

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



Estudio comparativo de tres diluyentes (Andromed, Triladyl y Citrato de Sodio con yema de huevo) en la preservación de semen caprino

Por:

ALDO KEVIN MUÑOZ CUEVAS

Tesis

Presentada como requisito parcial para

Obtener el título de:

Ingeniero Agrónomo Zootecnista

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Marzo 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Estudio comparativo de tres diluyentes (Andromed, Triladyl y Citrato de sodio con yema de huevo) en la preservación de semen caprino

Por:

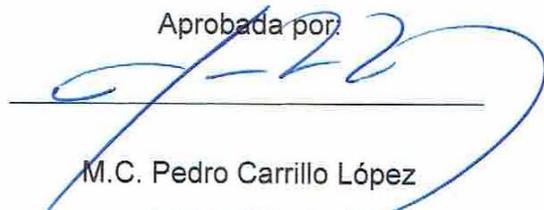
MUÑOZ CUEVAS ALDO KEVIN

TESIS

**QUE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO
EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:**

INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

Aprobada por



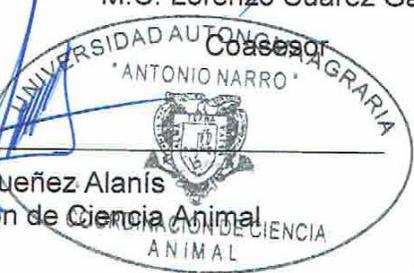
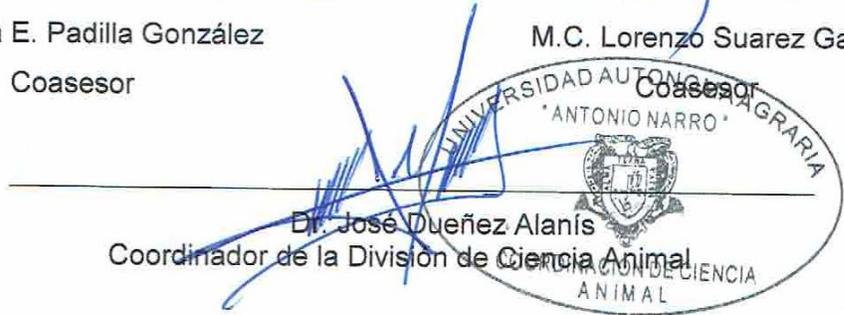
M.C. Pedro Carrillo López
Asesor Principal



Dra. Laura E. Padilla González
Coasesor



M.C. Lorenzo Suarez García
Coasesor



Dr. José Dueñez Alanís
Coordinador de la División de Ciencia Animal

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Marzo 2018

DEDICATORIA

A MIS PADRES.

RIGOBERTO MUÑOZ RODRÍGUEZ

ARACELI CUEVAS SALGADO

Gracias por el apoyo y esfuerzos realizados para poder terminar mi carrera profesional, siendo para mí la mejor herencia.

Mamá: por tu cariño y comprensión que desde niño me has brindado, por guiar mi camino y estar junto a mí.

Papá: mi ejemplo a seguir, el hombre que siempre he admirado.

Gracias.

A mis hermanos Eder y Pavel por su afecto, cariño y alegría que desde niños siempre hemos compartido.

AGRADECIMIENTOS

Al M.C. Pedro Carrillo López por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por la confianza y todos sus consejos que me ayudaron a culminar mi trabajo, por la paciencia y el apoyo en campo para conseguir los materiales necesarios para desarrollar este trabajo y sobre todo por su gran amistad.

A la Dra. Laura Emilia Padilla González por toda la ayuda brindada en la elaboración y redacción de este trabajo, su apoyo en el laboratorio y en los procesos de recolección y evaluación de semen caprino.

Al M.C. Lorenzo Suarez García por su asesoramiento en el análisis estadístico de mi investigación.

Al Ing. Agustín Díaz Acosta por su apoyo brindado en el laboratorio y en la práctica del proceso de extracción de semen caprino.

A mis amigos y compañeros de generación por su gran amistad, apoyo y compañía.

A Zazil Rojas: por el gran apoyo y motivación que me brindaste durante toda esta trayectoria, eres la mejor compañera y amiga que alguien puede pedir. Gracias por estar para mí siempre.

Con mucho orgullo a mi casa de estudios la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro mi "Alma mater".

YO CREO EN LA AGRICULTURA

*La agricultura es el destino más grande del hombre,
es consagrarse a un compromiso,*

'Un compromiso por la tierra y tener fe en dios'.

*La agricultura es trabajo pesado y sudor honesto;
pero también es cuidado, sacrificio, paciencia y amor al suelo
que con frecuencia no es tan bueno para el hombre.*

*El agricultor es un hombre valiente, ya que debe tener fe en su tierra
y en sí mismo para tratar una vez y otra vez, y siempre con el
mismo vigor y fuerza que tenía en un principio.*

*La agricultura es también una experiencia de aprendizaje.
A través de su trabajo, el agricultor aprende varias lecciones de vida
que son transmitidas a sus hijos, lecciones como compartir, amar, y
lo más importante, a apreciar.*

*La agricultura es una vida de trabajo, amor y dedicación,
es la ocupación en la que el hombre da más al mundo
de lo que recoge.*

*La agricultura es una profesión en la cual envejecer es un placer,
Debido a los recuerdos colmados y gratificantes que el agricultor ha vivido y experimentado,
confirmando así, que ha pasado su tiempo
en esta tierra de manera más honorable
y honesta posible.*

(Anónimo)

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	VI
I.INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo general	4
1.2 Objetivos específicos	4
1.3 Hipótesis	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1 Anatomía del aparato reproductor del macho cabrío	5
2.1 Sistema hormonal del macho cabrío	8
2.2 Pubertad en el macho cabrío	9
2.3 Estación reproductiva.....	9
2.4 Historia de la congelación del semen.....	11
2.5 Características generales del semen	12
2.6 Extracción y recolección de semen.....	15
2.7 Método de la vagina artificial.....	17
2.8 Método de la electroeyaculación.....	18
2.9 Evaluación de la calidad espermática	19
2.10 Volumen y apariencia.....	20
2.11 Motilidad espermática	20
2.13 Concentración espermática.....	21
2.14 Morfología espermática.....	22
2.15 Conservación de semen caprino.....	25

2.16 Medios de conservación espermática	25
2.17 Proceso de dilución	27
2.18 Diluyentes	27
2.18.1 Características de los diluyentes.....	28
2.19 Sustancias tampón.....	29
2.20 Sustancias crioprotectoras	30
2.20.1 Crioprotectores no penetrantes.....	31
2.20.2 Crioprotectores penetrantes.....	31
2.21 Diluyentes de refrigeración.....	32
2.21.1 Agua de coco	33
2.21.2 Leche de vaca.....	33
2.21.3 Yema de huevo	34
2.22 Diluyentes para congelación	35
2.23 Diluyentes comerciales más utilizados.....	38
2.23.1 Tris	38
2.23.2 Citrato-yema.....	38
2.23.3 Triladyl	39
2.23.4 Universal de IMV	39
2.23.5 Andromed.....	40
2.24 Refrigeración de semen caprino	40
2.25 Congelación de semen caprino	41
2.26 Proceso de descongelación	42
III.MATERIALES Y MÉTODOS	44
3.1 Localización del área de estudio	44
3.2 Materiales.....	44

3.3 Sementales utilizados	46
3.4 Método de obtención de la muestra de semen	46
3.5 Evaluación de la muestra de semen	47
3.5.1 Apariencia	48
3.5.2 Volumen	48
3.5.3 Motilidad.....	48
3.5.4 Concentración	49
3.6 Preparación de los diluyentes a utilizar	49
3.6.1 Preparación del Triladyl con yema de huevo	50
3.6.2 Preparación de andromed.....	51
3.6.3 Preparación de Citrato de Sodio con yema de huevo	52
3.7 Dilución de semen.....	53
3.8 Cálculos de dilución	54
3.9 Gliceralización y equilibración	55
3.10 Envasado de semen.....	56
3.11 Congelamiento y almacenamiento de pajillas	56
3.12 Evaluación post-descongelación.....	56
3.13 Diseño experimental.....	57
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
V.CONCLUSIONES	64
VI. LITERATURA CITADA	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Aparato genital del macho cabrío.....	7
Figura 2 Corte de testículo del macho cabrío.....	8

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentración de yema de huevo utilizada por distintos autores para la refrigeración de semen caprino.....	35
Cuadro 2. Porcentaje de glicerol utilizado por distintos autores en los diluyentes de congelación de semen caprino.....	37
Cuadro 3. Componentes y proporciones utilizadas en el diluyente Triladyl	51
Cuadro 4. Componentes y proporciones utilizadas en diluyente Andromed	52
Cuadro 5. Componentes y proporciones utilizadas en el diluyente citrato de sodio..	53
Cuadro 6. Diferencias entre el porcentaje de motilidad espermática recuperada de las fases de pre y post-descongelación referente al porcentaje de motilidad del semen en fresco.....	60

ÍNDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Porcentaje de motilidad promedio recuperada de cada diluyente.....	59
Grafica 2. Porcentaje de motilidad post-descongelación de cada uno de los diluyentes en el total de las pajillas evaluadas	61
Grafica 3. Porcentaje promedio de motilidad recuperada del diluyente Andromed.....	62
Grafica 4. Porcentaje promedio de motilidad recuperada del diluyente Triladyl.....	63
Grafica 5. Porcentaje promedio de motilidad recuperada del diluyente Citrato de sodio-yema.....	63

I.INTRODUCCIÓN

Los caprinos constituyen la ganadería típica de las zonas áridas y semiáridas, consideradas marginales para otro tipo de ganado, gracias a su capacidad de adaptación le permite sobrevivir en regiones de baja productividad forrajera. En nuestro país, la raza más difundida es la denominada Criolla, que, con sus diferentes biotipos regionales, representa un medio de subsistencia de suma importancia como productora de carne y de leche, presentando una gran variabilidad genética que permitiría iniciar un exitoso proceso de selección y mejoramiento genético. (French, 1970).

