



Semen quality in Katahdin sheep: effect of collection frequency and number of ejaculates in fresh and post-thawed semen †

[Calidad seminal en ovinos Katahdin: efecto de frecuencia de colecta y número de eyaculados en semen fresco y post-descongelado]

V.M. Meza-Villalvazo^{1*}, J. Abad-Zavaleta¹, E. R. Lliteras-Martínez²,
W. Hernández-Montiel³, A. I. Osorio-Terán³, A.J. Chay-Canul⁴
and A. Trejo-Cordova⁵

¹Universidad del Papaloapan, Instituto de Biotecnología, Campus Tuxtepec, Circuito central No 200, Ciudad Universitaria. Tuxtepec, C.P. 60301, Oaxaca, México.

Email: meza1077@hotmail.com*, joseabadz77@hotmail.com

²Universidad Autónoma de Baja California Sur, Km. 5.5 carretera al Sur, Colonia El Mezquitito. C.P. 23080. La Paz, Baja California Sur. México. Email:

lemiliarosa@gmail.com

³Universidad del Papaloapan, Instituto de Agroingeniería, Campus Loma Bonita, Av. Ferrocarril S/N, Ciudad Universitaria, Loma Bonita, C.P. 68400, Oaxaca, México. Email: wilbert.montiel51@hotmail.com, aosorio@unpa.edu.mx

⁴División Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carr. Villahermosa-Teapa, km 25, CP. 86280. Villahermosa, Tabasco, México. Email: aljuch@hotmail.com

⁵Departamento de Biología de la Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco, Núm. 186, Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa, CP. 09340. Ciudad de México, México. Email: atrejo109@hotmail.com

*Corresponding author

SUMMARY

Background: The fertility of the flock depends largely on the male, so the selection of studs with high genetic potential and good semen quality is essential. The frequency of collection directly influences sperm parameters such as volume, concentration, motility, and viability, with variations depending on species and breed. **Objective:** To evaluate the effects of the number and frequency of ejaculate collection on pre- and post-freezing semen characteristics in Katahdin sheep. **Methodology:** Fifteen one-year-old males were used, divided into three groups according to collection frequency: high (every 2 days), medium (every 4 days), and low (every 8 days). Semen parameters such as volume, motility, concentration, vitality, and DNA fragmentation were analyzed in both fresh and post-thaw semen. **Results:** Motility was significantly lower in the high frequency group ($67.4 \pm 6.5\%$) compared to the medium ($73.9 \pm 6.0\%$) and low ($72.3 \pm 8.7\%$) frequency groups ($p \leq 0.05$), with no differences between the latter two groups. Sperm concentration decreased in the high frequency group ($3001.66 \pm 709.7 * 10^6/\text{mL}$) compared to the medium ($4024.15 \pm 595.1 * 10^6/\text{mL}$) and low ($4035.44 \pm 420.7 * 10^6/\text{mL}$) frequency groups ($p \leq 0.05$). Vitality was lower in the high frequency ($72.6 \pm 6.5\%$) compared to the medium ($78.6 \pm 4.7\%$) and low ($78.3 \pm 5.9\%$) ($p \leq 0.05$). DNA fragmentation increased in the second ejaculate of the high frequency group ($16.3 \pm 4.2\%$) compared to the medium ($11.5 \pm 3.7\%$) and low ($10.4 \pm 2.8\%$) frequency groups ($p \leq 0.05$). After cryopreservation, motility of the second ejaculate was lower in the high frequency group ($39.2 \pm 6.3\%$) compared to the medium ($45.7 \pm 5.9\%$) and low ($46.3 \pm 5.2\%$) frequency groups ($p \leq 0.05$). **Implications:** High collection frequency reduces semen quality in Katahdin sheep, negatively affecting critical parameters such as motility, concentration, vitality, and DNA stability. Optimizing extraction

† Submitted March 12, 2025 – Accepted September 3, 2025. <http://doi.org/10.56369/tsaes.6238>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = V.M. Meza-Villalvazo: <https://orcid.org/0000-0002-9870-9442>; J. Abad-Zavaleta: <https://orcid.org/0000-0002-4130-8023>; E. R. Lliteras-Martínez: <https://orcid.org/0009-0008-6835-9024>; W. Hernández-Montiel: <https://orcid.org/0000-0001-6325-0873>; A. I. Osorio-Terán: <https://orcid.org/0000-0002-6192-6566>; A.J. Chay-Canul: <https://orcid.org/0000-0003-4412-4972>; A. Trejo-Cordova: <https://orcid.org/0000-0002-9646-0882>

frequency not only promotes semen preservation and reproductive program efficiency, but also contributes to animal welfare by avoiding excessive collections that compromise semen quality. **Conclusion:** Collection frequency and number of ejaculates significantly influence semen quality in Katahdin sheep. Too frequent collections decrease sperm motility, concentration, and vitality, in addition to increasing DNA fragmentation, especially in the second ejaculate. **Key words:** Seminal parameters; Katahdin sheep; DNA fragmentation; cryopreservation.

RESUMEN

Antecedentes: La fertilidad del rebaño depende en gran medida del macho, por lo que la selección de sementales con alto potencial genético y buena calidad seminal resulta fundamental. La frecuencia de colecta influye directamente en parámetros espermáticos como volumen, concentración, motilidad y viabilidad, con variaciones según especie y raza. **Objetivo:** Evaluar los efectos del número y la frecuencia de extracción de eyaculados sobre las características seminales pre y post congelación en ovinos de raza Katahdin. **Metodología:** Se emplearon 15 machos de un año, distribuidos en tres grupos de acuerdo con la frecuencia de colecta: alta (cada 2 días), media (cada 4 días) y baja (cada 8 días). Se analizaron parámetros seminales como volumen, motilidad, concentración, vitalidad y fragmentación del ADN, tanto en semen fresco como post-descongelación. **Resultados:** La motilidad fue significativamente menor en la frecuencia alta ($67.4 \pm 6.5\%$) respecto a la media ($73.9 \pm 6.0\%$) y baja ($72.3 \pm 8.7\%$) ($p \leq 0.05$), sin diferencias entre estas últimas. La concentración espermática disminuyó en la frecuencia alta ($3001.66 \pm 709.7 * 10^6/\text{mL}$) comparada con media ($4024.15 \pm 595.1 * 10^6/\text{mL}$) y baja ($4035.44 \pm 420.7 * 10^6/\text{mL}$) ($p \leq 0.05$). La vitalidad fue menor en la frecuencia alta ($72.6 \pm 6.5\%$) frente a la media ($78.6 \pm 4.7\%$) y baja ($78.3 \pm 5.9\%$) ($p \leq 0.05$). La fragmentación de ADN aumentó en el segundo eyaculado de la frecuencia alta ($16.3 \pm 4.2\%$) en comparación con media ($11.5 \pm 3.7\%$) y baja ($10.4 \pm 2.8\%$) ($p \leq 0.05$). Tras la criopreservación, la motilidad del segundo eyaculado fue menor en la frecuencia alta ($39.2 \pm 6.3\%$) respecto a media ($45.7 \pm 5.9\%$) y baja ($46.3 \pm 5.2\%$) ($p \leq 0.05$). **Implicaciones:** La alta frecuencia de colecta reduce la calidad seminal en ovinos Katahdin, afectando negativamente parámetros críticos como motilidad, concentración, vitalidad y estabilidad del ADN. La optimización de la frecuencia de extracción no solo favorece la conservación del semen y la eficiencia de los programas reproductivos, sino que también contribuye al bienestar animal al evitar colectas excesivas que comprometan la calidad seminal. **Conclusión:** La frecuencia de extracción y el número de eyaculados influyen de manera significativa en la calidad seminal de los ovinos Katahdin. Colectas demasiado frecuentes disminuyen motilidad, concentración y vitalidad espermática, además de incrementar la fragmentación del ADN, especialmente en el segundo eyaculado.

