallazgo se relacionó con cambios apoptóticos, que podrían comprometer la capacidad de fecundación del ovocito (Said *et al.*, 2006; Dogan *et al.*, 2013). En cuanto a las especies reactivas de oxígeno (ROS), el porcentaje más bajo de contenido de ROS se encontró en IF. El contenido de ROS de los espermatozoides, medido mediante la sonda CellROX™ Deep red, refleja principalmente una intensa actividad mitocondrial en lugar de estrés oxidativo tal como se ha demostrado en equino (Plaza Davila *et al.*, 2015; Martin Muñoz *et al.*, 2016) y ovino (Anel-Lopez *et al.*, 2021; Riesco *et al.*, 2021). Así pues, una alta frecuencia de recogida seminal podría reducir la actividad mitocondrial de los espermatozoides de carnero debido a que podrían existir proteínas relacionadas con estos procesos y el tiempo de almacenaje de los espermatozoides en el conducto epididimario. Contrariamente a nuestros hallazgos, en la especie humana, los parámetros medidos por citometría de flujo no se vieron afectados significativamente tras un periodo de 2 semanas de eyaculación diaria, aunque también se observó una tendencia decreciente en la producción intracelular de ROS (Mayorga-Torres *et al.*, 2015). Y lo que es más interesante, tras un breve periodo de recuperación (3 días de abstinencia durante el fin de semana) en el modelo IF, la apoptosis y la actividad mitocondrial mejoraron significativamente. Esta mejoría en cuanto a la calidad espermática concuerda con las observaciones de Ihukwumere y Okere (1990) y podría deberse a que los espermatozoides pueden necesitar un tiempo mínimo



de almacenamiento en la cola del epidídimo. Varios componentes epididimarios han colaborado en la capacidad fecundante y la motilidad de los espermatozoides debido a cambios e interacciones bioquímicas y biofísicas (Dacheux *et al.*, 2003), como por ejemplo, la clusterina, que es la proteína más abundante del líquido epididimario en la cola de epidídimo del carnero (van Tilburg *et al.*, 2021). Esta proteína participa en la maduración espermática, el transporte de lípidos (Tenniswood *et al.*, 1992) y la remodelación de la membrana espermática; actúa como chaperona (Humphreys *et al.*, 1999) y previene el daño peroxidativo (Reyes-Moreno *et al.*, 2002).

Para completar la BSE, en este estudio en condiciones de campo, también se han utilizado métodos tradicionales como la libido y los exámenes clínicos (Tulley and Burfening, 1983; MacLaren, 1988; Fthenakis *et al.*, 2001) o la evaluación ecográfica básica, incluyendo la medición del volumen testicular (Camela *et al.*, 2019) y utilizándolo para comparar entre grupos experimentales. Como se ha demostrado en el primer trabajo de la presente Tesis Doctoral, en esta situación, una fórmula descrita en la bibliografía es válida por presentar una alta correlación entre el volumen que se calcula con dicha fórmula y el volumen testicular real. En este tercer trabajo, se detectó un aumento significativo del volumen testicular en la IF en comparación con el medido tras un mes de abstinencia sexual (AF), lo que podría explicarse por una elevada demanda de producción de espermatozoides que provoca una hipertrofia testicular temporal y compensatoria (Gaudino *et al.*, 2008). Otra posible explicación parcial al aumento observado del volumen testicular es el avance de la época reproductiva (Hedia *et al.*, 2019), ya que la duración del experimento fue de 2 meses. Como era de esperar, la testosterona sérica y la libido fueron mayores de forma significativa en IF en relación con los otros grupos experimentales. Esto podría estar relacionado con la estación del año y el sobreesfuerzo testicular, que podría desencadenar la activación de diferentes vías del eje hipotálamo-hipófisis, provocando el aumento de testosterona como mecanismo compensatorio. Algunos autores demostraron este efecto cuando aplicaron varios tratamientos para mejorar el rendimiento reproductivo, como la buserelina (El-Shalofy and Hedia, 2021) o la eCG (Beracochea *et al.*, 2020).



En este tipo de estudios en los que se trata de realizar una evaluación clínica de la capacidad reproductiva de los carneros, existen nuevos parámetros y estudios integrales de la evaluación ecográfica que podrían ser más predictivos y reforzar la optimización del manejo reproductivo actual del morueco para obtener una alta calidad espermática y mejorar las tasas de fertilidad. Por esto, en nuestro trabajo realizamos una valoración de la ecotextura testicular utilizando Ecotext® y una evaluación de la vascularización testicular utilizando parámetros Doppler en combinación con el análisis de la calidad espermática, incluyendo motilidad y fisiología espermáticas, para analizar posibles correlaciones. De acuerdo con la literatura publicada, esta es la primera vez que un factor del macho (frecuencia de recogida de semen) se utilizó de forma integral dentro de la BSE de carnero: desde la evaluación ultrasonográfica, como predictor de la capacidad reproductiva de los carneros, hasta la medición y análisis de la calidad espermática. Los parámetros de ecotextura revelaron cambios en la estructura del parénquima, aumentando la ecogenicidad a medida que se intensifica la frecuencia de recogida de semen. Observamos una disminución significativa del número de píxeles negros (EC1), del área tubular y del diámetro tubular con la intensificación de la frecuencia de recogida de semen. Todos ellos podrían estar relacionados con el lumen de los túbulos seminíferos. También se observó un aumento significativo del número de píxeles blancos (EC2) y del nivel medio de gris de los píxeles (EC3). Ambos cambios de ecotextura podrían deberse a la presencia de diferentes tipos de células del lumen, como demostraron Giffin *et al.* (2014), los cuales correlacionaron la ecotextura testicular con el tipo celular predominante (menor ecotextura con mayor grado de diferenciación celular) en el lumen de los túbulos seminíferos en la especie ovina. Así, nuestros hallazgos podrían explicarse por la alteración sufrida en la composición de las células del lumen bajo diferentes frecuencias de recogida seminal. Por otra parte, en un estudio realizado por Camela *et al.* (2019), los carneros peripúberes mostraron menor luz de los túbulos seminíferos y, por consiguiente, mayor ecotextura testicular que los carneros postpúberes. Estos hallazgos en carneros peripúberes podrían estar en concordancia con los cambios de ecotextura al aumentar la intensidad de la recogida seminal, mostrando menos áreas hipoecogénicas relacionadas



con el lumen de los túbulos seminíferos por un mayor vaciado de los túbulos. Por otro lado, la densidad de áreas hipoecogénicas por cm^2 no mostró cambios entre regímenes. Esto podría deberse a que, en los machos adultos, la cantidad relativa de túbulos seminíferos permanece estable cuando los machos alcanzan la madurez sexual (Steger and Wrobel, 1996). A pesar de ello, en la AF se encontraron correlaciones negativas entre la densidad tubular y la TM y los RAP PM. Esto podría sugerir que los machos con más túbulos seminíferos tienen una motilidad espermática deficiente en periodos de abstinencia en cuanto a la recogida de semen. Aunque una gran cantidad de espermatozoides podría almacenarse en el epidídimo en los machos con más túbulos seminíferos, durante los periodos de abstinencia prolongados, los espermatozoides están expuestos a varios factores inhibidores de la motilidad espermática [pH ácido y una elevada relación potasio/sodio en el líquido epididimario (Iwamoto and Gagnon, 1988; Skandhan, 2004)], que podrían afectar negativamente a su futura motilidad tras la eyaculación (Ayad *et al.*, 2018). Siguiendo con la valoración integral de la capacidad reproductiva de los carneros basada en la evaluación ecográfica, en la bibliografía se describió el modo Doppler pulsado como indicador de la funcionalidad testicular en condiciones estándar en carnero (Batissaco *et al.*, 2014; Hedia *et al.*, 2019), perro (Zelli *et al.*, 2013), caballo (Ortiz-Rodríguez *et al.*, 2017) u hombre (Pinggera *et al.*, 2008). Sin embargo, los parámetros Doppler no se habían investigado en diferentes frecuencias de recogida seminal correlacionando estos análisis con estudios de calidad espermática. En primer lugar, PSV y PI aumentaron significativamente y RI y TABF no variaron de forma significativa en SF en comparación con AF. Esto podría explicarse debido a que PSV y PI pueden ser predictores tempranos de cambios en la perfusión sanguínea testicular, como describieron Jolly *et al.* (2013). Además, el RI se altera cuando se producen trastornos más graves (Pinggera *et al.*, 2008). Este hecho también se apreció en la especie canina, donde los perros infértiles presentaban una PSV menor que los fértiles sin variar el RI porque la resistencia del lecho vascular depende de múltiples factores como el diámetro y la tortuosidad de los vasos (de Souza *et al.*, 2015). Aunque no se ha descrito previamente, observamos correlaciones positivas entre algunos parámetros ultrasonográficos (Área y diámetro tubular, RI y PI) y de