Debido a las implicaciones económicas derivadas de la producción de ciertas especies ganaderas, aquellas de mayor rendimiento, como lo son la bovina y la porcina, han hecho que sean las especies más estudiadas en el campo de la fisiología reproductiva y biológica del espermatozoide, estimulando así su selección y desarrollo. Debido a esto, especies como la caprina, han sido menospreciadas debido a su carácter marginal, no existiendo demasiados estudios sobre el comportamiento reproductivo de la especie.

De la Vega et al (1991) mencionan que, debido a estos factores, es indiscutible la implementación de técnicas de criopreservación, y de inseminación artificial, esto como herramienta para lograr avances genéticos y reproductivos significativos en los hatos caprinos.

De esta manera, la implementación de técnicas como la inseminación artificial (IA) para programas de mejoramiento genético, implican el desarrollo de técnicas de procesamiento y conservación de semen, principalmente la criopreservación. Donde

de éste último aspecto, depende el futuro de la técnica de IA, dado que, por la marginalidad de algunas zonas productoras, no resulta sencillo practicar esta biotécnica sin contar con semen congelado.

La criopreservación de semen es una importante tecnología reproductiva, que tiene como objetivo promover la conservación de material biológico masculino (espermatozoides) por tiempo indeterminado. De esta manera cuando la criopreservación se asocia a la técnica de inseminación artificial, representan un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad, además la criopreservación de semen representa una alternativa sumamente económica para el productor, al reducir considerablemente los costos de alimentación, transporte y manejo de machos sementales con un gran valor genético, así como la prevención de enfermedades de transmisión sexual. (Castelo *et al.*, 2008).

La calidad seminal varía en función de diversos factores tales como el tamaño testicular, gonadotropinas circulantes, raza, edad, individuo, medio ambiente (longitud de la luz del día, temperatura y humedad) y manejo. (Iritani *et al.*, 1964.)

Los diluyentes del semen deben ser capaces de preservar la viabilidad del espermatozoide durante la transportación, almacenamiento e inseminación, prolongar la vida espermática y proporcionar un ambiente nutritivo adecuado. (Martín-Rillo *et al.*, 1996).

Entre las características fisicoquímicas más deseables que debe tener un diluyente, está la capacidad de regular el pH, la disponibilidad para la utilización del espermatozoide en el momento de reconstruir el producto, además de evitar el daño producido por la disminución de la temperatura y los cambios osmóticos. (Gilmero *et al.*, 1998).

Respecto a lo citado anteriormente es indispensable tener los conocimientos teóricos y prácticos sobre la metodología del procesamiento de semen congelado, lo cual ayudará a hacer más eficiente y de menor costo las técnicas de criopreservación de espermatozoides, así como la técnica de inseminación artificial. Y dada la importancia que representa en esta especie de interés, se plantearon los siguientes objetivos para este trabajo de investigación.

1.1 Objetivo general

Estudio comparativo de 3 diluyentes (Citrato de sodio al 2.9% con yema de huevo, Triladyl con yema de huevo y Andromed) mediante la evaluación post-descongelación (recuperación espermática) en el procesamiento de semen caprino.

1.2 Objetivos específicos

Evaluar la motilidad pre-congelación (5°C) y post-descongelación (35°C) en cada diluyente.

Identificar el diluyente con mejor adaptación a las características propias del semen caprino para su procesamiento y congelación.

1.3 Hipótesis

Ho= (todos los diluyentes presentan igual comportamiento de respuesta).

H1= (al menos un diluyentes presenta un comportamiento de respuesta diferente).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Anatomía del aparato reproductor del macho cabrío

Es importante conocer la anatomía de cualquier aparato o sistema para así poder comprender como es que cada una de las estructuras que lo componen participan en el proceso al cual están destinados.

El aparato reproductor del macho cabrío está constituido básicamente por testículos, epidídimo, conducto deferente, bolsa escrotal, glándulas accesorias y pene.

2.1.1 Testículos

Se encuentran suspendidos por el divertículo del abdomen por una bolsa llamada escroto localizada en la región inguinal. Estos órganos primarios producen los espermatozoides que son células encargadas de la reproducción y hormonas sexuales como la testosterona. El testículo está dividido uno de otro por un tabique y cada uno en su interior tiene varias secciones llamadas lóbulos y dentro de estos se encuentran los túbulos seminíferos que alojan a las células productoras de espermatozoides. Cada testículo posee un sistema individual sanguíneo y nervioso; así pues, las partes principales son: epidídimo, tubos seminíferos, conducto deferente y escroto que los recubre (De la Rosa, 2011).

2.1.2 Escroto

Bolsa que contiene los testículos y lo protege, posee una piel fina cubierta de pelo delgado y separa a los testículos por medio de un tabique escrotal, además, regula la temperatura manteniéndola por debajo de la temperatura del cuerpo,

interviniendo en conjunto con el musculo cremaster externo para que sea adecuada la producción de esperma por el testículo (Vera, 1993).

2.1.3 Epidídimo

Es la porción complementaria testicular que se encuentra cerca del tabique escrotal y es un tubo largo y enrollado dividido en tres partes: cabeza, cuerpo y cola, su función consiste en concentrar, madurar, transportar y almacenar los espermias (De la Rosa, 2011; Vera, 1993).

2.1.4 Conducto deferente

Es un tubo de pared gruesa y musculosa y junto con los nervios, vasos sanguíneos y linfáticos forman el cordón espermático, su función consiste en transportar a los espermatozoides desde la cola de epidídimo hasta la uretra en el momento de la eyaculación (Cantú, 1988; Vera, 1993).

2.1.5 Glándulas accesorias

Se localizan cerca unas de otras en el interior del abdomen, estas glándulas son: las vesículas seminales, la próstata y las glándulas de Cowper. Función principal: forman la mayor parte del líquido seminal (vesículas seminales), lubrican y limpian la uretra (próstata), activan a los espermatozoides, producen sustancias amortiguadoras para ayudar al semen a resistir cambios de pH, aportación de ciertos nutrientes al esperma (Amo García *et al.*, 1982; Vera, 1993).

2.1.6 Uretra

Es un tubo que sirve de conducto a la orina y al semen, consta de tres partes:

a) Pélvica: cubierta por el musculo uretral.

- b) Bulbo de la uretra: parte que se curva en el arco isquiático.
- c) Porción peneal: Área del pene (Amo García *et al.*, 1982; Vera, 1993).

2.1.7 Pene y prepucio

Órgano copulador del macho de forma tubular el cual tiene en la punta una espícula delicada y de gran sensibilidad (glande) en su estructura interna es cavernoso y fibroelástico con una porción en forma de S que le permite su extensión durante la eyaculación, su función es la de permitir el paso de la orina y depositar el semen en la vagina de la hembra. El prepucio es la extremidad libre del pene, lo cubre y protege del medio exterior (Koeslag, 1982; Vera, 1993).

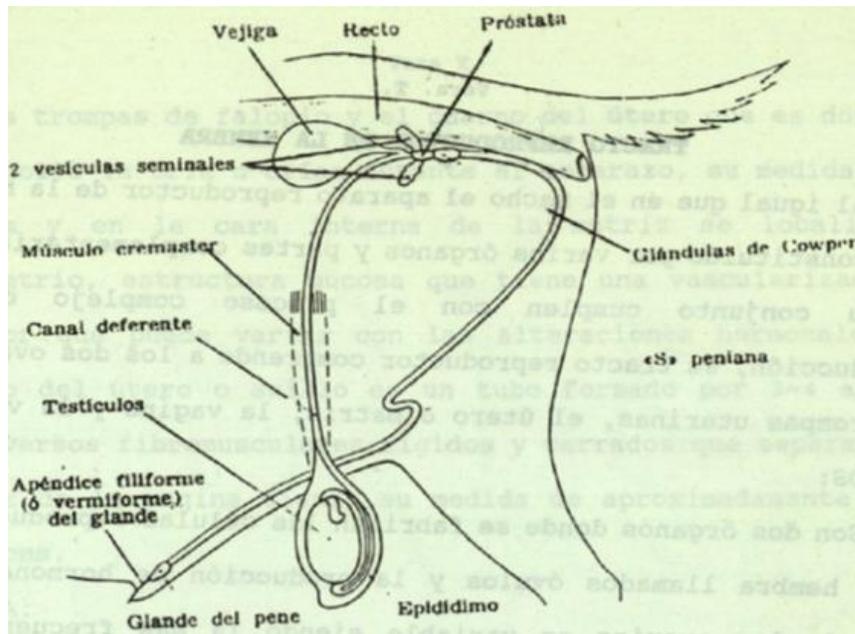


Figura 1 Aparato genital del macho cabrío (Amo García, 1982). Citado por Vera (1993) Universidad Autónoma de Nuevo León, centro regional de fomento agropecuario. Reproducción de ganado caprino. Fuente: Universidad Autónoma de Nuevo León, centro regional de fomento agropecuario. Reproducción de ganado caprino. M.V.ZM.C. Telésforo Vera Garza. Febrero 1993.