Palabras clave: Parámetros seminales; ovinos Katahdin; fragmentación de ADN; crioconservación.

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es una biotecnología ampliamente utilizada a nivel mundial para mejorar la eficiencia reproductiva en diversas especies de producción, incluyendo los ovinos (Thiangthientham *et al.*, 2020). La expansión de su uso en la producción ovina requiere la generación de conocimientos adaptados tanto a las razas implicadas como a los sistemas de producción de pequeños rumiantes (Souza-Fabjan *et al.*, 2023), dado que la fertilidad del rebaño depende en 50% del macho. Un solo eyaculado puede utilizarse para inseminar a múltiples ovejas, por lo que la selección de los reproductores es un requisito fundamental para garantizar buena productividad. El semental elegido debe poseer alto potencial genético, buena libido y producir semen de alta calidad en las colectas rutinarias (Schenk, 2018), ya que la producción espermática es un factor crítico que limita el uso prolongado de los sementales (Anel *et al.*, 2005). La frecuencia de colecta de semen es uno de los factores más relevantes que influyen en la calidad de las muestras, como se ha observado en diferentes especies: ovinos (Yotov *et al.*, 2011), bovinos (Rashid *et al.*, 2015), caprinos (Strzeżek *et al.*, 2000), dromedarios (Al-Bulushi *et al.*, 2018), caninos

(Salvado *et al.*, 2024) y pavos (Ezike *et al.*, 2021). En ovinos de la raza Ile de France, se ha reportado una correlación negativa entre volumen y concentración espermática, así como un aumento en la motilidad en el tercer eyaculado tras colectas consecutivas con intervalos de 30 minutos (Kistanova *et al.*, 2007). Asimismo, la composición del plasma seminal puede verse afectada por la frecuencia de las colectas (Kaya *et al.*, 2002), lo que influye en la calidad espermática durante la conservación (Ramírez-Vásquez *et al.*, 2019). En ovinos de lana, un aumento en la frecuencia de eyaculación ha mostrado reducir todas las variables seminales (Kaya *et al.*, 2002). En machos cabríos, las eyaculaciones repetidas provocan una disminución del volumen y la concentración espermática, además de un incremento en el número de espermatozoides anormales a medida que se incrementa la frecuencia de extracción (Oyeyemi *et al.*, 2000). Se ha observado que el volumen, la concentración y motilidad espermática, así como el porcentaje de espermatozoides vivos, son mayores cuando las colectas se realizan una vez por semana en comparación con aquellas realizadas cuatro veces por semana (Iheukwumere, 2008). Estos hallazgos destacan la necesidad de generar evidencia específica para razas como Katahdin, que han cobrado

protagonismo en los sistemas de producción de carne ovina, particularmente en regiones tropicales y subtropicales (Chay-Canul *et al.*, 2019). Determinar la frecuencia y el número óptimo de colectas no solo contribuye a preservar la calidad espermática, sino que también tiene implicaciones directas en el número de dosis viables, la eficiencia de los programas de IA y la rentabilidad de las unidades de producción. Por lo tanto, la evaluación de estos factores es crucial, ya que afectan directamente los parámetros seminales, los cuales determinan el número de dosis producidas, la calidad del semen para su crioconservación y su posterior uso. En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo evaluar los efectos del número y la frecuencia de extracción de eyaculados sobre las características seminales pre y post congelación en ovinos de la raza Katahdin

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la reproducción localizado en la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec, ubicada en el circuito Central No. 200, Col. Parque Industrial. Ubicada en la Región Cuenca del Papaloapan, en las coordenadas Latitud Norte 18°04'52" y, Latitud Oeste 96°07'07", a una altura de 20 metros sobre el nivel del mar (INEGI, 2015).

Animales

Se utilizaron 15 reproductores ovinos de la raza Katahdin, con un peso promedio de 90 ± 5.0 kg y una edad aproximada de 12 ± 0.3 meses. Los animales fueron distribuidos en tres tratamientos ($n=5$) según el intervalo de colecta: alta (cada 2 días), media (cada 4 días) y baja (cada 8 días). En cada una de las sesiones de colecta, se obtuvieron dos eyaculados consecutivos por animal, con el fin de evaluar los efectos del número de eyaculado (primero y segundo) en combinación con la frecuencia de extracción. Durante la fase experimental (120 días), permanecieron estabulados y fueron alimentados con dieta de mantenimiento basada en alimento comercial, forraje (*Digitaria decumbes*) y agua a *ad libitum*.

Colecta del eyaculado

Las muestras de semen fueron obtenidas mediante la técnica de vagina artificial, en un entorno controlado, limpio y libre de polvo. Como estímulo para la colecta, se utilizó una hembra previamente estrogenizada para inducir la respuesta del macho.

Evaluación de la calidad seminal

Se evaluaron los siguientes criterios macro y microscópicos:

Volumen, pH y color

El volumen de semen se midió directamente del tubo graduado utilizado en la colecta. El pH se determinó con tiras indicadoras de pH (papel de fenolftaleína) y el color del semen se evaluó por apariencia visual de acuerdo con los criterios descritos por Jha *et al.* (2013).