motilidad espermática (PM, RAP PM, VSL y BCF). Para conseguir explicar de forma clara y concisa esta correlación descubierta en nuestro trabajo, es necesario vislumbrar otras correlaciones previas descritas que demuestren que nuestros hallazgos cobran sentido. Es aquí donde aparecen los antioxidantes del plasma seminal. De esta forma, otros parámetros de calidad espermática se correlacionaron positivamente con algunos antioxidantes del plasma seminal como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reducido (Hedia *et al.*, 2020). Además, Hedia *et al.* (2020) también confirmaron correlaciones positivas entre los antioxidantes del plasma seminal presentados en muestras de espermatozoides de alta calidad y los índices Doppler, conectando así con nuestras correlaciones positivas en SF entre los parámetros ecográficos y los de motilidad espermática. Por otra parte, todos los índices (RI, PI y TABF) aumentaron significativamente en la IF con respecto a la SF. Este hallazgo podría indicar un aumento de la resistencia al flujo sanguíneo, de la pulsatilidad en las oscilaciones de la forma de onda y del flujo sanguíneo por minuto como consecuencia del estrés testicular por la frecuencia intensiva de recogida seminal. Teniendo en cuenta que una baja tensión de oxígeno en los túbulos seminíferos es esencial para la espermatogénesis (Bergh and Damber, 1993), la baja calidad del esperma en la IF podría justificarse por un aumento del flujo sanguíneo con una mayor tensión de oxígeno. Recientemente, Ntemka *et al.* (2018) correlacionaron negativamente los índices Doppler (RI y PI) con las anomalías espermáticas. En nuestro trabajo, encontramos, por primera vez, que estos índices Doppler correlacionaban negativamente con parámetros de funcionalidad espermática medidos por citometría de flujo en consonancia con Hedia *et al.* (2019) y Ntemka *et al.* (2018). Sin embargo, para encontrar estas correlaciones, planteamos la hipótesis de que es necesario exponer al testículo a un sobreesfuerzo. Un estudio reciente realizado por Brito *et al.* (2021) comparando perros jóvenes y seniles reveló una menor calidad espermática en los perros seniles y no detectó diferencias significativas en la evaluación ultrasonográfica en modo B (Brito *et al.*, 2020). En este sentido, las características vasculares de los testículos pueden ser los factores causales subyacentes a los cambios en la espermatogénesis y, como consecuencia, afectar negativamente a la calidad espermática de los carneros donantes en



una frecuencia intensiva de recogida seminal. Basándonos en nuestros resultados, estudios avanzados de la ecotextura y hemodinámica testicular medidos mediante software específico y modo Doppler, respectivamente, son cruciales en la evaluación ecográfica de la capacidad reproductiva de los sementales.

En la segunda parte del tercer trabajo, realizamos un ensayo de campo para demostrar la importancia de las frecuencias de recogida de semen en el éxito de la AI. Se ha demostrado que la fertilidad se ve afectada por muchos factores (intrínsecos y extrínsecos) relacionados con la hembra, con la explotación, con la propia técnica y, evidentemente, con el macho (Anel *et al.*, 2005, 2006; Alvarez *et al.*, 2019). Dentro de los factores dependientes del macho, la frecuencia de recogida de semen no se ha relacionado previamente con las tasas de fertilidad. Dentro de los eyaculados que se consideraron válidos según los criterios de exclusión de los centros de reproducción (Neila-Montero *et al.*, 2022), cuando realizamos análisis más avanzados como motilidad y funcionalidad espermática, detectamos diferencias significativas en varios parámetros (TM, PM, RAP PM, actividad de las Caspasas 3 y 7, y contenido en ROS) y, por tanto, pensamos que la capacidad fecundante de dichas muestras podría estar alterada. En nuestros resultados de campo, el intervalo estándar de abstinencia sexual, de 2 a 5 días, representó la tasa de fertilidad más elevada. Además, en un ensayo descriptivo, pudimos observar la misma tendencia en las tasas de fertilidad en la mayoría de los machos evaluados comparando diferentes días de abstinencia antes de la recogida de semen utilizada para la AI. Como hemos mencionado anteriormente, este hecho podría deberse a la influencia del tiempo de almacenamiento de los espermatozoides en la cola del epidídimo (van Tilburg *et al.*, 2021). Este trabajo allana el camino para conocer cuál sería la frecuencia óptima de recogida de semen para cada carnero. Sería muy beneficioso agrupar a los machos en diferentes frecuencias de recogida de semen para obtener el máximo rendimiento reproductivo de cada carnero y aumentar su fertilidad. Para lograrlo, se debería incluir una evaluación ultrasonográfica compleja en la BSE del carnero para predecir la capacidad reproductiva individual del macho y optimizar su manejo reproductivo. En esta Tesis Doctoral se asientan las bases de dicha BSE



ensalzando la importancia de la ultrasonografía como herramienta de evaluación. También se abren las puertas a la inclusión de nuevas alternativas para la predicción de la capacidad reproductiva del semental ovino como la Inteligencia Artificial utilizando algoritmos de Machine Learning que relacionen las imágenes ecográficas y la calidad seminal en términos cuantitativos y cualitativos, además de aproximarnos a la predicción de la fertilidad del carnero.

Conclusiones



PRIMERA. La ecografía es la herramienta más reproducible para las mediciones testiculares y la fórmula más precisa para calcular el volumen testicular en el carnero es la propuesta en la presente Tesis Doctoral: Volumen testicular = profundidad testicular x anchura testicular x longitud testicular x 0,61.

SEGUNDA. El volumen testicular es un buen indicador de la producción espermática en los carneros durante la época reproductiva con una frecuencia de recogida seminal alta (8-10 eyaculaciones por semana) y durante la no reproductiva con una frecuencia de recogida seminal estándar (4 eyaculaciones por semana). Por el contrario, no es un buen predictor durante la época reproductiva en machos con un régimen de trabajo estándar en cuyo caso sí lo es la concentración de testosterona sérica.

TERCERA. Las características morfológicas de la arteria testicular de carnero influyen en la hemodinámica sanguínea, de manera que el aumento del diámetro arterial en las regiones más próximas al testículo da lugar a una reducción de la velocidad sistólica e índices Doppler a este nivel.

CUARTA. La zona supratesticular media, de fácil acceso y con características hemodinámicas estandarizadas y reproducibles, es la región recomendada para la evaluación del flujo sanguíneo de la arteria testicular en la evaluación de los sementales ovinos.

QUINTA. La ultrasonografía puede predecir variaciones en la calidad espermática relacionadas con cambios en la ecotextura del parénquima testicular y en la hemodinámica de la arteria testicular.

SEXTA. La valoración andrológica a través de un estudio multiparamétrico que incluya una evaluación ultrasonográfica completa y una valoración seminal avanzada es muy útil para categorizar a los carneros de forma individual en función de su frecuencia de recogida seminal óptima, maximizando su rendimiento reproductivo.

Conclusions



FIRST. Ultrasonography is the most reproducible tool for testicular measurements and the most accurate formula for calculating testicular volume in rams is the one proposed in this Doctoral Thesis: Testicular Volume = testicular depth x testicular width x testicular length x 0.61.

SECOND. Testicular volume is a good predictor of sperm production during the breeding season in rams with a high semen collection frequency (8-10 ejaculations per week) and during the non-breeding season in rams with a standard semen collection frequency (4 ejaculations per week). In contrast, it is not a good predictor during the breeding season in rams with a standard semen collection frequency, in which case serum testosterone is a good predictor.

THIRD. The morphological characteristics of the ram testicular artery influence blood hemodynamics, such that the increase in arterial diameter in the regions closest to the testicle leads to a reduction in peak systolic velocity and Doppler indexes at this level.

FOURTH. The middle suprastesticular zone, easily accessible and with standardized and reproducible hemodynamic characteristics, is the recommended region for the evaluation of testicular artery blood flow in the evaluation of rams.

FIFTH. Ultrasonography can predict variations in sperm quality related to changes in testicular parenchymal echotexture and testicular artery hemodynamics.

SIXTH. Andrological assessment through a multiparametric study including a complete ultrasonographic evaluation and seminal assessment is very useful to categorize rams individually according to the optimal semen collection frequency, maximizing their reproductive performance.

Bibliografía



- Abdel-Razek, A. K. and Ali, A. (2005) "Developmental changes of bull (*Bos taurus*) genitalia as evaluated by caliper and ultrasonography", *Reproduction in Domestic Animals*, 40(1), pp. 23-27. doi:10.1111/J.1439-0531.2004.00549.X.
- Abecia, J. A., Carvajal-Serna, M., Casao, A., Palacios, C., Pulinas, L., Keller, M., Chemineau, P. and Delgadillo, J. A. (2020) "The continuous presence of ewes in estrus in spring influences testicular volume, testicular echogenicity and testosterone concentration, but not LH pulsatility in rams", *Animal*, 14(12), pp. 2554-2561. doi:10.1017/S1751731120001330.
- Aguirre, V., Orihuela, A. and Vázquez, R. (2007) "Effect of semen collection frequency on seasonal variation in sexual behaviour, testosterone, testicular size and semen characteristics of tropical hair rams (*Ovis aries*)", *Tropical Animal Health and Production*, 39(4), pp. 271-277. doi:10.1007/s11250-007-9010-8.
- AlAwlaqi, A. and Hammadeh, M. E. (2017) "Sexual abstinence and sperm quality", *International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences*, 5(1), pp. 11-17. doi:10.15296/ijwhr.2017.03.
- Alvarez, M., Anel-Lopez, L., Boixo, J. C., Chamorro, C., Neila-Montero, M., Montes-Garrido, R., de Paz, P. and Anel, L. (2019) "Current challenges in sheep artificial insemination: A particular insight", *Reproduction in Domestic Animals*, 54(S4), pp. 32-40. doi:10.1111/rda.13523.
- Amann, R. P. and Hammerstedt, R. H. (1993) "In vitro evaluation of sperm quality: An opinion", *Journal of Andrology*, 14(6), pp. 397-406. doi:10.1002/j.1939-4640.1993.tb03247.x.
- Anel-Lopez, L., Riesco, M. F., Montes-Garrido, R., Neila-Montero, M., Boixo, J. C., Chamorro, C., Ortega-Ferrusola, C., Carvajal, A., Altonaga, J. R., de Paz, P., Alvarez, M. and Anel, L. (2021) "Comparing the effect of different antibiotics in frozen-thawed ram sperm: Is it possible to avoid their addition?", *Frontiers in Veterinary Science*, 8(656937), pp. 1-11. doi:10.3389/fvets.2021.656937.
- Anel, L., Alvarez, M., Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Anel, E. and De Paz, P. (2006) "Improvement strategies in ovine artificial insemination", *Reproduction in Domestic Animals*, 41, pp. 30-42. doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00767.x.
- Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., De La Fuente, L. F. and De Paz, P. (2005) "Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in Churra ewes: A field assay", *Theriogenology*, 63(4), pp. 1235-1247. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.07.001.
- Auclair, D., Sowerbutts, S. F. and Setchell, B. P. (1995) "Effect of active immunization against testosterone on plasma gonadotrophin concentrations, spermatogenic function, testicular blood flow, epididymis mass and mating behaviour in adult rams", *Journal of Reproduction and Fertility*, 104, pp. 17-26. doi:10.1530/jrf.0.1040017.
- Avdi, M., Banos, G., Stefos, K. and Chemineau, P. (2004) "Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Serres rams", *Theriogenology*, 62(1-2), pp. 275-282. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.10.004.