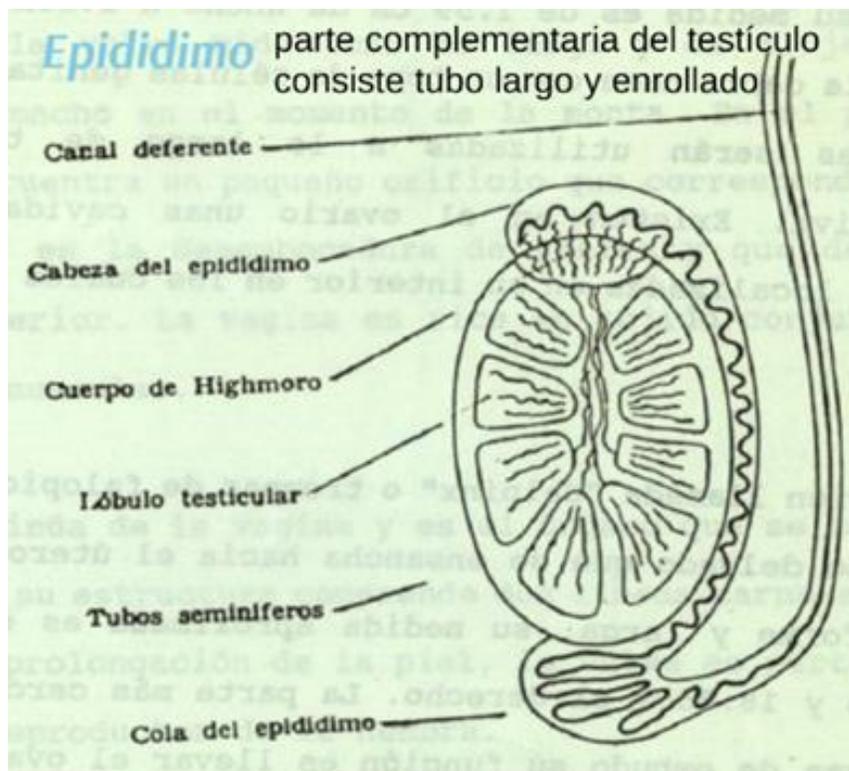


Figura 2 Corte de testículo del macho cabrío (E. Quitet, 1978). Citado por Vera (1993) Universidad Autónoma de Nuevo León, centro regional de fomento agropecuario. Reproducción de ganado caprino. Fuente: Universidad Autónoma de Nuevo León, centro regional de fomento agropecuario. Reproducción de ganado caprino. M.V.Z M.C. Telésforo Vera Garza. Febrero 1993.

2.1 Sistema hormonal del macho cabrío

El control hormonal de la actividad reproductora en el macho se debe inicialmente al estímulo que recibe el hipotálamo, este secreta factores de liberación GnRh que estos a su vez estimulan a la hipófisis para que pueda producir la hormona luteinizante (LH) que induce la producción de andrógenos en conjunto con la hormona folículo estimulante (FSH) (Smith, 1980).

Los andrógenos producidos en el testículo estimulan a las células intersticiales (células de Leydig) del testículo para producir la testosterona, la cual lo mantiene funcionalmente en actividad manifestándose en el cuerpo del macho los caracteres

sexuales secundarios, como lo es la aparición de la libido y necesidad de reproducirse, mayor talla y corpulencia, incremento del sistema musculo-esquelético, balido más grave que la hembra e instinto de pelea (Smith, 1980; Vera, 1993).

2.2 Pubertad en el macho cabrío

En el macho la aptitud para la reproducción ocurre entre los 6 y 12 meses de edad. Es difícil predecir el peso que éste alcanza debido a múltiples factores que influyen directamente sobre el inicio de la pubertad, siendo el factor nutricional el más importante para la presentación temprana de la madurez sexual (Cupps, 1991).

A los 3 a 4 meses de edad, el cabrito ya está produciendo espermatozoides, pero la libido (deseo sexual) se presenta más tarde, conjuntamente con la capacidad de erección del pene. Por consiguiente, para evitar preñeces no deseadas, es necesario separar los machos de las hembras a partir de los 4 meses de edad (Vera, 1993).

Por otra parte, para que haya una espermatogénesis completa se requiere de la secreción de la hormona sexual masculina llamada testosterona, la cual hará que sean visibles los caracteres sexuales secundarios, la mucosa prepucial, manifestación de la libido y el desarrollo del pene que permitirá la eyaculación normal (Hunter, 1980; Cupps, 1991; Vera, 1993).

2.3 Estación reproductiva

Durante el año, la cabra presenta un periodo de reproducción y otro de descanso, pudiendo clasificarse por su comportamiento sexual, como un animal poliestrico estacional de días cortos. El comportamiento sexual está regulado por la ley natural que permite a los animales reproducirse en los momentos más propicios

para la supervivencia de las crías, como su nacimiento, lactación y óptimo crecimiento previniendo épocas desfavorables como la invernal (Vera, 1993).

La mejor estación para los nacimientos es el comienzo de la primavera; la manifestación del celo y la libido, así como el acoplamiento sexual, se presentan normalmente a finales de agosto hasta mediados de marzo. La mayoría de las hembras son cargadas en septiembre, octubre y noviembre para ahijar en febrero, marzo o abril. (Hunter, 1980; Vera, 1993).

El macho también es estacional, variando la influencia del fotoperiodo con la latitud. Así, en latitudes superiores a 40°- 45°, la pérdida de actividad reproductiva es muy marcada en días largos (poca libido y baja calidad espermática). En tanto que en latitudes más bajas, comprendida entre 30° y 40° ésta pérdida es solo moderada, pero se afecta también su calidad espermática, que es menor fuera de la estación sexual. En regiones tropicales la actividad sexual en la cabra se presenta durante todo el año debido a que no existen variaciones entre la cantidad de horas luz y la temperatura. (Vera, 1993).

Otro punto importante es la presencia del macho, mostrando ser un factor importante en la iniciación del estro y ovulación. En la cabra, este factor tiene mayor influencia a principios de la estación de crías provocando un adelanto de la misma y una sincronización de estros. Esta práctica se ha utilizado también para estimular la aparición de la pubertad de las hembras que ya alcanzan la edad pero no el peso adecuado para reproducirse (Greyling, 1988; Hunter, 1980; Vera, 1993).

2.4 Historia de la congelación del semen

El primer reporte exitoso que se tiene de criopreservación de semen, fue realizado por Spallanzani en el año de 1776, él observó que cuando los espermatozoides de humano, garrapato y rana, eran enfriados en nieve hasta un tiempo de 30 minutos se volvían inactivos, pero podían ser reactivados; la reducción de la temperatura fue empleada para deprimir la actividad metabólica y prolongar la vida activa del espermatozoide. Un siglo después Mantegazza (1866), observó en sus investigaciones que el espermatozoide de humano sobrevivió en semen congelado a -17°C , este fue uno de los primeros reportes de recuperación de células de mamíferos después de haber sido expuestas a bajas temperaturas en un punto de congelación (Bwanga, 1991).

Polge *et al.* (1949) demostraron con sus investigaciones el poder crioprotector del glicerol, al realizar por primera vez la congelación de material seminal con éxito. Estos investigadores lograron recuperar espermatozoides de varias especies después de congelarlos en una solución con este agente crioprotector. El gran descubrimiento de la acción crioprotectora del glicerol abrió un era exitosa en la criopreservación no solo de gametos de varias especies, sino también de otras células y tejidos. Gracias a estas investigaciones la conservación de semen congelado se ha convertido en una herramienta de especial importancia para los programas de mejoramiento genético, porque permite conservar y almacenar semen de alta calidad genética y biológica, durante largos períodos de tiempo, tanto para el transporte del mismo entre largas distancias, así como para el mantenimiento de especies o razas en peligro de extinción o de muy alto valor genético.

2.5 Características generales del semen

2.5.1 Estructura del espermatozoide

El espermatozoide es la célula germinal masculina, altamente especializada, que ha evolucionado para cumplir una función biológica compleja, la cual es fecundar al ovocito. Se trata de una célula haploide, producto final del proceso de la gametogénesis en el macho, portadora de la información genética paterna (Evans y Maxwell, 1990; Hidalgo, 2004; Blanco y García, 2004).

Según las investigaciones de Graham (1996) nos dice que las cualidades que deben de tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactiva, integridad estructural y funcionalidad de la membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima de material genético.

En el espermatozoide se distinguen tres partes: la cabeza, que contiene los cromosomas responsables de portar la información genética, la pieza de conexión o cuello y la cola que es el órgano locomotor del espermatozoide (Evans y Maxwell, 1990).

La estructura general es muy similar en la mayoría de las especies animales; sin embargo, su morfología externa es específica para cada especie. La longitud de los espermatozoides va desde 60 μm (micras) en cerdos y caballos; y hasta 75 μm (micras) en rumiantes (Blanco y García, 2004; Wrobel y Bergmann, 2006; Reece, 2010).

Particularmente, el espermatozoide de macho cabrío tiene una longitud de 60 μm (micras), su cabeza mide de 8 a 10 μm de largo, 4 μm de ancho y 1 μm de grosor (Evans y Maxwell, 1990).

La cabeza del espermatozoide varia en su forma según la especie, en el macho cabrío, el morueco, el toro, el cerdo y el caballo es plana y ovoide; en el humano es aplastada y elipsoide; en la rata es falciforme y en el gallo es delgada y alargada (Bonet et al., 2000, Blanco y García, 2004; Hidalgo, 2004; Wrobel y Bergmann, 2006).

2.5.2 Plasma seminal

Muiño-Blanco *et al.* (2008) mencionan en su investigación que el plasma seminal de los mamíferos es una secreción de múltiples glándulas del tracto reproductor masculino, que juega un papel importante en la maduración final de los espermatozoides.

Evans y Maxwell (1990); Reece (2010) señalan en sus investigaciones que el plasma seminal es un líquido isotónico y neutro, compuesto principalmente por agua (75%), sustancias orgánicas (fructosa, sorbitol, inositol, ácido cítrico, glicerilfosforilcolina, fosfolípidos, prostaglandinas y proteínas) e inorgánicos (sodio, potasio y cloro) que sirven de protectores y nutrientes de los espermatozoides.

En su investigación Evans y Maxwell (1990) mencionan que curiosamente los componentes orgánicos tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la presión osmótica del semen, más que los iones inorgánicos, aunque se encuentren cantidades considerables de estos últimos en el plasma seminal.

Los componentes orgánicos también son esenciales para mantener el metabolismo espermático y el pH, siendo las proteínas los constituyentes más importantes de la función de los espermatozoides en los mamíferos (Muiño-Blanco *et al.*, 2008).