Motilidad

La motilidad masal se evaluó depositando 5 μ L de semen fresco sobre un portaobjetos, el cual se colocó en la platina térmica a 37 C. Posteriormente, cada muestra fue observada con el objetivo 20X en el sistema de análisis espermático computarizado (CASA) ISAS® v1 Proiser, observando cuatro campos para cada una de las muestras.

Concentración

La concentración espermática se determinó mediante una dilución 1:200 (semen:agua destilada) en microtubos de 1.0 mL, dejando reposar la mezcla durante 30 minutos. Posteriormente, se colocaron 18 μ L de la dilución en una cámara de Neubauer y se observaron cuatro campos por muestra con el objetivo 20X en el sistema de análisis espermático computarizado CASA ISAS® v1 (Proiser). La concentración fue expresada en millones de espermatozoides por mililitro ($\times 10^6$ espermatozoides/mL). Para cada muestra, se calculó el promedio de los cuatro campos observados y dicho valor fue utilizado para el análisis estadístico.

Vitalidad

La vitalidad espermática se evaluó mediante tinción con SYBR-14 y yoduro de propidio (PI), de acuerdo con la técnica descrita por Garner y Johnson (1995). Se diluyeron 10 μ L de semen en 100 μ L de solución salina tamponada con fosfatos (PBS), seguido de la adición de 1 μ L de SYBR-14. La mezcla se incubó a 37 °C durante 10 minutos en oscuridad. Posteriormente, se añadieron 2 μ L de PI, se homogenizó y se dejó actuar durante 3 minutos. Finalmente, la muestra se colocó en un portaobjetos con cubreobjetos y se analizó en modo fluorescencia utilizando filtros específicos en el sistema ISAS® v1. Los espermatozoides vivos se visualizaron en color verde y los muertos en rojo. La vitalidad se expresó como porcentaje (%) de espermatozoides vivos respecto al total de espermatozoides evaluados.

Fragmentación de ADN

El porcentaje de fragmentación del ADN espermático se determinó mediante una dilución 1:10 (semen:solución salina). Posteriormente, la muestra fue fijada y conservada en solución de Carnoy durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se permitió el secado al aire durante 10 minutos. Las muestras fueron entonces sumergidas durante 5 minutos en una solución de tinción compuesta por naranja de acridina (0.19 mg/mL), ácido cítrico (79 mM) y fosfato de sodio monohidratado (126 mM). Finalizada la tinción, las preparaciones se lavaron con agua destilada y se evaluaron de inmediato en el sistema CASA ISAS® v1 (Proiser), utilizando el módulo correspondiente para análisis de fragmentación. Los espermatozoides con ADN intacto se visualizaron en color verde, mientras que aquellos con fragmentación se observaron en rojo.

Dilución y criopreservación

El semen fue diluido en Triladyl® y envasado en pajillas de 0.5 mL con una concentración de 200×10^6 espermatozoides. Posteriormente, las pajillas fueron selladas con polivinilo y equilibradas a 5 °C durante 4 horas para permitir la adaptación al crioprotector. Transcurrido este tiempo, se colocaron horizontalmente sobre una rejilla dentro de una nevera de poliestireno, a 5 cm por encima del nivel del nitrógeno líquido, durante 10 minutos. Finalmente, las pajillas fueron sumergidas en nitrógeno líquido (-196 °C) para su almacenamiento. Las muestras fueron almacenadas durante un periodo aproximado de 120 días antes de su evaluación. Para la descongelación, las pajillas fueron extraídas del nitrógeno líquido y colocadas en un baño de agua a 37 °C durante 30 s. Posteriormente, el contenido fue recuperado para realizar los análisis post-descongelación.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante un diseño factorial 3×2 : frecuencia de extracción del semen (alta, media y baja) y número de eyaculados por sesión (primero y segundo), generando seis tratamientos experimentales. Para evaluar los efectos principales y su interacción sobre los parámetros seminales, se aplicó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), para tal efecto, las variables expresadas en porcentaje (motilidad, vitalidad y fragmentación de ADN) fueron transformadas mediante la función arcoseno de la raíz cuadrada, con el fin de cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, los cuales fueron verificados mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente ($p > 0.05$). Para las comparaciones múltiples se utilizó la prueba de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software SPSS versión 26 (IBM Corp., Armonk, NY, USA), y los resultados se presentan en su escala original (porcentaje)

RESULTADOS

El volumen, pH y color de los eyaculados se presenta en la Tabla 1. No se observaron diferencias significativas en el volumen entre frecuencias de extracción media y baja para el primer y segundo eyaculado. Sin embargo, El segundo eyaculado, en la frecuencia alta, presentó un volumen significativamente menor en comparación con el primero ($p \leq 0.05$). Los valores de pH se mantuvieron dentro del rango de 7.0 a 7.3, sin diferencias significativas entre el primer y segundo eyaculado, ni entre las frecuencias de extracción ($p \geq 0.05$). La alta frecuencia mostró diferencias significativas en el color del eyaculado entre el primer y segundo eyaculado (2.8 ± 0.73 vs. 2.4 ± 0.34 ; $p \leq 0.05$), indicando tonalidad menos concentrada en el segundo eyaculado. En las frecuencias media y baja, los valores oscilaron entre 3.8 y 4.0, correspondientes a tonalidades blanco-lechosas o cremosas, sin diferencias significativas entre eyaculados ($p \geq 0.05$).

Tabla 1. Análisis de parámetros macroscópicos asociados al número y frecuencia de eyaculados en ovinos Katahdin.

Parámetro	Frecuencia de extracción del eyaculado					
	Alta		Media		Baja	
	1er	2do	Número de eyaculado		1er	2do
Volumen (mL)	0.90 ± 0.48^{aA}	0.75 ± 0.25^{bA}	0.84 ± 0.35^{aA}	0.89 ± 0.31^{aA}	0.80 ± 0.32^{aA}	0.80 ± 0.28^{aA}
pH	7.3 ± 0.41^{aA}	7.2 ± 0.22^{aA}	7.1 ± 0.77^{aA}	7.3 ± 0.43^{aA}	7.1 ± 0.71^{aA}	7.0 ± 0.31^{aA}
Color	2.8 ± 0.73^{aB}	2.5 ± 0.34^{aB}	3.9 ± 0.98^{aA}	3.8 ± 0.58^{aA}	4.0 ± 0.04^{aA}	3.9 ± 0.65^{aA}

^{a,b}: indican diferencia significativa entre número de eyaculados ($p \leq 0.05$).

^{A,B}: indica diferencia significativa entre las frecuencias de extracción ($p \leq 0.05$).

Color: 1 = acuoso, 2 = blanco, 3 = blanco lechoso, 4 = blanco cremoso; 0 indica color anormal (presencia de sangre).