- Awoniyi, C. A., Zirkin, B. R., Chandrashekar, V. and Schlaff, W. D. (1992) "Exogenously administered testosterone maintains spermatogenesis quantitatively in adult rats actively immunized against gonadotropin-releasing hormone", *Endocrinology*, 130(6), pp. 3283-3288. doi:10.1210/ENDO.130.6.1597140.
- Ayad, B. M., Van der Horst, G. and du Plessis, S. S. (2018) "Short abstinence: A potential strategy for the improvement of sperm quality", *Middle East Fertility Society Journal*, 23(1), pp. 37-43. doi:10.1016/j.mefs.2017.07.005.
- Bailey, T. ., Hudson, R. ., Powe, T. ., Riddell, M. ., Wolfe, D. . and Carson, R. . (1998) "Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo", *Theriogenology*, 49(3), pp. 581-594. doi:10.1016/S0093-691X(98)00009-0.
- Bartlewski, P. M., Giffin, J. L., Oluwole, O. A. and Hahnel, A. C. (2017) "Prospective ultrasonographic and endocrine predictors of spermatogenic onset in ram lambs", *Animal Reproduction Science*, 179, pp. 44-48. doi:10.1016/j.anireprosci.2017.01.015.
- Batissaco, L., Celeghini, E. C. C., Pinaffi, F. L. V., Oliveira, B. M. M. de, Andrade, A. F. C. de, Recalde, E. C. S. and Fernandes, C. B. (2014) "Correlations between testicular hemodynamic and sperm characteristics in rams", *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 50(5), p. 384. doi:10.11606/issn.2318-3659.v50i5p384-395.
- Beracochea, F., Manes, J., Viera, M. N., Santiago-Moreno, J. and Ungerfeld, R. (2020) "Administration of equine Chorionic Gonadotrophin (eCG) to rams to improve the reproductive performance during the non-breeding season", *Livestock Science*, 240(104125), pp. 1-8. doi:10.1016/J.LIVSCI.2020.104125.
- Bergh, A., Collin, O. and Lissbrant, E. (2001) "Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat", *Biology of Reproduction*, 64(1), pp. 13-20. doi:10.1095/BIOLREPROD64.1.13.
- Bergh, A. and Damber, J.-E. (1993) "Vascular controls in testicular physiology", in *Molecular Biology of the Male Reproductive System*, pp. 439-468. doi:10.1016/B978-0-08-091764-1.50017-9.
- Biagiotti, G., Cavallini, G., Modenini, F., Vitali, G. and Gianaroli, L. (2002) "Spermatogenesis and spectral echo-colour Doppler traces from the main testicular artery", *BJU International*, 90(9), pp. 903-908. doi:10.1046/j.1464-410X.2002.03033.x.
- Brito, L. F. ., Silva, A. E. D. ., Barbosa, R. T. and Kastelic, J. P. (2004) "Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production", *Theriogenology*, 61(2-3), pp. 511-528. doi:10.1016/S0093-691X(03)00231-0.
- Brito, L. F. C., Silva, A. E. D. F., Barbosa, R. T., Unanian, M. M. and Kastelic, J. P. (2003) "Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls", *Animal Reproduction Science*, 79(1-2), pp. 1-15. doi:10.1016/S0378-4320(03)00082-4.



- Brito, M. M., Angrimani, D. de S. R., Rui, B. R., Kawai, G. K. V., Losano, J. D. A. and Vannucchi, C. I. (2020) "Effect of senescence on morphological, functional and oxidative features of fresh and cryopreserved canine sperm", *Aging Male*, 23(4), pp. 279-286. doi:10.1080/13685538.2018.1487931.
- Brito, M. M., da Rosa Filho, R. R., Losano, J. D. A. and Vannucchi, C. I. (2021) "Ageing changes testes and epididymis blood flow without altering biometry and echodensity in dogs", *Animal Reproduction Science*, 228(106745), pp. 1-7. doi:10.1016/j.anireprosci.2021.106745.
- Camela, E. S. C. C., Nociti, R. P., Santos, V. J. C. C., Macente, B. I., Murawski, M., Vicente, W. R. R. R., Bartlewski, P. M. and Oliveira, M. E. F. (2019) "Changes in testicular size, echotexture, and arterial blood flow associated with the attainment of puberty in Dorper rams raised in a subtropical climate", *Reproduction in Domestic Animals*, 54(2), pp. 131-137. doi:10.1111/rda.13213.
- Cameron, A. W. N., Tilbrook, A. J., Lindsay, D. R., Keogh, E. J. and Fairnie, I. J. (1986) "The effect of testicular weight and insemination technique on fertility of sheep", *Animal Reproduction Science*, 12(3), pp. 189-194. doi:10.1016/0378-4320(86)90039-4.
- Carrillo, J. D., Soler, M., Lucas, X. and Agut, A. (2012) "Colour and pulsed Doppler ultrasonographic study of the canine testis", *Reproduction in Domestic Animals*, 47(4), pp. 655-659. doi:10.1111/j.1439-0531.2011.01937.x.
- Carvalho, C. F., Chammas, M. C. and Cerri, G. G. (2008) "Physical principles of Doppler ultrasonography", *Ciência Rural*, 38(3), pp. 872-879. doi:10.1590/S0103-84782008000300047.
- Casao, A., Pérez-Pé, R., Abecia, J. A., Forcada, F., Muño-Blanco, T. and Cebrián-Pérez, J. álvaro (2013) "The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidant defence system of Rasa Aragonesa rams", *Animal Reproduction Science*, 138(3-4), pp. 168-174. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2013.02.002.
- Chandolia, R. K., Bartlewski, P. M., Omeke, B. C., Beard, A. P., Rawlings, N. C. and Pierson, R. A. (1997) "Ultrasonography of the developing reproductive tract in ram lambs: effects of a GnRH agonist", *Theriogenology*, 48, pp. 99-117. doi:10.1016/S0093-691X(97)00194-5.
- Clark, S. G., Schaeffer, D. J. and Althouse, G. C. (2003) "B-Mode ultrasonographic evaluation of paired testicular diameter of mature boars in relation to average total sperm numbers", *Theriogenology*, 60, pp. 1011-1023. doi:10.1016/S0093-691X(03)00127-4.
- Condorelli, R., Calogero, A. E. and La Vignera, S. (2013) "Relationship between testicular volume and conventional or nonconventional sperm parameters", *International journal of Endocrinology*, 2013(145792), pp. 1-6. doi:10.1155/2013/145792.
- Coulter, G. H., Senger, P. L. and Bailey, D. R. C. (1988) "Relationship of scrotal surface temperature measured by infrared thermography to subcutaneous and deep testicular temperature in the ram", *Reproduction*, 84(2), pp. 417-423. doi:10.1530/JRF.0.0840417.



- Dacheux, J.-L., Gatti, J. L. and Dacheux, F. (2003) "Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation", *Microscopy Research and Technique*, 61(1), pp. 7-17. doi:10.1002/JEMT.10312.
- Deng, S. L., Wang, Z. P., Jin, C., Kang, X. L., Batool, A., Zhang, Y., Li, X. Y., Wang, X. X., Chen, S. R., Chang, C. S., Cheng, C. Y., Lian, Z. X. and Liu, Y. X. (2018) "Melatonin promotes sheep Leydig cell testosterone secretion in a co-culture with Sertoli cells", *Theriogenology*, 106, pp. 170-177. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2017.10.025.
- Dobrin, P. B. (1996) "Effect of histologic preparation on the cross-sectional area of arterial rings", *The Journal of Surgical Research*, 61, pp. 413-415. doi:10.1006/JSRE.1996.0138.
- Dogan, S., Mason, M. C., Govindaraju, A., Belser, L., Kaya, A., Stokes, J., Rowe, D. and Memili, E. (2013) "Interrelationships between apoptosis and fertility in bull sperm", *Journal of Reproduction and Development*, 59(1), pp. 18-26. doi:10.1262/jrd.2012-068.
- Donovan, A., Hanrahan, J. P., Kummen, E., Duffy, P. and Boland, M. P. (2004) "Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronised oestrus", *Animal Reproduction Science*, 84, pp. 359-368. doi:10.1016/j.anireprosci.2003.12.014.
- Ehala-Aleksejev, K. and Punab, M. (2017) "Relationships between total testicular volume, reproductive parameters and surrogate measures of adiposity in men presenting for couple's infertility", *Andrologia*, 50(e12952). doi:10.1111/AND.12952.
- El-Alamy, M. A. A., Foote, R. H. H. and Hare, E. (2001) "Sperm output and hormone concentrations in finn and dorset rams exposed to long- and short-day lighting", *Theriogenology*, 56, pp. 839-854. doi:10.1016/S0093-691X(01)00612-4.
- El-Shalofy, A., Hedia, M. and Kastelic, J. (2021) "Melatonin improves testicular haemodynamics, echotexture and testosterone production in Ossimi rams during the breeding season", *Reproduction in Domestic Animals*, 00, pp. 1-8. doi:10.1111/RDA.14010.
- El-Shalofy, A. S. and Hedia, M. G. (2021) "Effects of busserelin administration on testicular blood flow and plasma concentrations of testosterone and estradiol-17B in rams", *Domestic Animal Endocrinology*, 77(106646). doi:10.1016/J.DOMANIEND.2021.106646.
- Elbaz, H., Elweza, A. and Sharshar, A. (2019) "Testicular color Doppler ultrasonography in Barki rams", *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 61(1), pp. 39-45. doi:10.5455/ajvs.34994.
- Elmaz, Ö., Cirit, Ü. and Demir, H. (2007) "Relationship of testicular development with age, body weight, semen characteristics and testosterone in Kivircik ram lambs", *South African Journal of Animal Sciences*, 37(4), pp. 269-274. doi:10.4314/sajas.v37i4.4100.
- Elweza, A. E., Sharshar, A. M. and Elbaz, H. T. (2021) "Doppler and B-mode ultrasonographic monitoring of accessory sex glands and testes in Barki rams