Rodriguez (2003) señala que la mayoría de las proteínas del plasma seminal son productos de secreción de la vesícula seminal, una glándula reproductiva accesoria que poseen los mamíferos machos. Algunas proteínas del plasma seminal son relativamente específicas para la regulación de la función espermática y fertilidad. Existe una familia de proteínas designadas BSP-A1, BSP-A2, A3 y BSP-BSP-30kDa, colectivamente llamadas BSP (proteínas del plasma seminal de bovino) que constituyen la mayor fracción proteica en el plasma seminal del toro. Las proteínas homólogas en el macho cabrío son la GSP-14, GSP-15, GSP-20 y GSP-22 kDa (proteínas del plasma seminal de caprino) (Villemure *et al.*, 2003).

Evans y Maxwell (1990); Hafez y Hafez (2002) mencionan en sus investigaciones que el plasma seminal normalmente es de color blanco pero en el macho cabrío puede ser de color amarillo por su contenido de riboflavina procedente de las glándulas vesiculares.

Evans y Maxwell (1990) señalan que el pH del plasma seminal se mantiene muy próximo a 7.0 gracias a un complejo sistema amortiguador, protegiendo a los espermatozoides de los cambios bruscos de pH que deterioran la supervivencia de las células espermáticas.

Aunado a esto, el plasma seminal del macho cabrío tiene como peculiaridad un contenido enzimático proveniente de las glándulas bulbouretrales, formados por la denominada enzima coaguladora de la yema de huevo (EYCE). Esta enzima es una

fosfolipasa A, que hidroliza la lesolecitina, afectando esta última a la viabilidad espermática (Evans y Maxwell, 1990; Arrebola, 2012; Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012).

Arrebola (2012); Jiménez-Rabadán *et al.* (2012) indican en sus investigaciones que otro factor es una fracción glicoproteica del plasma seminal (SBUIII), cuyo origen son las glándulas bulbouretrales, que interactúan con el diluyente a base de leche provocando inhibición de la movilidad, ruptura del acrosoma y muerte celular espermática. Se cree que estas dos moléculas, la SBUIII y EYCE podrían ser la misma.

2.6 Extracción y recolección de semen

La obtención y extracción de semen, es el primer paso dentro de un programa de inseminación artificial, esta labor resulta de gran importancia para la obtención de eyaculados de buena calidad y para la adecuada utilización de los sementales, consiguiéndose así una vida prolongada para los mismos (Garde, 1995).

Evans y Maxwell (1990) mencionan que la recolección del semen se puede realizar empleando diversas metodologías, siendo las más empleadas en pequeños rumiantes: post-coital, electroeyaculación y vagina artificial. La utilización de uno u otro método estará en función de las características del macho reproductor, utilizando el post-coito y la electroeyaculación en individuos con problemas físicos que imposibilitan la monta, así como en animales jóvenes y en machos mal entrenados que se niegan a saltar en presencia del personal técnico.

Según Hafez (1968) en su investigación indica que el mejor procedimiento para la recolección del semen es el uso de la vagina artificial. Esta es de simple construcción y simula una copula natural. Aunque hay variedad de vaginas artificiales que difieren en tamaño y figura para especies distintas. Esta unidad proporcionara la temperatura,

presión, y lubricación adecuada para provocar la eyaculación, y lleva adherido un tubo para recoger el semen.

La recolección de semen mediante la vagina artificial es el método más utilizado en el ganado ovino y caprino debido a su rapidez y limpieza, permitiendo la obtención de varios eyaculados consecutivos Evans y Maxwell (1990). Sin embargo, el empleo de este método requiere el entrenamiento de los sementales, existiendo machos que se habitúan sin dificultad a la vagina artificial, mientras que otros no son capaces de vencer la inhibición de la conducta sexual provocada por la presencia del hombre (Evans y Maxwell, 1990).

La recolección del semen con electroeyaculador produce un volumen y concentración menor, este tiene ventajas cuando se trabaja con sementales que no están acostumbrados al manejo, cuando son demasiados sementales o cuando estos presentan defectos físicos no hereditarios sobre todo en las patas, lo que les impide efectuar una monta natural y dificultan la recolección de semen con vagina artificial, este método consiste en provocar la eyaculación por medio de estímulos eléctricos de menor a mayor intensidad, el aparato contiene un electrodo que se introduce en el recto y un transformador que manda corriente eléctrica (Instituto Nacional de Capacitación del Sector Agropecuario, 1983).

Según los reportes de Bonadonna (1989) Gunn fue el primero que probó el método de la electroeyaculación para obtener el material seminal en carneros y machos cabríos en Sydney, Australia.

En el año de 1932 Gunn da inicio a sus investigaciones del método de la electroeyaculación y en el mismo año, publicó sus primeras observaciones experimentales, donde menciona que se puede considerar el proceso de

electroeyaculación como el resultado de una serie de contracciones rítmicas de orden expulsivo, que afectan a los diversos segmentos de las vías urogenitales de emisión del semen, desde los epidídimos hasta los conductos deferentes, las ampollas seminales, los conductos eyaculatorios; y la uretra peniana.

De esta manera, con sus investigaciones, Gunn demuestra que las corrientes eléctricas fuertes de 30 voltios a 160 mA (miliamperio), aplicadas en la porción caudal de la región lumbar, son suficientes para contraer la musculatura propia del epidídimo, del conducto deferente y de las glándulas accesorias, y provocar la emisión de material seminal con una erección parcial (Bonadonna, 1989).

2.7 Método de la vagina artificial

La vagina artificial consiste en un tubo cilíndrico de plástico rígido y resistente, de siete centímetros de diámetro y 35 a 40 centímetros de largo, recubierto internamente por una camisa de goma que se dobla sobre los extremos del cilindro formando una cámara que se llena con agua caliente (45 a 46 ° C) y aire, con el fin de proveer el estímulo adecuado de temperatura y presión, para lograrse así la eyaculación (Morillo et al., 2012).

Para la monta se utiliza un señuelo que puede ser una hembra, o un maniquí. Antes de colectar el semen se debe de tener en cuenta dos aspectos importantes: la higiene y el estímulo del semental (Rangel., 2007).

Para proceder a la recolección del eyaculado con el animal y la vagina artificial, previamente preparados, un operador diestro se coloca del lado derecho del macho, al momento del intento de monta, se desvía el pene tomando el prepucio con la mano izquierda hacia el lado derecho, impidiendo todo contacto con la monta. Con la mano derecha, sosteniendo la vagina artificial, se coloca el extremo lubricado por delante del

pene, y como respuesta al estímulo (presión y temperatura) semejante a la vagina de la hembra en celo, el macho cabrío penetra la vagina en toda su extensión, realizando lo que se conoce como golpe de lomo (Morillo et al., 2012).

2.8 Método de la electroeyaculación

En éste método se hace uso de un electroeyaculador, que no es más que un electrodo conectado a una batería que genera estimulaciones rítmicas provocadas por descargas no mayores a 20 voltios (Rangel, 2007).

Los electroeyaculadores están diseñados para estimular los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos con impulsos de bajo voltaje y amperaje y de esta forma pueden inducir una erección peneana y la eyaculación. Un sistema de electroeyaculación está constituido por los siguientes componentes: la caja de transporte, la sonda rectal, la unidad de control, el cargador de batería, el cable de energía, el cable de conexión de la sonda, el mango, el cono y el envase de colección (Angelino, 2009).

La técnica de electroeyaculación consiste en dar pulsos eléctricos muy leves en la próstata y vesículas seminales para que el animal presente erección y eyaculación (Duarte, 2008; Cancino, 2009).

Con la utilización del electroeyaculador, como método para la recolección de semen, la eyaculación es un proceso bifásico, primero ocurre la emisión y continúa con la erección y la eyaculación propiamente dicha. Cuando se produce la estimulación adecuada, esta viaja vía nervio pudendo interno hacia los centros lumbosacros de la columna vertebral, desde allí parte la respuesta vía nervios simpáticos lumbares (nervio erigente del plexus hipogástrico), lo cual estimula la contracción de la musculatura lisa que recubre la próstata, glándulas vesiculares y conductos

deferentes, asegurando la progresión de la masa espermática hacia la uretra pélvica (emisión) (Morillo *et al.*, 2012).

Antes de la utilización del electroeyaculador se procede a la preparación del animal, lo cual consiste en: recortar los pelos del orificio prepucial y limpiarlo, si es necesario se debe lavar y secar cuidadosamente el área. Un ayudante procede a limpiar el recto y a estimular mediante masaje transrectal las glándulas accesorias (glándulas vesiculares y ampollas de los conductos deferentes) y, posteriormente, se introduce el electrodo adecuado (Morillo *et al.*, 2012).

El recolector debe ser capaz de reconocer la fracción pre espermática y sólo recolectar la segunda fracción rica en espermatozoides. Para la recolección del eyaculado se utiliza un aparato, el cual consiste en un aro de plástico con mango que sostiene un embudo de látex o plástico y un tubo graduado para la recolección del eyaculado, este último se protege de los rayos de luz solares con un envase plástico y agua a 37 ° C. para evitar daños a los espermatozoides (Morillo *et al.*, 2012).

2.9 Evaluación de la calidad espermática

Evans y Maxwell (1990) señalan que la primera valoración del semen, independientemente después de la extracción, corresponde a la valoración macroscópica, donde se determinan cuidadosamente el volumen, color, olor, viscosidad y densidad. Aunado a esto Bonet *et al.*, (2006); Cebrián *et al.*, (2010) mencionan que después de la valoración macroscópica, se deben evaluar las características microscópicas que tradicionalmente incluyen la concentración, motilidad, morfología e integridad de membrana y tolerancia osmótica. Además de estos parámetros, Petrunkina y Harrison, (2011); Petrukina y Harrison, (2013); Sancho y Vilagran, (2013) mencionan que si se pretende predecir la capacidad fecundante parecería necesario completar el análisis seminal con la determinación de parámetros

que miden cambios estructurales, fisiológicos y el estatus metabólico de las células espermáticas, entre los que se encuentran integridad de acrosoma, integridad nuclear, porcentaje de apoptosis espermática, estatus de la vaina mitocondrial, estatus de capacitación, fluidez de membrana, niveles de especies reactivas al oxígeno y la actividad de metabolitos y enzimas.