±: valores expresados como media ± desviación estándar (DE).

El análisis de la calidad espermática en ovinos Katahdin (Tabla 2) muestra que la frecuencia de extracción del eyaculado y el número de eyaculados afectan significativamente los parámetros seminales. La motilidad disminuye en el segundo eyaculado en todas las frecuencias, siendo más pronunciada en la alta frecuencia ($p \leq 0.05$). La concentración espermática es mayor en la frecuencia baja y menor en la alta, con reducción significativa en el segundo eyaculado, lo que sugiere agotamiento de espermatozoides con la extracción frecuente ($p \leq 0.05$). La vitalidad espermática se mantiene similar en las frecuencias media y baja, pero disminuye significativamente en la alta frecuencia ($p \leq 0.05$), lo que indica mayor deterioro celular. La fragmentación del ADN es más alta en la frecuencia alta, tanto en el primer como en el segundo eyaculado, y menor en la baja frecuencia, con diferencias significativas entre las frecuencias de extracción ($p \leq 0.05$).

El análisis de la calidad espermática post-descongelación en ovinos Katahdin (Tabla 3) muestra que la frecuencia de extracción y el número de eyaculados afectan significativamente la motilidad y vitalidad espermática ($p \leq 0.05$), pero no la fragmentación del ADN. En la frecuencia de extracción alta, el segundo eyaculado presentó reducción significativa en motilidad y vitalidad ($p \leq 0.05$), evidenciando deterioro en la calidad

espermática. En contraste, en la frecuencia de extracción media y baja, la motilidad y vitalidad se mantuvieron estables entre el primer y segundo eyaculado ($p \geq 0.05$). La fragmentación del ADN espermático no mostró variaciones significativas entre los tratamientos, con valores entre 28.7% y 33.7% ($p \geq 0.05$).

DISCUSIÓN

El volumen del eyaculado es parámetro clave en la evaluación de la calidad seminal y el rendimiento reproductivo de los machos (Ax *et al.*, 2000). En el presente estudio, los valores registrados oscilaron entre 0.75 y 0.90 mL, independientemente del número de eyaculados, ubicándose dentro del rango reportado en diferentes razas ovinas (0.45 a 0.94 mL) (Pankaj *et al.*, 2018). El volumen promedio fue de 0.80 mL, concordando con los hallazgos de Sharmin *et al.* (2021) en ovinos con edades entre 291 días y 350 días. Sin embargo, estos valores difieren de los reportados por Cárdenas-Gallegos *et al.* (2012) (0.60 mL), Chacón *et al.* (2019) (0.70 mL) y Carrascal-Triana *et al.* (2023) (0.45 mL) en ovinos de la raza Katahdin, este comportamiento puede atribuirse al desarrollo progresivo de los testículos y las glándulas accesorias, así como a la activación y estabilización del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Durante las etapas iniciales de desarrollo (<1 año), los animales presentan

Tabla 2. Efecto de la frecuencia de extracción y el número de eyaculados sobre parámetros de calidad espermática en ovinos Katahdin.

Parámetro	Frecuencia de extracción del eyaculado					
	Alta		Media		Baja	
	Número de eyaculado					
	1er	2do	1er	2do	1er	2do
Motilidad (%)	76.7 ± 5.7 ^{aA}	67.4 ± 6.5 ^{bB}	79.3 ± 7.4 ^{aA}	73.9 ± 6.0 ^{aA}	75.8 ± 7.7 ^{aA}	72.3 ± 8.7 ^{aA}
CE (x10 ⁶ / mL)	3523 ± 428 ^{aB}	3001 ± 709 ^{bC}	3829 ± 364 ^{aB}	3700 ± 697 ^{aB}	4265.86 ± 484 ^{aA}	4024 ± 595 ^{aB}
Vitalidad (%)	73.0 ± 6.1 ^{aA}	66.7 ± 5.9 ^{bB}	77.3 ± 4.0 ^{aA}	76.1 ± 4.9 ^{aA}	78.8 ± 3.4 ^{aA}	77.8 ± 6.4 ^{aA}
F-ADN (%)	15.3 ± 4.2 ^{aA}	17.6 ± 3.3 ^{bA}	11.8 ± 2.8 ^{aB}	12.9 ± 3.1 ^{aB}	10.2 ± 3.2 ^{aB}	10.9 ± 1.4 ^{aB}

^{a,b}: indican diferencia significativa entre número de eyaculados ($p \leq 0.05$).

^{A,B}: indica diferencia significativa entre las frecuencias de extracción ($p \leq 0.05$).

CE: Concentración espermática, F-AND: Fragmentación de ADN.

±: valores expresados como media ± desviación estándar (DE).

Tabla 3. Efecto de la frecuencia de extracción y el número de eyaculados sobre parámetros de calidad espermática en ovinos Katahdin post descongelación.

Parámetro	Frecuencia de extracción del eyaculado					
	Alta		Media		Baja	
	Número de eyaculado					
	1er	2do	1er	2do	1er	2do
Motilidad (%)	46.3 ± 5.2 ^{aA}	39.2 ± 6.3 ^{bB}	51.2 ± 6.5 ^{aA}	50.5 ± 4.3 ^{aA}	52.8 ± 6.6 ^{aA}	49.3 ± 4.8 ^{aA}
Vitalidad (%)	48.0 ± 6.1 ^{aA}	35.6 ± 7.7 ^{bB}	52.2 ± 5.1 ^{aA}	50.1 ± 5.3 ^{aA}	49.9 ± 5.3 ^{aA}	52.8 ± 4.7 ^{aA}
F-ADN (%)	31.5 ± 3.3 ^{aA}	33.7 ± 4.2 ^{aA}	29.8 ± 4.7 ^{aA}	28.7 ± 6.3 ^{aA}	30.0 ± 4.1 ^{aA}	31.9 ± 5.6 ^{aA}

^{a,b}: indican diferencia significativa entre número de eyaculados ($p \leq 0.05$).

^{A,B}: indica diferencia significativa entre las frecuencias de extracción ($p \leq 0.05$).

F-AND: Fragmentación de ADN.