- during the breeding season", *Veterinarska Stanica*, 52(2), pp. 173-183. doi:10.46419/VS.52.2.4.
- Emsen, E., Gimenez-Diaz, C., Kutluca, M. and Koycegiz, F. (2011) "Reproductive response of ewes synchronized with different lengths of MGA treatments in intrauterine insemination program", *Animal Reproduction Science*, 126, pp. 57-60. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2011.04.007.
- England, G. C. W., Bright, L., Pritchard, B., Bowen, I. M., de Souza, M. B., Silva, L. D. M. and Moxon, R. (2017) "Canine reproductive ultrasound examination for predicting future sperm quality", *Reproduction in Domestic Animals*, 52(Suppl. 2), pp. 202-207. doi:10.1111/rda.12825.
- EUROSTAT (2023) *Distribución de censos en la Unión Europea*.
- Fernandez-Abella, D., Becu-Villalobos, D., Lacau-Mengido, I. M., Villegas, N. and Bentancur, O. (1999) "Sperm production, testicular size, serum gonadotropins and testosterone levels in Merino and Corriedale breeds", *Reproduction Nutrition Development*, 39(5-6), pp. 617-624. doi:10.1051/rnd:19990508.
- Frangeî, R., Gider, T., Kosec, M., Frangež, R., Gider, T. and Kosec, M. (2005) "Frequency of boar ejaculate collection and its influence on semen quality, pregnancy rate and litter size", *Acta Veterinaria Brno*, 74(2), pp. 265-273. doi:10.2754/avb200574020265.
- Frungieri, M. B., Calandra, R. S. and Rossi, S. P. (2017) "Local actions of melatonin in somatic cells of the testis", *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), p. 1170. doi:10.3390/IJMS18061170.
- Fthenakis, G. C., Karagiannidis, A., Alexopoulos, C., Brozos, C., Saratsis, P. and Kyriakis, S. (2001) "Clinical and epidemiological findings during ram examination in 47 flocks in southern Greece", *Preventive Veterinary Medicine*, 52(1), pp. 43-52. doi:10.1016/S0167-5877(01)00238-0.
- Gamboa, S., Francisco, M., Gomes, P., Mendes, C., Machado-Faria, M. and Ramalho-Santos, J. (2011) "Level of glycolyzable substrates in stallion semen: Effect of ejaculation frequency on sperm survival after cool storage during the nonbreeding season", *Journal of Equine Veterinary Science*, 31(3), pp. 109-115. doi:10.1016/j.jevs.2010.12.011.
- Gaudino, R., Cavarzere, P., Camilot, M., Teofoli, F., Zampieri, N. and Tatò, L. (2008) "Prepubertal serum inhibin B in cryptorchid infants and in monorchid boys with compensatory testicular hypertrophy", *Fertility and Sterility*, 90(6), pp. 2217-2221. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.10.017.
- Giffin, J. L., Bartlewski, P. M. and Hahnel, A. C. (2014) "Correlations among ultrasonographic and microscopic characteristics of prepubescent ram lamb testes", *Experimental Biology and Medicine*, 239(12), pp. 1606-1618. doi:10.1177/1535370214543063.
- Giffin, J. L., Franks, S. E., Rodriguez-Sosa, J. R., Hahnel, A. and Bartlewski, P. M. (2009) "A study of morphological and haemodynamic determinants of testicular echotexture characteristics in the ram", *Experimental Biology and Medicine*, 234(7), pp. 794-801. doi:10.3181/0812-RM-364.



- Gouletsou, P. G. (2017) "Ultrasonographic examination of the scrotal contents in rams", *Small Ruminant Research*, 152, pp. 100-106. doi:10.1016/j.smallrumres.2016.12.022.
- Gouletsou, P. G. and Fthenakis, G. C. (2010) "Clinical evaluation of reproductive ability of rams", *Small Ruminant Research*, 92(1-3), pp. 45-51. doi:10.1016/j.smallrumres.2010.04.005.
- Gouletsou, P. G., Galatos, A. D. and Leontides, L. S. (2008) "Comparison between ultrasonographic and caliper measurements of testicular volume in the dog", *Animal Reproduction Science*, 108(1-2), pp. 1-12. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.06.020.
- Han, Y., Liu, G., Jiang, X., Ijaz, N., Tesema, B. and Xie, G. (2015) "KISS1 can be used as a novel target for developing a DNA immunocastration vaccine in ram lambs", *Vaccine*, 33(6), pp. 777-782. doi:10.1016/j.vaccine.2014.12.054.
- Handelsman, D. J. and Staraj, S. (1985) "Testicular size: The effects of aging, malnutrition, and illness", *Journal of Andrology*, 6(3), pp. 144-151. doi:10.1002/j.1939-4640.1985.tb00830.x.
- Hedia, M. G., El-Belely, M. S., Ismail, S. T. and Abo El-Maaty, A. M. (2019) "Monthly changes in testicular blood flow dynamics and their association with testicular volume, plasma steroid hormones profile and semen characteristics in rams", *Theriogenology*, 123, pp. 68-73. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.09.032.
- Hedia, M. G., El-Belely, M. S., Ismail, S. T. and El-Maaty, A. M. A. (2020) "Seasonal variation in testicular blood flow dynamics and their relation to systemic and testicular oxidant/antioxidant biomarkers and androgens in rams", *Reproduction in Domestic Animals*, 55(7), pp. 861-869. doi:10.1111/RDA.13696.
- Hsieh, M. L., Huang, S. T., Huang, H. C., Chen, Y. and Hsu, Y. C. (2009) "The reliability of ultrasonographic measurements for testicular volume assessment: Comparison of three common formulas with true testicular volume", *Asian Journal of Andrology*, 11(2), pp. 261-265. doi:10.1038/aja.2008.48.
- Humphreys, D. T., Carver, J. A., Easterbrook-Smith, S. B. and Wilson, M. R. (1999) "Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins", *The Journal of Biological Chemistry*, 274(11), pp. 6875-6881. doi:10.1074/JBC.274.11.6875.
- Hussein, H. A., Hassaneen, A. S. A., Ali, M. E., Sindi, R. A., Ashour, A. M., Fahmy, S. M., Swelum, A. A. and Ahmed, A. E. (2022) "The impact of rumen-protected L-arginine oral supplementation on libido, semen quality, reproductive organ biometry, and serum biochemical parameters of rams", *Frontiers in Veterinary Science*, 9(899434), pp. 1-9. doi:10.3389/FVETS.2022.899434.
- Ihukwumere, F. C. and Okere, C. (1990) "Effects of frequent ejaculations on semen characteristics of Nigerian Yankasa rams", *Small Ruminant Research*, 3(1), pp. 77-83. doi:10.1016/0921-4488(90)90034-4.
- Iwamoto, T. and Gagnon, C. (1988) "A human seminal plasma protein blocks the motility of human spermatozoa", *Journal of Urology*, 140, pp. 1045-1048. doi:10.1016/s0022-5347(17)41923-9.