2.10 Volumen y apariencia

El semen del macho cabrío es de color blanco grisáceo o amarillento, pudiendo variar de un eyaculado a otro, aún en el mismo semental. El volumen de eyaculado en promedio es de 1.2 ml, pero este puede mostrar alguna variación dependiendo de la edad, condición del animal, frecuencia de recolección y método de recolección. La concentración espermática va desde de 3.5 a 6 millones de espermatozoides por mililitro y la consistencia varía desde clara-acuosa hasta cremosa espesa, dependiendo de la relación de contenido entre sus dos constituyentes, espermatozoides y plasma seminal (Evans y Maxwell, 1990; Arrebola, 2012).

2.11 Motilidad espermática

Bonet *et al.* (2006); Furstoss *et al.* (2010); Sancho y Vilagran (2013) mencionan en sus investigaciones que un hecho característico del espermatozoide es su movilidad o motilidad, con lo que su determinación puede proporcionar un medio relevantemente sencillo para conocer la calidad de semen. A pesar de que presenta una pobre correlación con la fertilidad in vivo, es el parámetro más utilizado junto con la concentración espermática.

Según su investigación Evans y Maxwell (1990) mencionan que la motilidad espermática se valora rutinariamente, de manera subjetiva, mediante un microscopio

óptico (a 10x o 20x) sobre una gota de semen diluido en una solución isotónica, determinando el porcentaje de espermatozoides móviles y su calidad de movimiento.

Salisbury y Vandemark (1964) señalan que la motilidad del espermatozoide se caracteriza por breves impulsos de progresión, determinados por el movimiento de látigo de la cola, combinados con un cambio de dirección de derecha a izquierda por un movimiento simple de rotación de la cabeza en torno a su eje longitudinal.

El Instituto Nacional de Capacitación del Sector Agropecuario (1983) dice en su investigación que la estimación del movimiento se hace por medio de la observación al microscopio de una gota de semen, el vigor estará marcado por el movimiento individual de las células espermáticas y la concentración de las mismas. Si la mayoría de las células se encuentran en movimiento y hay una buena concentración, éstas producirán un movimiento al que se le denomina, como olas. Este movimiento en masa tiene la siguiente clasificación:

Muy bueno= ondas oscuras en rápido movimiento.

Bueno= ondas aparentes, movimientos moderados.

Regular= ondas en movimiento poco perceptibles.

Pobre= no hay ondas, células espermáticas móviles.

Muy pobre= no hay células móviles.

2.13 Concentración espermática

La concentración espermática está definida como el número de espermatozoides por unidad de volumen (expresado normalmente en millones por ml) de eyaculado.

Bonet *et al.* (2006); Cebrián *et al.* (2010) indican en sus investigaciones que la determinación de la concentración espermática es una de las valoraciones rutinarias de concentración seminal más importantes, ya que la tasa de dilución depende de ella y por ende el número de dosis por eyaculado.

En su trabajo de investigación Bonet *et al.* (2006) señalan que la fertilidad aumenta a medida que se incrementa la concentración de espermatozoides por dosis, si bien a partir de un determinado nivel ya no se obtiene una mejora en la fertilidad.

Respecto a lo anterior se han realizado diversas investigaciones para determinar la concentración adecuada para la inseminación artificial, dicha concentración va desde $200 \times 10^6/\text{mL}$ hasta $400 \times 10^6/\text{ml}$. Según lo señalan Salamon y Maxwell, (1995); Leboeuf *et al.* (2000); Cseh *et al.* (2012); Faigl *et al.* (2012) en sus investigaciones.

Bonet *et al.* (2006); Cebrián *et al.* (2010); Sancho y Vilagran (2013) mencionan que existen varias formas para realizar este cálculo, siendo las más utilizadas las cámaras de recuento celular (Burker, Thoma y Makler) y en menor medida se utilizan los contadores celulares electrónicos y los programas informáticos de análisis seminal.

2.14 Morfología espermática

El estudio de la morfología espermática es otra prueba importante de la evaluación rutinaria del semen. Se ha demostrado que es un indicador importante del descenso de la fertilidad en humanos y gran número de especies animales según lo mencionan (Gunalp *et al.*, 2001).

Hidalgo *et al.* (2002); Hidalgo *et al.* (2007); Maroto-Morales *et al.* (2010); Yániz *et al.* (2012) señalan que las anomalías de la cabeza del espermatozoide ha sido asociadas con la reducción de la capacidad para unirse al ovulo y la perdida embrionaria temprana, disminución de la fertilidad y calidad del embrión.

Bonet *et al.* (2006); Petrunkina y Harrison (2011) en sus investigaciones mencionan que además de aportar una referencia sobre la fertilidad del eyaculado, la morfología espermática permite la posibilidad de detectar alteraciones en la espermatogénesis y en la maduración epididimaria.

De Alba (1964), menciona en sus investigaciones que los espermatozoides de diversas especies exhiben una extraordinaria similitud tanto en tamaño como en forma. Se divide en 3 partes: cabeza, cuello, y cola. La cabeza mide de 5 a 12 micras de largo y 2.5 a 4.5 micras de ancho. Es aplanada, o con una cara más ancha que la otra. El cuello es sumamente corto y le sigue una cola de 40 a 150 micras de largo dividida en una parte media llamada cuerpo por algunos autores, una parte principal y una final. El tamaño total del espermatozoide no guarda ninguna relación con el peso del animal que lo produce.

Bonet *et al.* (2006); De la paz *et al.* (2011) señalan en sus investigaciones que la morfología espermática puede ser evaluada de dos maneras:

1) Por definición de la proporción relativa de las células, dentro de una categoría morfológica predefinida mediante la observación con un microscopio óptica y la evaluación del impacto de las formas anormales en la capacidad fecundante de la muestra de semen.

2) Mediante el cálculo morfométrico de los parámetros espermáticos básicos (cabeza,

acrosoma, pieza intermedia), por sistemas informatizados y la definición de los biotipos celulares básicos utilizando técnicas de estadística que permitan determinar el potencial fecundante de las muestras analizadas.

Hafez y Hafez (2002); Bonet *et al.* (2006) indican que para poder observar las células, se utilizan diferentes tinciones espermáticas, como azul de metileno, rosa de bengala, entre otras., que proporcionan una distribución homogénea del colorante en el interior de la célula, permitiéndonos así diferenciar el contorno de la misma, al tener un buen contraste con el fondo del campo de visión; en cambio hay otras como la Eosina-nigrosina, Giemsa, William, Papanicolaou, que buscan visualizar partes específicas del espermatozoide o resaltar el resto de las estructuras.

Entre las tinciones usadas para la evaluación de la morfometría se encuentran la Hematoxilina de Harris, Hemacolor, la Diff-Quick recomendada por la OMS, que es la que proporciona mejores resultados en caprinos, y más recientemente se ha desarrollado la tinción SpermBlue tanto para humanos como para especies animales (De paz *et al.*, 2011; Hidalgo *et al.*, 2007; Bonet *et al.*, 2006).

En su investigación Evans y Maxwell (1990) señalan que un eyaculado de macho cabrío se considera normal cuando el porcentaje de formas anormales es inferior al 15%. Las variaciones en la morfología espermática se presentan debido al estrés, factor individual, temperatura y estación del año, entre las anomalías más frecuentes se encuentran en los espermatozoides con la ausencia de cola, cabeza grande, rotura del cuello, cola reducida, cabeza pequeña, cabeza adelgazada y acrosoma anormal.

2.15 Conservación de semen caprino

Evans y Maxwell (1990) mencionan que el fundamento de conservar el semen es prolongar la capacidad fecundante de los espermatozoides, al reducir o detener su movilidad y reacciones metabólicas.

En sus investigaciones Evans y Maxwell (1990); Cebrián *et al.* (2010) señalan que el semen de macho cabrío al igual que el de morueco y toro, pueden conservarse en estado líquido o congelado. Para su uso a corto plazo, el semen puede conservarse en estado líquido, a temperatura ambiente (33°C, semen fresco) o a bajas temperaturas (5 y 15°C, semen refrigerado). Para largos periodos de conservación, se recurre a la congelación de las dosis seminales y su mantenimiento en nitrógeno líquido (-196°C, semen congelado). En cualquiera de los casos es necesario utilizar un medio/diluyente que proteja a los espermatozoides durante este proceso de conservación.

Evans y Maxwell (1990); Gorchach (1999) mencionan que cuando el semen es congelado y conservado a muy baja temperatura, esto en nitrógeno líquido a -196°C, las reacciones metabólicas de los espermatozoides quedan detenidas. Esto hace que el semen pueda conservar genes para futuro uso y se asegure la disponibilidad de un semental en particular. También de esta forma el semen se puede conservar en épocas distintas a la reproductiva. En consecuencia la utilización de sementales se amplía considerablemente al congelar y conservar el semen.

2.16 Medios de conservación espermática

Según Salamon y Maxwell (1995); Purdy (2006) un diluyente, es aquel compuesto que proporciona a las células espermáticas una fuente de energía, protege a las células del daño relacionado con la temperatura y mantiene un pH (capacidad

amortiguadora) y osmolaridad adecuados para que los espermatozoides puedan sobrevivir por periodos cortos o largos de tiempo.

Evans y Maxwell (1990); Salamon y Maxwell (2000); Barbas y Mascarenhas (2009); Cebrián *et al.* (2010) indican que los medios para la conservación de espermias deben cumplir las siguientes características:

1. Contener un agente crioprotector como el glicerol, etilenglicol, propilenglicol o dimetilsulfoxido. También se pueden utilizar otros elementos como disacáridos o trisacáridos de alto peso molecular para brindar al medio, características de hipertonidad.
2. Contener una fuente de LDL (lipoproteínas de baja densidad) que protejan contra el shock (choque) por el frío. En este grupo encontramos a la yema huevo y a la leche.
3. Contener una o más sustancias de tipo iónico que mantengan una adecuada presión osmótica y que protejan a los cambios bruscos de pH. Dichas sustancias pueden ser: Tris, Tes, Ácido cítrico, Citrato de sodio y Carbonato de sodio, entre otros.
4. Contener una fuente de energía, por lo regular monosacáridos como la glucosa o fructosa.
5. Contener otros aditivos como antibióticos que protegen contra la proliferación de agentes patógenos como bacterias y hongos. Comúnmente se utiliza una combinación penicilina-estreptomina. Se recomienda añadir 1000 UI de penicilina sódica y 1 mg de sulfato de estreptomina por ml de diluyente.