±: valores expresados como media ± desviación estándar (DE).

desarrollo incompleto del tejido testicular, limitando la producción seminal y la calidad espermática (Murphy *et al.*, 2018). En cuanto al volumen seminal relacionado con el número de eyaculados y la frecuencia de extracción, se observaron diferencias significativas únicamente en la frecuencia alta. Estos resultados concuerdan con los reportados por Rashid *et al.* (2015), quienes evidenciaron que, en toros sometidos a extracciones de alta (4 eyaculados semanales) y baja frecuencia (2 eyaculados semanales), el volumen del primer eyaculado fue significativamente mayor que el del segundo (3.18 mL, 2.81 mL, respectivamente) en regímenes de alta frecuencia. Asimismo, en ovinos sometidos a tres eyaculaciones consecutivas con intervalos de 20 min, bajo regímenes de alta (cada 3 días) y baja frecuencia (cada 8 días), el volumen del eyaculado disminuyó significativamente con el número de eyaculados por sesión, lo que sugiere mayor agotamiento de las reservas seminales en condiciones de extracción alta (Ben-Moula *et al.*, 2022). Por lo tanto, la alta frecuencia de extracción reduce el tiempo de recuperación de las reservas seminales en el epidídimo y las glándulas accesorias, lo que provoca disminución en el volumen del eyaculado en colectas consecutivas. Por el contrario, la baja frecuencia permite mayor acumulación de fluidos seminales y espermatozoides, favoreciendo mayor volumen por eyaculado (Taaffe *et al.*, 2022).

El pH como indicador de la acidez o alcalinidad del espermatozoide, es rasgo importante en el análisis de la calidad del semen en los mamíferos, es factor crítico que influye directamente en la motilidad espermática. Rango de pH 6.0 - 6.5 es óptimo para mantener la motilidad y prolongar la viabilidad de los espermatozoides, ya que favorece la eficiencia metabólica y la producción de energía mediante la respiración mitocondrial. Fuera de este rango, tanto en condiciones ácidas como alcalinas la motilidad disminuye significativamente, afectando la capacidad de fertilización (Bortolov *et al.* 1980). Los valores medios de pH obtenidos en el presente estudio, no presentan diferencias significativas entre el número y frecuencia de los eyaculados manteniendo nivel constante de 7.1, valores que se encuentran dentro del intervalo (5.6-7.0) reportado para algunas razas de ovinos (Oloye *et al.*, 2021; Pascal *et al.*, 2023), estos valores pueden ser debido al efecto de la época del año en la cual se realizan las colectas (primavera-verano), ya que se ha demostrado que la temperatura ambiental tiene correlación positiva ($r=0.73 - 0.83$) con el pH del semen, lo que indica que la temperatura ambiental influye de manera directa sobre este parámetro, probablemente debido a que la temperatura puede modificar la actividad metabólica de los espermatozoides y las secreciones de las glándulas accesorias, impactando la producción de compuestos

que regulan el pH, alterando su capacidad buffer y por ende el pH (Zeidan, 1989).

El color del semen es indicador visual que puede proporcionar información preliminar sobre la calidad seminal y la fertilidad en animales reproductores. Aunque es parámetro subjetivo, su observación junto con análisis más detallados puede ayudar a identificar problemas o validar la calidad espermática. En este estudio, el semen presentó una coloración que varió de blanco a blanco lechoso, tonalidades consideradas normales. de acuerdo con lo reportado por Evans y Maxwell, (1987) y coincidiendo con lo reportado por diversos autores en ovinos (Azizunnesa *et al.*, 2013; Pankaj *et al.*, 2018). Sin embargo, la frecuencia de extracción intensiva tiende a aclarar el color del semen debido a la mayor proporción de plasma seminal.

La alta frecuencia de extracción reduce la motilidad, concentración y vitalidad espermática, además de aumentar el daño en el ADN, mientras que una baja frecuencia de extracción preserva mejor la calidad seminal. La disminución de la concentración espermática en el segundo eyaculado, particularmente en la alta frecuencia, se puede atribuir a la rápida depleción de los espermatozoides almacenados en la cola del epidídimo (Preston *et al.*, 2001), ya que, la espermatogénesis en ovinos dura aproximadamente 49 días, seguida de un período de maduración epididimaria de 10 días a 14 días, lo que implica que la extracción frecuente reduce la disponibilidad de espermatozoides maduros en los conductos reproductivos (Yang *et al.*, 2020). En toros Brahman, se ha reportado que mayor número de eyaculaciones semanales reduce la concentración espermática debido a la menor acumulación de espermatozoides en el epidídimo (Rashid *et al.* 2015). En cabras, Omasanya *et al.* (2021) evidenciaron que la concentración espermática disminuye con la frecuencia de eyaculación debido a la menor cantidad de espermatozoides disponibles en la reserva testicular y epididimaria. Asimismo, Ben Moula *et al.* (2022) reportaron que la extracción frecuente reduce la concentración espermática en ovinos, afectando la eficiencia reproductiva.

La reducción de la motilidad en el segundo eyaculado en la frecuencia de extracción alta puede estar relacionada con menor disponibilidad de ATP necesario para la activación del flagelo (Yu *et al.*, 2024), la motilidad espermática depende del metabolismo mitocondrial y del consumo de sustratos energéticos como fructosa y piruvato, los cuales pueden agotarse en condiciones de alta frecuencia de extracción (Foutouhi *et al.*, 2022). Se ha reportado que, en toros japoneses, el segundo eyaculado tiene menor proporción de espermatozoides de alta motilidad, debido a la disminución de reservas energéticas y a

cambios en la estructura mitocondrial (Kanno *et al.*, 2017); además, que la concentración de proteínas y lípidos en el plasma seminal es crucial para mantener la funcionalidad mitocondrial y que una mayor frecuencia de extracción reduce la disponibilidad de estos componentes, afectando negativamente la motilidad (Ben- Moula *et al.*, 2022). Por su parte Strzeiek *et al.* (1995) evidenciaron que mayor frecuencia de extracción en verracos disminuye la actividad mitocondrial, reduciendo la capacidad de desplazamiento de los espermatozoides.

La vitalidad espermática se mantuvo relativamente estable en frecuencia media y baja, pero disminuyó significativamente en la alta frecuencia, lo que puede explicarse por aumento en el estrés oxidativo. Los espermatozoides tienen limitada capacidad antioxidante, lo que los hace particularmente vulnerables a la peroxidación lipídica inducida por especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas en el epidídimo y el plasma seminal (Bollwein *et al.*, 2018). En perros se ha observado que la extracción frecuente de semen genera aumento en la producción de ROS, reduciendo la viabilidad espermática (Salvado *et al.*, 2024). Omasanya *et al.* (2021) también observaron que la vitalidad espermática disminuye con mayor frecuencia de extracción, lo que se asocia con la acumulación de peroxidación lipídica en la membrana espermática. Strzeiek *et al.* (1995) encontraron que mayor frecuencia de eyaculación está correlacionada con aumento en la peroxidación lipídica de la membrana espermática en verracos, comprometiendo la integridad celular.