- Jolly, T. A. D., Bateman, G. A., Levi, C. R., Parsons, M. W., Michie, P. T. and Karayanidis, F. (2013) "Early detection of microstructural white matter changes associated with arterial pulsatility", *Frontiers in Human Neuroscience*, 7(782), pp. 1-8. doi:10.3389/fnhum.2013.00782.
- Kafi, M., Safdarian, M. and Hashemi, M. (2004) "Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams", *Small Ruminant Research*, 53(1-2), pp. 133-139. doi:10.1016/j.smallrumres.2003.07.007.
- Kavak, A., Lundeheim, N., Aidnik, M. and Einarsson, S. (2003) "Testicular measurements and daily sperm output of Tori and Estonian breed stallions", *Reproduction in Domestic Animals*. *Reprod Domest Anim*, 38(3), pp. 167-169. doi:10.1046/J.1439-0531.2003.00418.X.
- Kaya, A., Aksoy, M. and Tekeli, T. (2002) "Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams", *Small Ruminant Research*, 44(2), pp. 153-158. doi:10.1016/S0921-4488(02)00051-2.
- Klimowicz, M., Łukaszewicz, E. and Dubiel, A. (2005) "Effect of collection frequency on quantitative and qualitative characteristics of pigeon (*Columba livia*) semen", *British Poultry Science*, 46(3), pp. 361-365. doi:10.1080/00071660500098210.
- Kumar, T. R., Wang, Y., Lu, N. and Matzuk, M. M. (1997) "Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility", *Nature Genetics*, 15, pp. 201-204. doi:10.1038/ng0297-201.
- Kutzler, M., Tyson, R., Grimes, M. and Timm, K. (2011) "Determination of testicular blood flow in camelids using vascular casting and color pulsed-wave Doppler ultrasonography", *Veterinary Medicine International*, 2011(638602), pp. 1-7. doi:10.4061/2011/638602.
- Lambert, B. (1951) "The frequency of mumps and of mumps orchitis: Consequences for sexuality and fertility", *Human Heredity*, 2, pp. 1-6. doi:10.1159/000150685.
- Langford, G. A. A., Shrestha, J. N. B. N. B. and Marcus, G. J. J. (1989) "Repeatability of scrotal size and semen quality measurements in rams in a short-day light regime", *Animal Reproduction Science*, 19(1-2), pp. 19-27. doi:10.1016/0378-4320(89)90043-2.
- Li, X. D., Hong, M. N., Chen, J., Lu, Y. Y., Ye, M. Q., Ma, Y., Zhu, D. L. and Gao, P. J. (2020) "Adventitial fibroblast-derived vascular endothelial growth factor promotes *vasa vasorum*-associated neointima formation and macrophage recruitment", *Cardiovascular Research*, 116(3), pp. 708-720. doi:10.1093/CVR/CVZ159.
- Lin, C. C., Huang, W. J. S. and Chen, K. K. (2009) "Measurement of testicular volume in smaller testes: How accurate is the conventional orchidometer?", *Journal of Andrology*, 30(6), pp. 685-689. doi:10.2164/jandrol.108.006460.
- Lunstra, D. D. and Cundiff, L. V (2003) "Growth and pubertal development in Brahman-, Boran-, Tuli-, Belgian Blue-, Hereford- and Angus-sired F1 bulls", *Journal Animal Science*, 81, pp. 1414-1426. doi:10.2527/2003.8161414x.



- MacLaren, A. P. C. (1988) "Ram fertility in South-West Scotland", *British Veterinary Journal*, 144(1), pp. 45-54. doi:10.1016/0007-1935(88)90151-0.
- Magalhaes, H. B., Canuto, L. E. F., Zhao, F., Li, M., Li, X., Ji, C. and Canisso, I. F. (2021) "Daily sperm output, spermatogenic efficiency, and sexual behavior of Dezhou donkey jacks mounting jennies in estrus", *Journal of Equine Veterinary Science*, 101. doi:10.1016/J.JEVS.2021.103420.
- MAPA (2023a) *Caracterización del sector ovino y caprino de carne en España*.
- MAPA (2023b) *Caracterización del sector ovino y caprino de leche en España*.
- Maquivar, M. G., Smith, S. M. and Busboom, J. R. (2021) "Reproductive management of rams and ram lambs during the pre-breeding season in US sheep farms", *Animals*, 11(2503), pp. 1-12. doi:10.3390/ANI11092503.
- Martí, E., Pérez-Pé, R., Muño-Blanco, T. and Cebrián-Pérez, J. A. (2006) "Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa", *Journal of Andrology*, 27(6), pp. 746-753. doi:10.2164/jandrol.106.000109.
- Martin Muñoz, P., Ortega-Ferrusola, C., Anel-Lopez, L., del Petre, C., Alvarez, M., de Paz, P., Anel, L. and Peña, F. J. (2016) "Caspase 3 activity and lipoperoxidative status in raw semen predict the outcome of cryopreservation of stallion spermatozoa", *Biology of Reproduction*, 95(3), pp. 53-53. doi:10.1095/biolreprod.116.139444.
- Mayorga-Torres, B. J. M., Camargo, M., Agarwal, A., du Plessis, S. S., Cadavid, Á. P. and Cardona Maya, W. D. (2015) "Influence of ejaculation frequency on seminal parameters", *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), pp. 1-7. doi:10.1186/s12958-015-0045-9.
- Mazurek, R., Dave, J. M., Chandran, R. R., Misra, A., Sheikh, A. Q. and Greif, D. M. (2017) "Vascular cells in blood vessel wall development and disease", *Advances in Pharmacology*, 78, pp. 323-350. doi:10.1016/BS.APHA.2016.08.001.
- Meehan, T., Schlatt, S., O'Bryan, M. K., De Kretser, D. M. and Loveland, K. L. (2000) "Regulation of germ cell and sertoli cell development by activin, follistatin, and FSH", *Developmental Biology*, 220(2), pp. 225-237. doi:10.1006/DBIO.2000.9625.
- Mescher, A. L. (2013) *Junqueira's basic histology: text and atlas*. 13th ed. New York: McGraw-Hill Medical.
- Mickelsen, W. D., Paisley, L. G. and Dahmen, J. J. (1982) "Seasonal variations in scrotal circumference, sperm quality, and sexual ability in rams", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 181(4), pp. 376-380.
- Milczewski, V., Chahad-Ehlers, S., Spencoski, K. M., Morais, R. N. and Thomaz Soccol, V. (2015) "Quantifying the effect of seasonality on testicular function of Suffolk ram in lower latitude", *Small Ruminant Research*, 124, pp. 68-75. doi:10.1016/j.smallrumres.2014.12.012.
- Minter, L. J. and DeLiberto, T. J. (2008) "Seasonal variation in serum testosterone, testicular volume, and semen characteristics in the coyote (*Canis latrans*)",



Theriogenology, 69, pp. 946-952.
doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.01.010.

- Montes-Garrido, R., Neila-Montero, M., Anel-Lopez, L., Palacin-Martinez, C., Anel, L. and Alvarez, M. (2023) "Avances en la evaluación andrológica de los sementales ovinos", *Tierras Ovino*, 40, pp. 80-84.
- Montes-Garrido, R., Riesco, M. F., Anel-Lopez, L., Neila-Montero, M., Palacin-Martinez, C., Boixo, J. C., de Paz, P., Ortega-Ferrusola, C., Hassan, M. A. A., Anel, L. and Alvarez, M. (2022) "Application of ultrasound technique to evaluate the testicular function and its correlation to the sperm quality after different collection frequency in rams", *Frontiers in Veterinary Science*, 9(1869), pp. 1-18. doi:10.3389/FVETS.2022.1035036.
- Moxon, R., Bright, L., Pritchard, B., Bowen, I. M., de Souza, M. B., da Silva, L. D. M. and England, G. C. W. (2015) "Digital image analysis of testicular and prostatic ultrasonographic echogenicity and heterogeneity in dogs and the relation to semen quality", *Animal Reproduction Science*, 160, pp. 112-119. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.07.012.
- Mozo, R., Galeote, A. I., Alabart, J. L., Fantova, E. and Folch, J. (2015) "Evaluating the reproductive ability of breeding rams in North-Eastern Spain using clinical examination of the body and external genitalia", *BMC Veterinary Research*, 11(1), pp. 1-11. doi:10.1186/s12917-015-0600-9.
- Neila-Montero, M., Riesco, M. F., Montes-Garrido, R., Palacin-Martinez, C., Chamorro, C., Paz, P. De, Alvarez, M., Anel, L. and Anel-Lopez, L. (2022) "An optimized centrifugation protocol for ram sperm ensuring high sample yield, quality and fertility", *Theriogenology*, 191, pp. 179-191. doi:10.1016/j.theriogenology.2022.08.006.
- Noordhuizen-Stassen, E. N., Charbon, G. A., Jong, F. H. De and Wensing, C. J. G. (1985) "Functional arterio-venous anastomoses between the testicular artery and the pampiniform plexus in the spermatic cord of rams", *Journal of Reproduction and Fertility*, 75, pp. 193-201. doi:10.1530/jrf.0.0750193.
- Ntemka, A., Kiossis, E., Boscós, C., Theodoridis, A., Kourousekos, G. and Tsakmakidis, I. (2018) "Effects of testicular hemodynamic and echogenicity changes on ram semen characteristics", *Reproduction in Domestic Animals*, 53(Suppl. 2), pp. 50-55. doi:10.1111/rda.13279.
- Ollero, M., Muñio-Blanco, T., López-Pérez, M. J. and Cebrián-Pérez, J. A. (1996) "Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations", *International Journal of Andrology*, 19(5), pp. 287-292. doi:10.1111/j.1365-2605.1996.tb00477.x.
- Ortega-Ferrusola, C., Gracia-Calvo, L., Ezquerro, J. and Pena, F. (2014) "Use of colour and spectral Doppler ultrasonography in stallion andrology", *Reproduction in Domestic Animals*, 49(Suppl. 4), pp. 88-96. doi:10.1111/rda.12363.
- Ortiz-Rodríguez, J. M., Anel-Lopez, L., Martín-Munõz, P., Alvarez, M., Gaitskell-Phillips, G., Anel, L., Rodríguez-Medina, P., Penã, F. J. and Ortega-Ferrusola, C. (2017) "Pulse Doppler ultrasound as a tool for the diagnosis of chronic testicular dysfunction in stallions", *PLoS ONE*, 12(5), pp. 1-21.



doi:10.1371/journal.pone.0175878.