2.17 Proceso de dilución

Evans y Maxwell (1990); Ritar *et al.* (1990) mencionan que la dilución de los eyaculados tiene como objetivo aumentar el volumen y mantener una concentración espermática adecuada para dar servicio al mayor número de hembras posible. El título de la dilución depende del volumen de inseminación (varia, depende del tipo de inseminación: vaginal, cervical, intrauterina) y la concentración de espermatozoides móviles con la que se pretende inseminar, debido a que independientemente del lugar de la inseminación, el número de espermatozoides móviles esta correlacionado con la fertilidad.

La dilución aconsejada en semen caprino presenta una gran variación entre los autores, según Memmon y Ott (1981); Ritar y *et al.* (1993) señalan en sus investigaciones que los mejores resultados se obtienen con títulos de dilución 1:10 y no con diluciones de 1:1.

Salamon y Ritar (1982); Park (1989) declaran en su investigación que diluciones superiores a 1:1 son las causantes de un descenso en la fertilidad. Por lo tanto, tomando en cuenta lo citado anteriormente, no es aconsejable usar diluciones mayores a 1:5 de los eyaculados destinados a la elaboración de dosis seminales para programas de inseminación artificial.

2.18 Diluyentes

Existe una gran variedad de diluyentes y métodos empleados para la conservación de semen caprino; sin embargo, todos los medios empleados para este fin, prolongan la viabilidad de la célula espermática por un periodo limitado de tiempo (refrigeración) o por tiempo indefinido (congelación), lo que aumenta la rentabilidad del número de dosis obtenidas por eyaculado.

2.18.1 Características de los diluyentes

Fiser *et al.* (1981); Adelhakeam *et al.* (1991); Pérez Fuentes *et al.* (1993); Garde *et al.* (1995) estos autores señalan que los diluyentes empleados en la conservación de células espermáticas deben cumplir una serie de condiciones, las cuales son:

1. Contener moléculas que protejan al espermatozoide frente al frío, clasificadas en función a su capacidad de penetrar la membrana plasmática en: sustancias crioprotectoras penetrantes y no penetrantes.
2. Poseer un pKa (fuerza que tienen las moléculas al disociarse: es el logaritmo negativo de la constante disociación de un ácido débil) 7 y capacidad tampón con el fin de mantener el pH en la neutralidad, compensando la producción de ácido láctico durante la congelación.
3. Ser isotónico con el plasma seminal (320 mOsm/kg) cuando es utilizado en refrigeración, e hiperosmótico (400 mOsm/kg) en congelación.
4. Estar libre de bacterias y contaminación, para lo cual se utilizan antibióticos en su formulación.
5. Contener en su constitución una fuente de energía, siendo la glucosa y fructosa las más utilizadas.
6. Aumentar el volumen substancialmente con el fin de poder realizar múltiples servicios de inseminación.
7. El pH óptimo de los diluyentes empleados en la conservación espermática se mantienen en la neutralidad, lo que hace necesaria la presencia de soluciones tampones para su mantenimiento.

Evans y Maxwell (1990); Molina *et al.* (1990); Dunner (1991) señalan en sus investigaciones que los azúcares presentes en los diluyentes ejercen un efecto positivo sobre la viabilidad espermática debido a su aporte energético al espermatozoide, al ser capaces de metabolizar glucosa, fructosa, manosa y arabinosa,

esta última por la vía oxidativa y a su acción como crioprotectores, contribuyendo a mantener el equilibrio osmótico.

2.19 Sustancias tampón

Rasul *et al.* (2000); Purdy (2006) señalan que los diluyentes deben incluir compuestos con capacidad tamponante, ya que grandes cambios en el pH del semen pueden causar daños en los espermatozoides, mortalidad espermática o infertilidad. Debido a esto Purdy (2006) señala en su investigación, que a fin de mantener la viabilidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides es necesario mantener un ambiente adecuado mediante el control de las variaciones de pH en los medios de crioconservación. Una de las funciones del plasma seminal es precisamente amortiguar los cambios de pH en condiciones *in vivo*, pero no en condiciones *in vitro*. Por esta razón, las sustancias que amortiguan los cambios de pH son incluidas de manera rutinaria en la crioconservación, para reducir los cambios al mínimo. De manera general, una solución de amortiguación para los espermatozoides de caprino debe tener un pH de 6.0-8.0, ser soluble en agua e impermeable a la membrana, tener interacciones mínimas con las sales, verse mínimamente afectada por la concentración del tampón, la temperatura y los contenidos iónicos de la disociación del tampón, así como ser capaz de soportar la degradación enzimática y no enzimática.

En su investigación Jones y Bavister (2000), mencionan que el pH de los diluyentes a base de yema de huevo y leche normalmente oscila entre 6.75 y 6.8. Se ha observado que el pH del diluyente es muy importante para maximizar la respiración espermática y la motilidad. Según Purdy (2006) en sus investigaciones, el consumo de oxígeno de los espermatozoides de caprino es máximo en un pH de 7.2-7.5 y la motilidad espermática óptima se da en un pH de 7.0-7.2, lo cual indica que un medio adecuado para la supervivencia espermática *in vitro* debería tener un pH de 7.2.

Entre las sustancias tampón se encuentran el fosfato y el citrato sódico y los tampones orgánicos que incluyen el Tris y los llamados zwitterionicos ((compuestos químicos eléctricamente neutros que contienen grupos ácidos y básicos por lo tanto es anfótero (sustancia que actúa como ácido o base según la sustancia con la que reacciona)) como Tes, Hepes, Mops, Bes, Mes, Pipes y Tricine (Watson y Martin, 1976; Holt, 2000; Rasul *et al.*, 2000; Cebrián *et al.*, 2010).

Cebrián *et al.* (2010) Señalan en su trabajo de investigación que los tampones orgánicos tienen mayor capacidad tamponante que el citrato o fosfato, pueden penetrar en el interior de la célula actuando como tampones intracelulares y aumentar la tolerancia del espermatozoide frente a un incremento intracelular en cationes monovalentes, por lo que se utilizan con mayor frecuencia en los medios de conservación espermática.

Salamon y Maxwell (1995); Abolonga y Terada (2004); Cabrera *et al.* (2005); Mocé *et al.* (2010) indican en sus investigaciones que el Tris (Tris (hidroximetil) aminometano) es uno de los tampones orgánicos más ampliamente estudiados. Siendo este, el tampón de elección para su uso en espermatozoides de caprino.

2.20 Sustancias crioprotectoras

Ávila-Portillo *et al.* (2006); Fernández *et al.* (2009), reportan en sus investigaciones que los agentes crioprotectores son sustancias muy hidrosolubles y de baja citotoxicidad que disminuyen el punto eutéctico (temperatura mínima a la que una solución se encuentra en estado líquido) de una solución determinada, el descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de tal forma que la célula estará más deshidratada, y el gradiente osmótico al que estará sometida será menor en el momento en que el espacio extracelular se congela.

En su investigación Ávila-Portillo *et al.* (2006) señalan que bioquímicamente es posible distinguir tres tipos de crioprotectores, los alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol), las azúcares (glucosa, lactosa, sacarosa, trehalosa) y el dimetil sulfoxido. Así mismo, debido a su sitio de acción y/o permeabilidad celular, las sustancias crioprotectoras se pueden clasificar en penetrantes y no penetrantes.

2.20.1 Crioprotectores no penetrantes

Son sustancias que no pueden penetrar al interior del citoplasma celular, debido a su elevado peso molecular y gran tamaño. Por lo tanto, no son crioprotectores propiamente dichos, ya que no penetran en la célula, sino que ejercen su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes (Fernández *et al.*, 2009).

Fernández *et al.* (2009); Barbas y Mascarenhas (2009); Kundu *et al.* (2002) mencionan que son aquellos que al ser incorporados en el medio de dilución, recubren la membrana plasmática del espermatozoide protegiendo su estructura de la acción del frío. En este grupo se encuentran la sacarosa, glucosa, trehalosa, dextrosa, polivinilpirrolidona (PVP), aminoácidos, dextrano, polietilenglicol, la yema de huevo y la leche descremada.

2.20.2 Crioprotectores penetrantes

Los crioprotectores penetrantes son de bajo peso molecular, permeables a la membrana celular, capaces de llegar al interior del citoplasma celular, actúan intra y extracelularmente protegiendo a la célula de las lesiones producidas por la congelación a velocidad lenta (Purdy, 2006).

Estos crioprotectores son solutos que causan la deshidratación de los espermatozoides debido al flujo de agua impulsado osmóticamente. Después de un corto periodo de tiempo, el crioprotector y el agua se equilibran dando como resultado concentraciones similares intra y extracelularmente. Debido a que la célula tiene menos agua intracelular, el punto de congelación de la célula se reduce, por lo tanto hay menos formación de hielo intracelular, lo cual resulta benéfico ya que el hielo celular resulta en la muerte celular y por consiguiente una reducción de la fertilidad de la muestra de semen (Ávila-Portillo *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2009; Purdy, 2006).

Los crioprotectores penetrantes también causan reordenamiento de lípidos y proteínas, lo cual propicia a un aumento de la fluidez de la membrana, mayor deshidratación a bajas temperaturas y por ende, mayor capacidad para sobrevivir a la crioconservación. Dentro de este grupo encontramos al glicerol, metanol, etilenglicol, propilenglicol, 1-2 propanediol, butanediol, acetamida, y dimetil sulfóxido (Ávila-Portillo *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2009; Purdy, 2006).