La mayor fragmentación del ADN en el sistema intensivo puede explicarse por proceso de apoptosis acelerado y menor protección antioxidante en el plasma seminal, durante la espermatogénesis, los espermatozoides reemplazan sus histonas nucleares por protaminas, lo que confiere estabilidad a la cromatina. Sin embargo, este proceso puede verse afectado por alta tasa de espermiación inducida por la extracción frecuente (Mikhail *et al.*, 2018). Los espermatozoides con mayor fragmentación del ADN tienen menor motilidad y tasa de fecundación en ovinos (Shamiah *et al.*, 2017), se ha reportado que alta frecuencia de extracción en verracos aumenta la susceptibilidad del ADN espermático al daño oxidativo, lo que sugiere relación directa entre la tasa de eyaculación y la estabilidad cromatínica (Strzeiek *et al.*, 1995). Estos resultados coinciden con lo reportado por Folkova *et al.* (2016), quienes evaluaron la calidad del semen fresco y post-descongelado en perros, en relación con dos extracciones en 24 h, demostrando que la motilidad y viabilidad eran menores en el segundo eyaculado, lo que sugiere disminución en la calidad espermática cuando la frecuencia de extracción es elevada.

En cuanto a la fragmentación del ADN, el presente estudio presenta valores entre 28.7% y 33.7%, sin diferencias significativas entre los tratamientos. Esto concuerda con lo reportado por Ribas-Maynou *et al.* (2024) en bovinos, donde la criopreservación generó aumento significativo en las rupturas de cadena sencilla del ADN espermático (de 10.99% a 34.11%, $p < 0.0001$), mientras que las rupturas de doble cadena no variaron significativamente. Esto sugiere que el daño se localiza en regiones de cromatina compactada con protaminas, afectando la funcionalidad espermática. Sin embargo, En un estudio realizado en bovinos por Prabowo *et al.* (2023) reportaron valores más bajos de fragmentación de ADN (1.67%-1.72%), lo que podría deberse a diferencias en especies y protocolos de criopreservación. El daño al ADN espermático durante la congelación está relacionado con cambios epigenéticos y proteómicos, lo que podría tener efectos transgeneracionales en la descendencia (Shahverdi *et al.*, 2018). Los daños observados en la motilidad y vitalidad espermática pueden estar relacionados con el estrés oxidativo inducido por la criopreservación. Ozimic *et al.* (2023) destacaron que el principal problema durante la criopreservación es la formación de cristales de hielo intracelulares y el daño oxidativo, lo que afecta la integridad de membranas y ADN. Estos resultados coinciden con los reportados en este estudio, donde la motilidad y vitalidad espermática fueron significativamente menores en el segundo eyaculado del régimen de alta frecuencia, probablemente debido a mayor estrés celular.

El impacto de la frecuencia de extracción en la calidad espermática también ha sido evaluado en otras especies. Lechner *et al.* (2021) analizaron la combinación de dos eyaculados en caninos recolectados con un intervalo de una hora, encontrando que no hubo efectos negativos en la motilidad y viabilidad espermática post-descongelación. Sin embargo, en nuestro estudio en ovinos, el segundo eyaculado mostró una reducción significativa en estos parámetros en el régimen de alta frecuencia, lo que sugiere que la respuesta espermática a la frecuencia de extracción varía entre especies. Asimismo, Chungron *et al.* (2019) indicaron que la criotolerancia del esperma en pequeños rumiantes varía según la composición lipídica de la membrana espermática, lo que podría explicar por qué ciertas técnicas de criopreservación no son igualmente efectivas en todas las especies. Estos resultados respaldan esta idea, ya que la fragmentación del ADN no se vio afectada significativamente, pero si la motilidad y vitalidad.

CONCLUSIONES

La frecuencia de extracción y el número de eyaculados influyen significativamente en la calidad seminal de los ovinos Katahdin. La alta frecuencia de extracción

reduce la motilidad, concentración y vitalidad espermática, además de aumentar la fragmentación del ADN, especialmente en el segundo eyaculado. En contraste, las frecuencia media y baja preservan mejor la calidad espermática, manteniendo mayores valores de motilidad y concentración. Estos resultados subrayan la importancia de establecer protocolos de recolección adecuados para optimizar la calidad del semen y su aplicación en biotecnologías reproductivas.

Funding. This research was conducted with institutional support from the University of Papaloapan. No external funding was received for the development of this study.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest in the execution of this research work

Compliance with ethical standards: The experimental protocol was approved by the Bioethics Committee of the University of Papaloapan (UNPA/CBE/026). All animals were treated humanely and respectfully, minimizing suffering and ensuring their welfare during the study.

Data availability: The set of all data obtained and analyzed during this study are available to the author upon reasonable request

Author contribution statement (CRediT). V.M. Meza-Villalvazo – Conceptualization, Methodology, Writing – review & editing. J. Abad-Zavaleta – Conceptualization, Data curation, Methodology, Writing – review & editing. E.R. Lliteras-Martínez – Conceptualización, Methodology. W. Hernández-Montiel – Conceptualization, Writing – review & editing. A.I. Osorio-Terán – Conceptualization, Writing – review & editing. A.J Chay-Canul- Data curation, Formal analysis, Validation. A. Trejo-Cordova – Conceptualization, Investigation, Methodology.

REFERENCES

- Al-Bulushi, S., Manjunatha, B.M., Bathgate, R., Rickard, J.P. and de Graaf, S.P., 2018. Effect of semen collection frequency on the semen characteristics of dromedary camels. *Animal Reproduction Science*, 197, pp. 145-153. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.022>
- Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Fuente, L.F. and de la 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. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.001>
- Ax, R.L., Dally, M.R., Didon, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C. and Varner, D.D., 2000. Artificial Insemination. In: Hafez B, Hafez ESE. *Reproduction in farm animals*. 7th ed. Philadelphia: Lea and Febinger. pp. 376-89.
- Azizunnesa., Begum, F.Z., Bari, F.Y. and Alam, G.S., 2013. Effects of concentrate supplementation on reproductive performances and semen quality of indigenous rams in Bangladesh. *Journal of Embryo Transfer*, 28(4), pp. 325-3. <https://doi.org/10.12750/jet.2013.28.4.325>
- Bartoov, B., Bar-Sagie, D. and Avraham, M., 1980. The effect of pH on ram sperm collective motility driven by mitochondrial respiration. *Andrology*, 3(1-6), pp. 602–612. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1980.tb00148.x>
- Ben Moula, A., Badi, A., Hamidallah, N., Allai, L., Khalil, K., Fadili, M., Moussafi, Z. and Amiri, B., 2022. Effect of ejaculation frequency on ram semen characteristics, seminal plasma composition and chilled sperm quality. *Journal of Central European Agriculture*, 23(4), pp. 722–731. <https://doi.org/10.5513/jcea01/23.4.3592>
- Bollwein, H. and Bittner, L., 2018. Impacts of oxidative stress on bovine sperm function and subsequent in vitro embryo development. *Animal Reproduction*. 15(1), pp. 703–710. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-ar2018-0041>.
- Cárdenas-Gallegos, M., Aké-López, J., Centurión-Castro, F., Magaña-Monforte, J., 2012. The breed and season effects on scrotal circumference and semen characteristics of hair sheep rams under tropical conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(6), pp. e92. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02001.x>
- Carrascal-Triana, E.L., Moya Romero, D.C., Herrera Pérez, N., and Cañas Alvarez, J.J., 2022. Características seminales de ovinos bajo condiciones ambientales del Caribe Colombiano. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 33(4), pp. e21611. <https://doi.org/10.15381/rivep.v33i4.21611>
- Chacón, J.L., Lozano, M.H., Orozco, C.J., Ardila,