- Paltiel, H. J., Diamond, D. A., Di Canzio, J., Zurakowski, D., Borer, J. G. and Atala, A. (2002) "Testicular volume: Comparison of orchidometer and US measurements in dogs", *Radiology*, 222(1), pp. 114-119. doi:10.1148/radiol.2221001385.
- Pardos, L., Maza, M. T., Fantova, E. and Sepúlveda, W. (2008) "The diversity of sheep production systems in Aragón (Spain): Characterisation and typification of meat sheep farms", *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6(4), pp. 497-507. doi:10.5424/sjar/2008064-344.
- Paulenz, H., Söderquist, L., Ådnøy, T., Nordstoga, A., Gulbrandsen, B. and Andersen Berg, K. (2004) "Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws", *Theriogenology*, 61, pp. 1719-1727. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2003.10.001.
- Pinggera, G.-M., Mitterberger, M., Bartsch, G., Strasser, H., Gradl, J., Aigner, F., Pallwein, L. and Frauscher, F. (2008) "Assessment of the intratesticular resistive index by colour Doppler ultrasonography measurements as a predictor of spermatogenesis", *BJU International*, 101(6), pp. 722-726. doi:10.1111/j.1464-410X.2007.07343.x.
- Plant, T. M. and Marshall, G. R. (2001) "The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates", *Endocrine reviews*, 22(6), pp. 764-786. doi:10.1210/EDRV.22.6.0446.
- Plaza Davila, M., Martin Muñoz, P., Tapia, J. A., Ortega Ferrusola, C., Balao da Silva C, C. and Peña, F. J. (2015) "Inhibition of mitochondrial complex I leads to decreased motility and membrane integrity related to increased hydrogen peroxide and reduced ATP production, while the inhibition of glycolysis has less impact on sperm motility", *PLoS ONE*, 10(9), pp. 1-21. doi:10.1371/journal.pone.0138777.
- Pozor, M. A. and McDonnell, S. M. (2004) "Color Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions", *Theriogenology*, 61, pp. 799-810. doi:10.1016/S0093-691X(03)00227-9.
- Pozor, M. A., Nolin, M., Roser, J., Runyon, S., Macpherson, M. L. and Kelleman, A. (2014) "Doppler indices of vascular impedance as indicators of testicular dysfunction in stallions", *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(1), pp. 38-39. doi:10.1016/j.jevs.2013.10.021.
- Prader, A. (1966) "Testicular size: assessment and clinical importance", *Triangle; the Sandoz journal of medical science*, 7(6), pp. 240-243.
- Pricking, S., Bollwein, H., Spilker, K., Martinsson, G., Schweizer, A., Thomas, S., Oldenhof, H. and Sieme, H. (2017) "Testicular volumetry and prediction of daily sperm output in stallions by orchidometry and two- and three-dimensional sonography", *Theriogenology*, 104, pp. 149-155. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2017.08.015.
- Reiter, R. J. (1980) "The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals", *Endocrine Reviews*, 1(2), pp. 109-131. doi:10.1210/edrv-1-2-109.



- Reiter, R. J. (1991) "Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions", *Endocrine Reviews*, 12(2), pp. 151-180. doi:10.1210/edrv-12-2-151.
- Rekik, M., Taboubi, R., Ben Salem, I., Fehri, Y., Sakly, C., Lassoued, N. and Hilali, M. E. (2015) "Melatonin administration enhances the reproductive capacity of young rams under a southern Mediterranean environment", *Animal Science Journal*, 86(7), pp. 666-672. doi:10.1111/ASJ.12350.
- Reyes-Moreno, C., Boilard, M., Sullivan, R. and Sirard, M.-A. (2002) "Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage", *Biology of Reproduction*, 66(1), pp. 159-166. doi:10.1095/BIOLREPROD66.1.159.
- Ribeiro, M. da S., Quirino, C. R., Bartholazzi Junior, A. and Pacheco, A. (2017) "Biometry and ultrasound evaluation of testicles and accessory glands in Santa Ines rams", *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46(4), pp. 317-323. doi:10.1590/s1806-92902017000400007.
- Riesco, M. F., Alvarez, M., Anel-Lopez, L., Neila-Montero, M., Palacin-Martinez, C., Montes-Garrido, R., Boixo, J. C., de Paz, P. and Anel, L. (2021) "Multiparametric study of antioxidant effect on ram sperm cryopreservation—from field trials to research bench", *Animals*, 11(283), pp. 1-14. doi:10.3390/ani11020283.
- Rivkees, S. A., Hall, D. A., Boepple, P. A. and Crawford, J. D. (1987) "Accuracy and reproducibility of clinical measures of testicular volume", *The Journal of Pediatrics*, 110(6), pp. 914-917. doi:10.1016/S0022-3476(87)80412-2.
- Said, T., Agarwal, A., Grunewald, S., Rasch, M., Baumann, T., Kriegel, C., Li, L., Glander, H.-J., Thomas Jr., A. J. and Paasch, U. (2006) "Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: An in vitro model", *Biology of Reproduction*, 74(3), pp. 530-537. doi:10.1095/biolreprod.105.046607.
- Sakamoto, H., Yajima, T., Nagata, M., Okumura, T., Suzuki, K. and Ogawa, Y. (2008) "Relationship between testicular size by ultrasonography and testicular function: Measurement of testicular length, width, and depth in patients with infertility", *International Journal of Urology*, 15(6), pp. 529-533. doi:10.1111/j.1442-2042.2008.02071.x.
- Samir, H., El-Shalofy, A. S. and El-Sherbiny, H. R. (2023) "Effects of a single dose of long-acting FSH on testicular blood flow, testicular echotexture, and circulating testosterone, estradiol, and nitric oxide in rams during the non-breeding season", *Domestic Animal Endocrinology*, 82(106765), pp. 1-8. doi:10.1016/J.DOMANIEND.2022.106765.
- Samir, H., Radwan, F. and Watanabe, G. (2021) "Advances in applications of color Doppler ultrasonography in the andrological assessment of domestic animals: A review", *Theriogenology*, 161, pp. 252-261. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.12.002.
- Samir, H., Sasaki, K., Ahmed, E., Karen, A., Nagaoka, K., El Sayed, M., Taya, K. and Watanabe, G. (2015) "Effect of a single injection of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and human chorionic gonadotropin (hCG) on testicular blood



- flow measured by color doppler ultrasonography in male Shiba goats", *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(5), pp. 549-556. doi:10.1292/jvms.14-0633.
- Sarnat, H. B. and Flores-Sarnat, L. (2013) "Neuropathology of pediatric epilepsy", in Dulac, O., Lassonde, M., and Sarnat, H. B. (eds.) *Handbook of Clinical Neurology Pediatric Neurology Part I*. 3rd series. Elsevier, pp. 399-416. doi:10.1016/B978-0-444-52891-9.00044-0.
- Sary, R. G., Mohamed, R. H., Khalil, K. M., Al-lethie, A. L. A. and Hussein, H. A. (2020) "Relationship between angioarchitecture of the testicular artery and spermogram parameters in Egyptian buffalo bulls (*Bubalus bubalis*)", *Reproduction in Domestic Animals*, 55(3), pp. 343-350. doi:10.1111/RDA.13635.
- Schiff, J. D., Li, P. S. and Goldstein, M. (2004) "Correlation of ultrasonographic and orchidometer measurements of testis volume in adults", *BJU International*, 93, pp. 1015-1017. doi:10.1111/j.1464-410X.2004.04772.x.
- Senger, P. L. (2012) *Pathways to pregnancy & parturition*. Third Edit. Edited by P. L. Senger. Washington: Current Conceptions, Inc.
- Setchell, B. P. (1990) "Local control of testicular fluids", *Reproduction, Fertility and Development*. CSIRO PUBLISHING, 2(3), pp. 291-309. doi:10.1071/RD9900291.
- Shalet, S. M. (2009) "Normal testicular function and spermatogenesis", *Pediatric Blood & Cancer*, 53, pp. 285-288. doi:10.1002/pbc.22000.
- SITRAN (2023) *Informe SITRAN (enero 2024)*.
- Skandhan, K. P. (2004) "Hypothesis: Epididymis inhibits sperm motility inside male reproductive tract", *Medical Hypotheses*, 62(1), pp. 146-150. doi:10.1016/S0306-9877(03)00238-X.
- de Souza, M. B., da Cunha Barbosa, C., Pereira, B. S., Monteiro, C. L. B., Pinto, J. N., Linhares, J. C. S. and da Silva, L. D. M. (2014) "Doppler velocimetric parameters of the testicular artery in healthy dogs", *Research in Veterinary Science*, 96(3), pp. 533-536. doi:10.1016/j.rvsc.2014.03.008.
- de Souza, M. B., England, G. C. W., Mota Filho, A. C., Ackermann, C. L., Sousa, C. V. S., de Carvalho, G. G., Silva, H. V. R., Pinto, J. N., Linhares, J. C. S., Oba, E. and da Silva, L. D. M. (2015) "Semen quality, testicular B-mode and Doppler ultrasound, and serum testosterone concentrations in dogs with established infertility", *Theriogenology*, 84(5), pp. 805-810. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.05.015.
- Souza, M. B., Mota Filho, A. C., Sousa, C. V. S., Monteiro, C. L. B., Carvalho, G. G., Pinto, J. N., Linhares, J. C. S. and Silva, L. D. M. (2014) "Triplex Doppler evaluation of the testes in dogs of different sizes", *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(11), pp. 1135-1140. doi:10.1590/S0100-736X2014001100017.
- Steger, K. and Wrobel, K. H. (1994) "Immunohistochemical demonstration of cytoskeletal proteins in the ovine testis during postnatal development", *Anatomy and Embryology*, 189(6), pp. 521-530. doi:10.1007/BF00186825.
- Steger, K. and Wrobel, K. H. (1996) "Postnatal development of ovine seminiferous tubules: An electron microscopical and morphometric study", *Annals of*