2.21 Diluyentes de refrigeración

Hanmerstedt (1993) señala que los diluyentes de refrigeración son soluciones acuosas tamponadas, a las cuales se les añade una fuente de energía (fructosa, glucosa) y un crioprotector no penetrante, este puede ser opcional dependiendo del tiempo de refrigeración (leche descremada o yema de huevo) y de la temperatura. Algunos diluyentes de refrigeración incorporan agentes quelantes o antioxidantes de manera experimental, observándose con esto un aumento del porcentaje de fertilización *in vitro* en los diluyentes que incorporan en sí, composición catalasa y SOD (superóxido dismutasa). Los diluyentes deben de preservar la viabilidad espermática a una temperatura de +5°C o +15°C durante un mínimo de 6 horas.

2.21.1 Agua de coco

Nunes (1993) menciona que la utilización de agua de coco como diluyente, se ofrece como un método alternativo en la conservación de semen caprino. Dentro de las alternativas de los diluyentes pobres en fosfolípidos, también se ha comprobado que el agua de coco favorece a la conservación de semen caprino.

La movilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos del semen caprino refrigerado a +4°C con agua de coco son significativamente superiores a los obtenidos con leche. La supervivencia espermática esta alrededor de las 60 horas con agua de coco, versus 12 horas en un medio de leche, observándose un aumento en la fertilidad en las cabras inseminadas donde se utilizó agua de coco como diluyente, frente a las inseminadas con leche, así como un mayor número de nacimientos.

Balakrishnan y Neelakanta (1982), señalan que el uso de leche de coco como diluyente de conservación en semen caprino esta menos extendido debido a su mayor contenido de fosfolípidos. Esta alternativa también ha arrojado resultados satisfactorios tras su utilización.

2.21.2 Leche de vaca

Evans y Maxwell (1990) mencionan que, debido a las características seminales del macho cabrío, la utilización de leche de vaca como diluyente ha sido ampliamente utilizada. La leche de vaca puede emplearse tanto entera como descremada, pasteurizada UHT (temperatura ultra alta) o en polvo para reconstruir, siendo esta ultima la más universal. Excepto en el caso de la leche UHT, las demás formas de leche deben de ser calentadas hasta una temperatura de +92°C +95°C durante 8-10 minutos, sin llegar al punto de ebullición (tindalización), con el objeto de eliminar los factores tóxicos de su fracción proteica.

Guérin, (1990) señala que el diluyente más utilizado a base de leche descremada reconstituida en la refrigeración de semen caprino es el descrito por Corteel, (1981), con buenas propiedades conservantes a una temperatura de +15°C, aunque se muestra ineficaz a +5°C, siendo complicada su elaboración y conservación.

2.21.3 Yema de huevo

Según las investigaciones de Maxwell y Evans (1990), otra gran alternativa como crioprotector externo a la leche de vaca, lo constituye la yema de huevo de gallina. Los huevos deben de ser frescos, con no más de 4 días desde la puesta hasta el momento de su utilización. En el caso de no disponer de huevos frescos se puede utilizar yema de huevo deshidratada para la elaboración de los diluyentes (Montero *et al.*, 1995).

La utilización de yema de huevo utilizada para la conservación de semen caprino es menor que en otras especies (ovina, porcina), esto debido a las propiedades de la fosfolipasa A, que en presencia de calcio es capaz de hidrolizar las lecitinas de la yema de huevo en lisolecitinas y ácidos grasos libres (Chauhan *et al.*, 1990).

La cantidad de yema de huevo utilizada, varía según los autores. Siendo las concentraciones mayores utilizadas tras la eliminación del plasma seminal (Tabla 1).

Cuadro 1. Concentración de yema de huevo utilizada por distintos autores para la refrigeración de semen caprino

Diluyente	% de yema de huevo	Referencia
Tris Glucosa	1.5- 12	Salamon y Ritar , 1982
Tris Cítrico Glucosa	1.5-2.2	Ritar <i>et al.</i> , 1990
Tris fructosa	10	Azawi <i>et al.</i> , 1993
Tris Cítrico Fructosa	5	Stojanov <i>et al.</i> , 1994
Tris	2.5-18	Roca <i>et al.</i> , 1997

La incorporación de la yema de huevo se realiza sobre el volumen final del diluyente base, homogenizándose adecuadamente. Para eliminar las partículas gruesas se procede a la centrifugación del diluyente a 500 g (gravedad) durante 35 minutos.

2.22 Diluyentes para congelación

La posibilidad de almacenar dosis de semen por un tiempo indefinido para su posterior utilización, es una de las mayores ventajas que presenta la congelación dentro los programas de inseminación artificial.

En sus trabajos de investigación Deka y Ralo (1985); Singh *et al.* (1995); Salamon y Maxwell (1995) señalan que las causas de mayor mortalidad espermática durante la congelación, se debe al aumento de la concentración de sales, formación de cristales de hielo en el interior del espermatozoide, cambios en el pH, desnaturalización de proteínas y rotura mecánica de elementos estructurales, durante el periodo de cambio de estado. La protección de los espermatozoides durante el

descenso de la temperatura y la congelación se consigue mediante la incorporación de crioprotectores al diluyente base.

Deka y Ralo (1985); Salamon y Mawell (1995) afirman en sus investigaciones que el glicerol es el crioprotector más ampliamente utilizado debido principalmente a su capacidad tampón con las sales, minimizando el daño electrolítico y la formación de cristales de hielo. Salamon y Ritar (1982) señalan que la adición de glicerol en función de la concentración espermática muestra los mejores resultados post-descongelación.

La concentración de glicerol que se emplea en la preparación de los diluyentes varía según los autores, manteniéndose entre el 3 y el 11% (tabla 2).

Tuli y Holtz (1994) indican que dicha variabilidad depende principalmente del diluyente base empleado y su sistema de dilución, así como de la temperatura a la cual se añade dicho diluyente glicerado.

Los trabajos de investigación de Deka y Ralo (1986); Tuli y Holtz (1994) demuestran que los mejores resultados post-descongelación se obtienen tras la utilización de concentraciones intermedias de glicerol (4% y 6%).

Cuadro 2. Porcentaje de glicerol utilizado por distintos autores en los diluyentes de congelación de semen caprino.

% Glicerol	Diluyente	Referencia
3-11	Cítrico Glucosa	Chauhan <i>et al.</i> , 1990
4	Tris Glucosa	Pérez y Mateos, 1996
4	BesKOH	Dunner, 1991
4	Tris Cítrico Glucosa	Ritar y <i>et al.</i> 1990
4	Leche descremada	Singh <i>et al.</i> , 1995
6	Tris Cítrico Glucosa	Ritar <i>et al.</i> 1990
6	Tris Cítrico Glucosa	Salamon y Ritar, 1982
7	Tris Glucosa	Watson, 1995
8	Tris Cítrico fructosa	Berger, 1990
8	Tris Glucosa	Singh <i>et al.</i> , 1995

Salamon y Maxwell (1995); Tuli y Holtz (1994); Corteel (1981) señalan que la adición de glicerol se puede realizar en una o varias etapas y a una temperatura de +37°C, +22°C o +5°C. El efecto tóxico del glicerol es menor si se añade a +5°C, sin embargo, la velocidad de penetración también es menor, por lo que se tendrá que aumentar el tiempo de equilibración.

Salamon y Ritar (1982); Salamon y Maxwell (1995), demuestran en sus investigaciones que la adición de glicerol a temperatura ambiente permite una penetración más rápida del agente, si bien ejerce una acción más toxica sobre los espermatozoides al estar más tiempo en contacto con los mismos.

En su trabajo de investigación Fiser *et al.* (1981) indica que el aumento de la presión osmótica (PO) de los medios facilita la salida de agua al medio extracelular con el fin de equilibrar las concentraciones a ambos lados de la membrana plasmática, produciendo así un mayor grado de deshidratación en el espermatozoide y por

consiguiente reduciendo la formación de hielo en su interior, obteniendo así mejores resultados al momento de la descongelación.

2.23 Diluyentes comerciales más utilizados

2.23.1 Tris

Tris (hidroximetil amino metano), es un compuesto para preparar disoluciones tampón, se comercializa en sus formas básica (Tris base) y ácida (Tris hidrocloreuro). La primera es la de uso más común. El Tris es una solución buffer biológica, que se utiliza en todo proceso de extracción de ADN debido a que este es sensible al pH de cualquier tipo de fuente durante dicho proceso. La solución Tris se utiliza durante la lisis celular, la eliminación y la precipitación de componentes celulares no deseados para mantener un pH estable. (Compuesto Tris, <http://biomodel.uah.es/an/plasmido/0/comp.htm>).

Kozdrowski *et al.* (2007), evaluaron la motilidad espermática post-descongelación utilizando el medio Tris con la adición de yema de huevo al 20 y 1.5 %, reportando valores de 23 y 19 % de recuperación, respectivamente.

2.23.2 Citrato-yema

El citrato de sodio es un agente quelante, que fija sólidamente el calcio y otros iones metálicos y dispersa los glóbulos grasos de la yema de huevo, hasta el punto que pueden verse aisladamente los espermatozoides mediante un examen microscópico (Salisbury y Vandemark, 1964).

En un estudio realizado por Dubeibe *et al.* (2007) donde evaluaron diluyentes como el citrato de sodio y leche descremada más yema de huevo, obtuvieron valores de motilidad espermática post-descongelación a las 5 horas de 0.19 y 0 %, respectivamente.

2.23.3 Triladyl

Manufacturado por el laboratorio Minitube en Alemania, es un concentrado para la preparación de un diluyente listo para el uso de un solo paso, que está basado en el Tris (hidroximetil amino metano un amortiguador sintético), conteniendo agua destilada, glicerol, ácido cítrico y fructosa, además por cada 100 ml contiene los siguientes antibióticos: gentamicina 25 mg, tilosina 5 mg, lincomicina 15 mg y espectinomicina 30 mg (manual Triladyl, Minutube, 2017).