- S.A., 2019. Características de la pubertad en corderos de pelo y sus cruces en Colombia en condiciones de baja altitud. *Revista MVZ Córdoba*, 24(1), pp. 7097-7107. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1413ORIGIN AL>
- Chay-Canul, A.J., García-Herrera, R.A., Magaña-Monforte, J.G., Macías-Cruz, U. and Luna-Palomera, C., 2019. Productividad de ovejas Pelibuey y Katahdin en el trópico húmedo. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 6(16), pp. 159–165. <https://doi.org/10.19136/era.a6n16.1872>
- Chunrong, L.V., Wu, G., Hong, Q. and Quan, G., 2019. Spermatozoa cryopreservation: State of art and future in small ruminants. *Biopreservation and Biobanking*, 17(2), pp. 171–182. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0113>
- Evans, G. and Maxwell, W.M.C., 1987. *Collection of semen; handling and examination of semen; dilution of semen; frozen storage of semen; insemination*. In: Salmon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths, Sydney. pp. 85-166.
- Ezike, J.C., Ezea, J., Machebe, S.N. and Onyimonyi, A.E., 2021. Impact of different rearing systems and frequency of semen collection on semen characteristics of Turkeys. *Nigerian Journal of Animal Science*, 23(3), pp. 46-52.
- Folková, P., Šichtař, J., Šimoník, O., Dokoupilová, A. and Rajmon, R., 2016. Changes in Quality of Native and Frozenthawed Semen in Relation to Two Collections Performed in a 24-hour Interval and Adition of Clarified Egg Yolk to Extender. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 47(2), pp. 60–67. <https://doi.org/10.1515/sab-2016-0010>
- Foutouhi, A. and Meyers, S., 2022. Comparative oxidative metabolism in mammalian sperm. *Animal Reproduction Science*, 247, pp. 107095–107095. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107095>
- Garner, D.L. and Johnson, L.A., 1995. Evaluation of mammalian sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction*, 53(2), pp. 276–284. <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.2.276>
- Hezavehei, M., Sharafi M., Kouchesfahani, H.M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmacili, V. and Shahverdi, A., 2018. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
- Iheukwumere, F., 2008. Effect of different intesties of semen collection and biochemical evaluation of the seminal plasma of West African Dwarf bucks. *Journal of Agriculture and Social Research*, 8(1), pp. 33-44. <https://doi.org/10.4314/jasr.v8i1.2883>
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2015. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras> (consultado el 26 de junio de 2025)
- Jha, P.K., Paul, A.K., Rahman, M.B., Tanjim, M., Bari, F.Y. and Alam, M.G.S., 2013. Improvement of preservation quality of chilled bull semen using α -tocopherol as an antioxidant. *Journal Embryo Transfer*, 28(1), pp. 31-9. <https://doi.org/10.12750/jet.2013.28.1.31>
- Kanno, C., Sakamoto, K.Q., Yanagawa, Y., Takahashi, Y., Katagiri, S. and Nagano, M., 2017. Comparison of sperm subpopulation structures in first and second ejaculated semen from Japanese black bulls by a cluster analysis of sperm motility evaluated by a CASA system. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(8), pp. 1359–1365. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0012>
- 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, pp. 153-158. [https://doi.org/10.1016/s0921-4488\(02\)00051-2](https://doi.org/10.1016/s0921-4488(02)00051-2)
- Kistanova, E., Vasileva, D., Grigorov, B. and Metodiev, N., 2007. The morphological and biochemical characteristics of the consecutive ejaculates from Il-de-France rams at various ages. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 23, pp. 301-310. <https://doi.org/10.2298/bah0701301k>
- Lechner, D., Aurich, J., Schäfer-Somi, S., Herbel, J. and Aurich, C., 2021. Combined cryopreservation of canine ejaculates collected at a one-hour interval increases