- Anatomy*, 178(3), pp. 201-213. doi:10.1016/S0940-9602(96)80048-3.
- Strina, A., Corda, A., Nieddu, S., Solinas, G., Lilliu, M., Zedda, M. T., Pau, S. and Ledda, S. (2016) "Annual variations in resistive index (RI) of testicular artery, volume measurements and testosterone levels in bucks", *Comparative Clinical Pathology*, 25(2), pp. 409-413. doi:10.1007/s00580-015-2199-4.
- Suoranta, H. (1971) "Postnatal development of the vascular supply of the human testis", *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 133(2), pp. 184-192. doi:10.1007/BF00528023/METRICS.
- Taha, T. A., Abdel-Gawad, E. I. and Ayoub, M. A. (2000) "Monthly variations in some reproductive parameters of Barki and Awassi rams throughout 1 year under subtropical conditions 1. Semen characteristics and hormonal levels", *Animal Science*, 71(2), pp. 317-324. doi:10.1017/S1357729800055168.
- Tajangookh, H. D., Shahneh, A. Z., Shahrehabak, M. M. and Shakeri, M. (2007) "Monthly variation of plasma concentrations of testosterone and thyroid hormones and reproductive characteristics in three breeds of Iranian fat-tailed rams throughout one year", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(19), pp. 3420-3424. doi:10.3923/pjbs.2007.3420.3424.
- Takahara, H., Sakatoku, J., Fujii, M., Nasu, T., Cosentino, M. J. and Cockett, A. T. (1983) "Significance of testicular size measurement in andrology. I. A new orchimeter and its clinical application", *Fertility and Sterility*, 39(6), pp. 836-840. doi:10.1016/S0015-0282(16)47126-8.
- Tang, D. D. (2018) "The dynamic actin cytoskeleton in smooth muscle", in Khalil, R. A. (ed.) *Advances in Pharmacology*. Academic Press, pp. 1-38. doi:10.1016/BS.APHA.2017.06.001.
- Tapanainen, J. S., Vaskivuo, T., Aittomäki, K. and Huhtaniemi, I. T. (1998) "Inactivating FSH receptor mutations and gonadal dysfunction", *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145(1-2), pp. 129-135. doi:10.1016/S0303-7207(98)00179-8.
- Tenniswood, M., Guenette, R., Lakins, J., Mooibroek, M., Wong, P. and Welsh, J. (1992) "Active cell death in hormone-dependent tissues", *Cancer metastasis reviews*, 11(2), pp. 197-220. doi:10.1007/BF00048064.
- Thompson, J. A., Love, C. C., Stich, K. L., Brinsko, S. P., Blanchard, T. L. and Varner, D. D. (2004) "A Bayesian approach to prediction of stallion daily sperm output", *Theriogenology*, 62, pp. 1607-1617. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2004.03.015.
- van Tilburg, M., Sousa, S., Lobo, M. D. P., Monteiro-Azevedo, A. C. O. M., Azevedo, R. A., Araújo, A. A. and Moura, A. A. (2021) "Mapping the major proteome of reproductive fluids and sperm membranes of rams: From the cauda epididymis to ejaculation", *Theriogenology*, 159, pp. 98-107. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.10.003.
- Tonar, Z., Tomášek, P., Loskot, P., Janáček, J., Králíčková, M. and Witter, K. (2016) "Vasa vasorum in the tunica media and tunica adventitia of the porcine aorta", *Annals of Anatomy*, 205, pp. 22-36. doi:10.1016/J.AANAT.2016.01.008.



- Trautwein, L. G. C., Souza, A. K., Cardoso, G. S., da Costa Flaiban, K. K. M., de Oliveira Dearo, A. C. and Martins, M. I. M. (2020) "Correlation of testicular artery Doppler velocimetry with kinetics and morphologic characteristics of epididymal sperm in dogs", *Reproduction in Domestic Animals*, 55(6), pp. 720-725. doi:10.1111/RDA.13672.
- Tulley, D. and Burfening, P. J. (1983) "Libido and scrotal circumference of rams as affected by season of the year and altered photoperiod", *Theriogenology*, 20, pp. 435-448. doi:10.1016/0093-691X(83)90203-0.
- Velasco, A. and Ruiz, S. (2021) "New approaches to assess fertility in domestic animals: Relationship between arterial blood flow to the testicles and seminal quality", *Animals*, 11(12), pp. 1-13. doi:10.3390/ANI11010012.
- Zamiri, M. J., Khalili, B., Jafaroghli, M. and Farshad, A. (2010) "Seasonal variation in seminal parameters, testicular size, and plasma testosterone concentration in Iranian Moghani rams", *Small Ruminant Research*, 94(1-3), pp. 132-136. doi:10.1016/j.smallrumres.2010.07.013.
- Zamiri, M. J. and Khodaei, H. R. (2005) "Seasonal thyroidal activity and reproductive characteristics of Iranian fat-tailed rams", *Animal Reproduction Science*, 88(3-4), pp. 245-255. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.12.005.
- Zelli, R., Troisi, A., Elad Ngonput, A., Cardinali, L. and Polisca, A. (2013) "Evaluation of testicular artery blood flow by Doppler ultrasonography as a predictor of spermatogenesis in the dog", *Research in Veterinary Science*, 95(2), pp. 632-637. doi:10.1016/j.rvsc.2013.04.023.

Anexo I

Otras contribuciones científicas



Durante el periodo de realización de la Tesis Doctoral, se ha participado en los siguientes artículos científicos que no componen los resultados incluidos en la presente memoria:

- Mercedes Alvarez, Luis Anel-Lopez, Juan Carlos Boixo, Cesar Chamorro, Marta Neila-Montero, Rafael Montes-Garrido, Paulino de Paz y Luis Anel. (2019). Current challenges in sheep insemination: A particular insight. *Reproduction in Domestic Animals*, 54 - Suppl. 4, pp. 32-40.

<https://doi.org/10.1111/rda.13523>

- Marta F. Riesco, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Rafael Montes-Garrido, Mercedes Alvarez, Paulino de Paz y Luis Anel. (2020). ProAKAP4 as novel molecular marker of sperm quality in ram: An integrative study in fresh, cooled and cryopreserved sperm. *Biomolecules*, 10-7, 1046.

<https://doi.org/10.3390/biom10071046>

- Marta F. Riesco, Mercedes Alvarez, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Rafael Montes-Garrido, Juan Carlos Boixo, Paulino de Paz y Luis Anel. (2021). Multiparametric study of antioxidant effect on ram sperm cryopreservation - From field trials to research bench. *Animals*, 11, 283.

<https://doi.org/10.3390/ani11020283>

- Luis Anel-Lopez, Marta F. Riesco, Rafael Montes-Garrido, Marta Neila-Montero, Juan Carlos Boixo, Cesar Chamorro, Cristina Ortega-Ferrusola, Ana Carvajal, Jose Antonio Rodriguez-Altonaga, Paulino de Paz, Mercedes Alvarez y Luis Anel. (2021). Comparing the effect of different antibiotics in frozen-thawed ram sperm: Is it possible to avoid their addition? *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 656937.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.656937>

- Marta Neila-Montero, Marta F. Riesco, Mercedes Alvarez, Rafael Montes-Garrido, Juan Carlos Boixo, Paulino de Paz, Luis Anel-Lopez y Luis Anel. (2021). Centrifugal force assessment in ram sperm: identifying species-specific impact. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 63, 42.

<https://doi.org/10.1186/s13028-021-00609-8>



- Cristina Palacin-Martinez, Mercedes Alvarez, Rafael Montes-Garrido, Marta Neila-Montero, Luis Anel-Lopez, Paulino de Paz, Luis Anel y Marta F. Riesco. (2022). Frequency of semen collection affects ram sperm cryoresistance. *Animals*, 12, 1492.

<https://doi.org/10.3390/ani12121492>

- Marta Neila-Montero, Marta F. Riesco, Rafael Montes-Garrido, Cristina Palacin-Martinez, Cesar Chamorro, Paulino de Paz, Mercedes Alvarez, Luis Anel y Luis Anel-Lopez. (2022). An optimized centrifugation protocol for ram sperm ensuring high sample yield, quality and fertility. *Theriogenology*, 191, pp. 179-191.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.08.006>

- Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, Marta F. Riesco, Rafael Montes-Garrido, Cristina Palacin-Martinez, Antonio Silva-Rodriguez, Francisco E. Martin-Cano, Fernando J. Peña, Paulino de Paz, Luis Anel y Luis Anel-Lopez. (2023). Ovine fertility by artificial insemination in the breeding season could be affected by intraseasonal variations in ram sperm proteomic profile. *Theriogenology*, 208, pp. 28-42.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.05.030>

- Aderson M. Viana Neto, Denise D. Guerreiro, Jorge A.M. Martins, Fábio R. Vasconcelos, Révila B.F. Melo, Ana Luiza M.C.S. Velho, Marta Neila-Montero, Rafael Montes-Garrido, Celso S. Nagano, Airton A. Araújo, Arlindo A. Moura. (2024). Sperm traits and seminal plasma proteome of locally adapted hairy rams subjected to intermittent scrotal insulation. *Animal Reproduction Science*, 263, 107439.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2024.107439>

- Cristina Palacin-Martinez, Luis Anel-Lopez, Mercedes Alvarez, Marta Neila-Montero, Rafael Montes-Garrido, Cristina Soriano-Úbeda, Paulino de Paz, Luis Anel y Marta F. Riesco. (2024). The characterization of CellROX™ probes could be a crucial factor in ram sperm quality assessment. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1342808.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1342808>



- Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, Marta F. Riesco, Cristina Soriano-Úbeda, Rafael Montes-Garrido, Cristina Palacin-Martinez, Paulino de Paz, Luis Anel y Luis Anel-Lopez. (2024). The adaptation time to the extender as a crucial step for an accurate evaluation of ram sperm quality during the liquid storage. *Veterinary Sciences*, 11, 132.

<https://doi.org/10.3390/vetsci11030132>



Además de los resultados expuestos en la presente memoria, la formación predoctoral ha sido complementada en esta temática por las siguientes comunicaciones a congresos:

23th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. San Petersburgo, Rusia. Septiembre de 2019.