- semen doses for artificial insemination without negative effects on post-thaw sperm characteristics. *Reproduction in Domestic Animals*, 56, pp. 1220–1226. <https://doi.org/10.1111/rda.13980>
- Mikhail, B., Kuzmin, A.V., Alexandrova, A.A., Chistyakov, V.A., Dobaeva, N.M. and Kundupyan, O.L., 2018. Role of the reactive oxygen species induced DNA damage in human spermatozoa dysfunction. *AME Medical Journal*, 3, pp. 1-12. <https://doi.org/10.21037/amj.2018.01.06>
- Murphy, E.M., Kelly, A.K., O'Meara, C., Eivers, B., Lonergan, P. and Fair, S., 2018. Influence of bull age, ejaculate number, and season of collection on semen production and sperm motility parameters in Holstein Friesian bulls in a commercial artificial insemination centre. *Journal of Animal Science*, 96, pp. 2408–2418. <https://doi.org/10.1093/jas/sky130>
- Oloye, A.A., Fakile, A.A., Olurode, S.A., Mustapha, L., Bassahwa, A.P. and Adetomiwa, A.S., 2022. Assessment of mango and carrot juices as West African Dwarf ram semen extender at room temperature. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 19(4), pp. 183–191. <https://doi.org/10.4314/sokjvs.v19i4.5>
- Omasanya, O.K., Hassan, J.O., Oloye, A.A., Oyewusi, I.K., Oni, O.O., Olurode, S.A., Oloruntuga, O.O., Adeusi, A.A., Bassahwa, A.P., Adetomiwa, A.S. and Mustapha, L., 2021. Effects of ejaculation frequency on semen characteristics and serum testosterone concentration in Red Sokoto bucks. *Nigerian Journal of Animal Production*, 48(6), pp. 34 – 45. <https://doi.org/10.51791/njap.v48i6.3275>
- Oyeyemi, M.O., Akusu, M.O. and Ola-Davies, O.E., 2000. Effect of successive ejaculations on the spermogram of West African dwarf goats (*Capra hircus L.*). *Veterinarski Arhiv*, 70(4), pp. 215-221. <https://hrcak.srce.hr/file/148235>
- Ozimic, S., Ban, F.H. and Martin, S. (2023). Sperm cryopreservation today: approaches, efficiency, and pitfalls. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(6), pp. 4716–4734. <https://doi.org/10.3390/cimb45060300>
- Pankaj, K.J., Golam, S.A., Abdullah, A.M., Taohidul, I. and Farida, Y.B., 2018. Selection of breeding rams by evaluating semen quality. *Journal of Applied Animal Science*, 11(1), pp. 9-20. <https://www.thaiscience.info/Journals/Article/JAAS/10989105.pdf>
- Pascal, C., Ionică, N., Marian, A.F., Pânzaru, C., Simeanu, D. and Mierliță, D., 2023. Diet Influence on sperm quality, fertility, and reproductive behavior in Karakul of Botoșani rams. *Agriculture*, 13(11), pp. 2168–2168. <https://doi.org/10.3390/agriculture13112168>
- Prabowo, T.A., Sigit, B., Lies, M.Y., Pradita, I.S. and Diah, T.W., 2023. Evaluation Deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation of local Indonesian cattle frozen sperm using Halomax method. *Biodiversitas*, 24 (4), pp. 2225-2230. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240435>
- Preston, B.T., Stevenson, I.R., Pemberton, J.M. and Wilson, K., 2001. Dominant rams lose out by sperm depletion. *Nature*, 409(6821), pp. 681–682. <https://doi.org/10.1038/35055617>
- Ramírez-Vasquez, R., Cesari, A., Greco, M.B., Cano, A. and Hozbor, F., 2019. Extenders modify the seminal plasma ability to minimize freeze-thaw damage on ram sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(12), pp. 1621–1629. <https://doi.org/10.1111/rda.13571>
- Rashid, M., Hoque, A., Huque, K.S. and Bhuiyan, A.K., 2015. Effect of Semen Collection Frequency and Scrotal Circumference on Semen Quality Parameters in Brahman x Local Crossbred Bulls. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 3(12), pp. 677–684. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.12.677.684>
- Ribas-Maynou, J., Muiño, R., Tamargo, C. and Yeste, M., 2024. Cryopreservation of bovine sperm causes single-strand DNA breaks that are localized in the toroidal regions of chromatin. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 15(1), pp.140. <https://doi.org/10.1186/s40104-024-01099-0>
- Salvado, J., Catilina, D., Borges, P., Simoes, J. and Martins-Bessa, A., 2024. Influence of two collection frequency intervals on sperm quality of standard and miniature bull Terriers during short breeding periods: A clinical field study. *Veterinary World*, 17(4), pp. 820–828. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2024.820-828>

- Schenk, J.L., 2018. Principles of maximizing bull semen production at genetic centers. *Animal*, 12(S1), pp. 142–147. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000472>
- Shamiah, S.H.M., Al – Maghraby, M.M., Deghedy, A.M. and El-Badaw, A.A., 2017. Relationship of Sperm Characteristics, in Reference with DNA Fragmentation, with Fertility of Some Sheep Breeds in Egypt. *Egyptian Journal of Sheep & Goat Sciences*. 12 (1), pp. 39-47.
- Sharmin, S., Islam, M., Saha, A., Akter, S., Juyena, N. and Bari, F., 2022. Quality of ram semen in relation to scrotal size. *Bangladesh Veterinarian*, 38(1-2), pp. 1–9. <https://doi.org/10.3329/bvet.v38i1-2.63671>
- Souza-Fabjan, J.M.G., Oliveira, M.E.F., Guimarães, M.P.P., Brandão, F.Z., Bartlewski, P.M. and Fonseca, J.F., 2023. Review: Non-surgical artificial insemination and embryo recovery as safe tools for genetic preservation in small ruminants. *Animal*, 17, pp.100787. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100787>
- Strzeiek, J., Kordan, W., Glogowski, J., Wysocki, P. and Borkowski, K., 1995. Influence of semen-collection frequency on sperm quality in boars, with special reference to biochemical markers. *Reproduction in Domestic Animals*, 30, pp. 85-94. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1995.tb00609.x>
- Strzezek, F.L., Demianowicz, W., Kordan, W., Wysocki, P. and Hołody, D., 2000. Effect of depletion tests (DT) on the composition of boar semen. *Theriogenology*, 54(6), pp. 949–963. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00404-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00404-0)
- Taaffe, P., O’Meara, C.M., Stivnicka, M., Byrne, C.J., Eivers, B., Lonergan, P. and Fair, S., 2022. Increasing the frequency of ejaculate collection in young dairy bulls increases semen production and field fertility. *Theriogenology*, 182, pp. 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.01.030>
- Thiangthientham, P., Suwimonteerabutr, J., Tharasanit, T. and Techakumphu, M. 2020. The optimal divalent cations and storage temperatures for the encapsulation of ram spermatozoa. *The Thai Journal Veterinary Medicine* 50, pp. 89-96. <https://doi.org/10.56808/2985-1130.3079>
- Yang, H., Ma, J., Wan, Z., Wang, Q., Wang, Z., Zhao, J., Wan, F. and Zhan, Y., 2020. Characterization of sheep spermatogenesis through single-cell RNA sequencing. *The FASEB Journal*, 35(2), pp.e21187 <https://doi.org/10.1096/fj.202001035rrr>
- Yotov, S.T., Fasulkov, I., Vassilev, N., 2011. Effect of ejaculation frequency on spermatozoa survival in diluted semen from pleven blackhead rams. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 35(2), pp. 117-122. <https://doi.org/10.3906/vet-0911-229>
- Yu, S.W., Bai, H., Zhang, Z., Cao, Z., Liu, Z., Yang, C., Sun, S., Wang, L., Ling, Y., Zhang, Z. and Cao, H., 2024. Roles of Y-27632 on sheep sperm metabolism. *Journal of Animal Science*, 102, pp. e020 <https://doi.org/10.1093/jas/skac020>
- Zeidan, A.E.B., 1989. Physiological studies on Friesian cattle. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Zagazig University, Zagazig, Egypt.