Póster. *A preliminary study to calculate ram testicular volume using caliber and different formulas.* **Rafael Montes-Garrido**, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Juan Carlos Boixo, Cristina Ortega-Ferrusola, Cesar Chamorro, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

Póster. *Recovering sperm motility after thawing in Gaur (Bos gaurus) epididymal sperm.* Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, **Rafael Montes-Garrido**, Santiago Borragán, Patricia Manrique, Fernando J. Peña, Luis Anel, Paulino de Paz y Luis Anel-Lopez.

15^o Congreso Internacional de la Asociación Española de Reproducción Animal. Toledo, España. Noviembre de 2019.

Póster. *Relationship between the testicular volume and the Pulse Doppler of the testicular artery according to the rams age.* **Rafael Montes-Garrido**, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Juan Carlos Boixo, Cristina Ortega-Ferrusola, Cesar Chamorro, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

Póster. *Centrifugal forces effect in physiological status of ram sperm.* Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, **Rafael Montes-Garrido**, Juan Carlos Boixo, Fernando J. Peña, Luis Anel, Paulino de Paz y Luis Anel-Lopez.

24th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. Thessaloniki, Grecia. Octubre de 2021.

Póster. *Preliminary characterization of morphometry and Doppler parameters in the post-surgical monitoring of laparoscopic vasectomy in ram.* **Rafael Montes-Garrido**, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Juan Carlos Boixo, Cristina Ortega-Ferrusola, Cesar Chamorro, Marta F. Riesco, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.



Póster. *Establishment of innovative biomarkers to optimize cooling and cryopreservation protocols in ram sperm.* Marta F. Riesco, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Rafael Montes-Garrido, Mercedes Alvarez, Juan Carlos Boixo, Paulino de Paz, Luis Anel, Luis Anel-Lopez.

Póster. *Establishment of a fast-refrigeration protocol to improve pelletization degree avoiding damage induction in ram sperm centrifugation.* Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, Luis Anel-Lopez, Rafael Montes-Garrido, Juan Carlos Boixo, Paulino de Paz, Luis Anel y Marta F. Riesco.

19th International Congress on Animal Reproduction. Bolonia, Italia. Junio de 2022.

Póster. *Preliminary characterization of morphometry and Doppler parameters in the post-surgical monitoring of vasectomy in ram.* Rafael Montes-Garrido, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Juan Carlos Boixo, Cristina Ortega-Ferrusola, Cesar Chamorro, Marta F. Riesco, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

Póster. *High dilution rates modify the movement pattern of ram sperm.* Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, Rafael Montes-Garrido, Juan Carlos Boixo, Luis Anel, Paulino de Paz, Luis Anel-Lopez y Marta F. Riesco.

Póster. *The characterization of ROS localization could be a crucial factor in ram sperm quality determination.* Cristina Palacin-Martinez, Marta Neila-Montero, Rafael Montes-Garrido, Luis Anel-Lopez, Mercedes Alvarez, Juan Carlos Boixo, Luis Anel, Marta F. Riesco.

16º Congreso Internacional de la Asociación Española de Reproducción Animal. León, España. Octubre de 2022.

Póster. *Preliminary study of fetuses number diagnosis in Assaf ewes under field conditions.* Rafael Montes-Garrido, Luis Anel-Lopez, Marta F. Riesco, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Juan Carlos Boixo, María Giovanna González, Cristina Ortega-Ferrusola, Cesar Chamorro, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.



Póster. *Frequency of sperm collection could be a feasible strategy to improve ram sperm cryoresistance.* Cristina Palacin Martinez, Mercedes Alvarez, Rafael Montes Garrido, Marta Neila-Montero, Luis Anel-Lopez, Paulino de Paz, Luis Anel, Marta F. Riesco.

Póster. *Does double prostaglandin f2a injection improve the fertility of ewes artificially inseminated by laparoscopic route?* Mercedes Alvarez, Rafael Montes-Garrido, Marta F. Riesco, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Juan Carlos Boixo, César Chamorro, Paulino de Paz, Luis Anel y Luis Anel-Lopez.

Póster. *Does fixation influences ram sperm morphology evaluation results?* Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Ángela Fernandez-Gonzalez, Marta F. Riesco, Cristina Palacin-Martinez, Rafael Montes-Garrido, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

Póster. *Equilibration time of 24 hours not modify post-thawed apoptosis and mitochondrial activity of bull sperm.* Tomás Mantecon, Ana Sierra, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Rafael Montes-Garrido, Luis Anel-Lopez, Marta F. Riesco, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

Póster. *Sperm collection frequency modifies ram sperm morphology.* Marta Neila-Montero, Marta F. Riesco, Cristina Palacin-Martinez, Rafael Montes-Garrido, Paulino de Paz, Luis Anel, Mercedes Alvarez y Luis Anel-Lopez.

Póster. *Determination of reproductive status in brown bear (Ursus arctos) using vaginal cytology.* Victoria Zavala, Santiago Borragan, Patricia Manrique, Rafael Montes-Garrido, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Marta F. Riesco, Luis Anel y Mercedes Alvarez.



10th International Sheep Veterinary Congress. Sevilla, España. Marzo de 2023.

Comunicación oral. *Lambing-mating interval as a crucial factor to improve the fertility of meat sheep.* **Rafael Montes-Garrido**, Marta Neila-Montero, Luis Anel-Lopez, Marta F. Riesco, Cristina Palacin-Martinez, Juan Carlos Boixo, Cesar Chamorro, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

Artículo de divulgación. *Avances en la evaluación andrológica de los sementales ovinos.* *Tierras Ovino-Caprino.* 040, pp. 80-84. **Rafael Montes-Garrido**, Marta Neila-Montero, Luis Anel-Lopez, Cristina Palacin-Martinez, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

1st European Symposium on Animal Reproduction. Nantes, Francia. Septiembre de 2023.

Póster. *Preliminary study of breeding soundness evaluation in peripubertal ram lambs.* **Rafael Montes-Garrido**, Marta F. Riesco, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Juan Carlos Boixo, Cristina Ortega-Ferrusola, Cesar Chamorro, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

Póster. *Fluozin-3 as a new marker of sperm capacitation status in ram.* Cristina Palacin-Martinez, Mercedes Alvarez, Marta Neila-Montero, **Rafael Montes-Garrido**, Luis Anel-Lopez, Paulino de Paz, Luis Anel y Marta F. Riesco.

Póster. *Liquid preservation withstand of ram sperm varies within the breeding season.* Marta Neila-Montero, Marta F. Riesco, Mercedes Alvarez, **Rafael Montes-Garrido**, Cristina Palacin-Martinez, Paulino de Paz, Luis Anel y Luis Anel-Lopez.

I Jornada de Jóvenes Investigadores de la Asociación Española de Reproducción Animal. Toledo, España. Diciembre de 2023.

Comunicación oral. *Preliminary study on the prediction of testicular volume and sperm production of Assaf rams using Machine Learning.* **Rafael Montes-Garrido**, Pablo A.S. Fonseca, Marta F. Riesco, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Juan Carlos Boixo, Cristina Soriano-Úbeda, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.



Comunicación oral. *Is it possible to perform a delayed sperm quality analysis in brown bear (Ursus arctos) using fixable fluorescent dyes?* Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, Rafael Montes-Garrido, Cristina Palacin-Martinez, Santiago Borragan, Patricia Manrique, Cristina Soriano-Úbeda, Marta F. Riesco, Paulino de Paz, Luis Anel-Lopez y Luis Anel.

Comunicación oral. *Differences in testicular volume and sperm production between treated and untreated male brown bears (Ursus arctos) using Vacsincel® as immunocontraceptive.* Victoria Zavala, Santiago Borragan, Patricia Manrique, Rafael Montes-Garrido, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Cristina Soriano-Úbeda, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

Comunicación oral. *Protein transmembrane 95 as a novel biomarker of oocyte-sperm union in ram sperm.* Cristina Palacin-Martinez, Cristina Soriano-Úbeda, Rafael Montes-Garrido, Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, Luis Anel-Lopez, Paulino de Paz, Luis Anel y Marta F. Riesco.

28º Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Veterinaria. Cáceres, España. Febrero de 2024.

Póster. *Efecto del maropitant intravenoso sobre la presión arterial en galgos bajo anestesia general.* Uxue Callejas-Astiz, Rafael Montes-Garrido, Lorena Millán-Varela, José R. Altónaga y Marta Regueiro-Purriños.

Listado de abreviaturas



- AF: abstinencia de recogida seminal
- AI: inseminación artificial
- BCF: frecuencia de batido del flagelo espermático (Hz)
- BSE: evaluación de la aptitud para la reproducción
- D: profundidad del testículo, eje caudo-craneal
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DSO: producción espermática diaria
- eCG: gonadotropina coriónica equina
- EC1: número de píxeles negros
- EC2: número de píxeles blancos
- EC3: nivel medio de gris de los píxeles
- EDV: velocidad diastólica final (cm/s)
- FSH: hormona foliculoestimulante
- H: Altura del testículo, eje ventro-dorsal en équidos y cánidos (cm)
- IF: frecuencia intensiva de recogida seminal
- L: longitud del testículo, eje ventro-dorsal en rumiantes (cm)
- MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
- PI: índice de pulsatilidad
- PSV: velocidad sistólica máxima (cm/s)
- RAP PM: motilidad progresiva rápida (%)
- RI: índice de resistencia
- ROS: especies reactivas de oxígeno
- SF: frecuencia estándar de recogida seminal
- SMCs: células musculares lisas



SITRAN: Sistema Integral de Trazabilidad Animal

TABF: flujo sanguíneo arterial total (mL/min)

TABF rate: ratio de flujo sanguíneo arterial total (min^{-1})

TM: motilidad total (%)

TV: volumen testicular (cm^3)

VSL: velocidad según la trayectoria recta ($\mu\text{m}/\text{s}$)

W: anchura testicular, eje laterolateral (cm)

α SMA: α actina del músculo liso