Vallecillo *et al.* (2004) evaluaron la motilidad individual post-descongelación de espermatozoides de bovino criopreservados usando Triladyl con 20 % de yema de huevo y centrifugado a 500 g (gravedad) por 6 minutos, obteniendo un valor de 60.5 % de recuperación espermática.

2.23.4 Universal de IMV

Elaborado por la compañía IMV en Francia, es un concentrado a dos pasos en el cual se debe preparar la porción glicerada y la no glicerada. Contiene buffer de iones hidrogenados, ácido cítrico y carbohidratos. También contiene un frasco con antibióticos, llamado 'antibióticos CSS' el cual equivale a 300 mg de gentamicina, 60 mg de tilosina, y 180/360 mg de lincospectina; y una botella con glicerol (manual universal de IMV, 1995).

2.23.5 Andromed

Es un diluyente manufacturado por la empresa Minitube en Alemania a base de lecitina de soya, de la nueva generación de medio androgénico libre de ingredientes de origen animal, para la congelación de semen. Este medio tiene ventaja sobre sus antecesores ya que ha logrado tasas de no retorno de hasta 2.6% mayores, que los diluyentes convencionales preparados a base de yema de huevo, (67.85% con los preparados a base de yema de huevo contra un 70.45% con diluyente sin yema de huevo), esto fue demostrado en un estudio de campo que se realizó por el centro de dermatología y andrología de la Universidad Justin Leibig de Giessen, Alemania. Para este estudio se compararon los porcentajes de retorno al celo de 20,000 vacas (10,000 vacas por grupo) inseminadas con eyaculados divididos y diluidos ya sea en diluyentes convencionales de tris-yema de huevo o andromed (Aires, 2003; Manual Andromed, Minitube, 2017).

2.24 Refrigeración de semen caprino

En sus investigaciones Fiser y Fairfull (1986); Mara *et al.* (2007); Cebrián *et al.* (2010) mencionan que el semen de pequeños rumiantes puede mantenerse en estado líquido a baja temperatura, puede ser entre 10 a 15°C o bien a 5°C (0-5°C). El principio es prolongar su capacidad fecundante al reducir su motilidad y metabolismo de forma reversible.

Cebrián *et al.* (2010); Ashrafi *et al.* (2011) señalan en sus trabajos de investigación que una vez diluido el semen a la concentración deseada, se debe llevar a una temperatura de 15°C o 5°C siguiendo una curva de enfriamiento de -0.2°C a -0.3°C/minuto. Este proceso suele realizarse mediante un baño termostatzado programable, en caso de no disponer de él, la refrigeración hasta 5°C puede hacerse colocando las muestras en un frigorífico o en un recipiente con hielo. Una vez que se alcanza la temperatura final, se envasa en pajuelas y se mantiene a esa temperatura hasta su uso, que se recomienda no pase de las seis horas.

2.25 Congelación de semen caprino

En sus investigaciones Salamon y Maxwell (1995); Anel *et al.* (2003); Cebrián *et al.* (2010) indican que el proceso de descongelación se realiza en dos etapas, la de enfriamiento y la de congelación. Un punto importante a considerar antes de iniciar el proceso de congelación, es el método de adición del crioprotector penetrante, ya que puede realizarse en uno o dos pasos. El glicerol puede añadirse directamente en el diluyente en una única etapa (método de un solo paso) o agregarse en una porción separada del diluyente, cuando la muestra diluida haya alcanzado los 5°C (método de dos pasos).

Con el propósito de valorar si existe alguna ventaja del método de dos pasos sobre el de un paso se han realizado varios estudios sin encontrarse diferencias; por lo tanto, se prefiere el uso del método de un solo paso, por su simplicidad y menor manejo del semen antes de la congelación (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Maxwell, 1995; Salamon y Maxwell, 2000).

Evans y Mawell (1990); Salamon y Maxwell (1995); Salamon y Maxwell (2000); Cebrián *et al.* (2010) señalan que la etapa de enfriamiento es un periodo de adaptación para los espermatozoides a un metabolismo reducido. El semen ya diluido se enfría hasta los 5°C, a una velocidad de unos -0.2°C a -0.4°C/minuto. Una vez que el semen diluido alcanza los 5°C, es recomendable mantenerlo a esta temperatura durante 1.5 a 2 horas, a este proceso se le conoce como equilibrado. En este periodo los espermatozoides permanecen en contacto con el glicerol antes de la congelación, permitiendo así que el glicerol penetre las células espermáticas y que se establezca un equilibrio entre la concentración intracelular y extracelular, no solo de glicerol, sino de todos los componentes osmóticamente activos.

En su investigación Cebrián *et al.* (2010) menciona que la congelación se realiza en vapor de nitrógeno líquido, ya sea de forma manual o mecanizada. Dorado *et al.* (2009); Balcázar y Porras. (2008) indican que en la congelación manual, la velocidad de congelación se regula por la distancia de las pajuelas o tubos a nivel del nitrógeno líquido (10°C a 100°C/minuto). Las pajuelas se exponen a los vapores de nitrógeno líquido (-80 a -100°C) durante 10 a 20 minutos y posteriormente se depositan directamente al nitrógeno líquido (-196°C).

En cuanto a la velocidad de congelación Cebrián *et al.* (2010) indica en su trabajo de investigación que se debe tener en cuenta, que si la velocidad es demasiado rápida, se formarán cristales de hielo intracelular, los cuales provocan serias lesiones y rotura de la membrana plasmática. Pero si sucede lo contrario, que la velocidad sea demasiado lenta, la formación de cristales de hielo comenzará en el exterior de la célula, produciendo la salida de agua del interior de la célula, como intento por compensar el aumento de la osmolaridad en el medio extracelular y la célula se deshidratara. Si bien, existe una velocidad optima de congelación, que será variable para cada especie y tipo de envase, dicha velocidad oscila entre -10°C y -80°C/minuto.

2.26 Proceso de descongelación

Evans y Maxwell (1990); Cebrián *et al.* (2010) Señalan en sus investigaciones que la descongelación es un punto muy crítico, siendo esta de suma importancia como el proceso de congelación para la supervivencia espermática. Aunados los daños ocasionados por la congelación, los espermatozoides se pueden deteriorar si el proceso de descongelación no se realiza de manera apropiada. Como norma general, entre más rápido se congele el semen, más rápido se debe descongelar, con fin de obtener una más rápida recuperación de los espermatozoides. El semen de macho cabrío congelado, se debe descongelar a una temperatura inferior a los 37°C. Las muestras pueden descongelarse ya sea a velocidad rápida o lenta. El ritmo de descongelación se incrementa con temperaturas elevadas (60-70°C). Cuando se

descongelan rápidamente las células están menos tiempo en contacto con los solutos y con el crioprotector, por ende, la restauración del equilibrio intracelular y extracelular es más rápida. Pero al usar altas temperaturas por poco tiempo, se corre con el riesgo de una exposición a temperaturas por encima del nivel crítico, que pueden ser fatales para las células. Lo más frecuente es descongelar el semen por inmersión en baño de agua a 35°C-37°C por un tiempo de 30 segundos o a una temperatura de 50°C durante 9 segundos.

III.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del área de estudio

Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de producción animal, así como en la unidad caprina de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Buenavista, al sur de la ciudad de Saltillo, Coahuila, la cual se ubica aproximadamente a 8 km. al sur de la ciudad de Saltillo, en las coordenadas terrestres 25°22'44" latitud norte y 101° 00' 00" longitud oeste, a una altura de 1743 msnm, con una temperatura media anual de 17.9°C y una precipitación media anual de 303.9mm (INEGI. <http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/mapadigital>).

3.2 Materiales

En campo:

- Sementales
- Tijeras
- Agua destilada
- Cinta métrica
- Protector para tubo de ensayo
- Tubo de ensayo graduado
- Toallas de papel higiénicas
- Lubricante
- Guantes para palpar
- Cono de látex
- Electroeyaculador automático (Electrojac)
- Jaula para sujetar al semental
- Cuerda para sujetar los sementales
- Caja de herramienta
- Microscopio

- Agitadores
- Gradilla
- Termómetro
- Baño maría
- Extensión eléctrica
- Multicontacto
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Hemocitometro
- Diluyentes
- Vehículo de transporte

En laboratorio:

- Microscopio
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Hemocitometro
- Mangeras de látex
- Gasa estéril
- Pajillas
- Matraz Earlen-meyer
- Probeta graduada
- Pipetas serológicas
- Pipetas Pasteur
- Espátula
- Baño maría
- Bascula analítica
- Lámpara de luz ultravioleta
- Papel filtro
- Frascos de vidrio

- Autoclave para esterilizar material
- Papel aluminio
- Cinta
- Agujas para maquina envasadora
- Envasadora de semen automática MRS 1 (I.M.V. 1980)
- Diluyentes

3.3 Sementales utilizados

Para la elaboración de este trabajo de investigación se utilizaron 5 sementales de diferentes razas, identificados con los aretes SINIGA: (05 00 42 5955, 05 00 42 5953, 05 00 42 3009, 05 00 29 3232, 80 78 61); siendo de diferente edad, circunferencia escrotal, condición corporal y peso.

El trabajo de laboratorio tuvo una duración de 20 días. Se siguió un esquema de colecta de 2 extracciones, con un intervalo de 4 días entre cada extracción, para obtener las muestras de semen suficientes para evaluar los 3 diferentes diluyentes, con un total de 20 pajillas cada uno.

3.4 Método de obtención de la muestra de semen

La obtención de la muestra de semen (eyaculado) se realizó a través de la técnica de electroeyaculación descrita por Morillo *et al.* (2012), Rangel (2007), Angelino (2009). Utilizando un electroeyaculador de corriente alterna que va conectado a una batería que transmite corriente eléctrica la cual estimula los diversos segmentos de las vías urogenitales del semental.

Se inmovilizó al animal en una jaula para evitar movimientos bruscos y que el propio semental se lesionara, una vez sujeto se procedió a recortar el pelo y el vellón

largo que rodea la vaina del prepucio, se lavó toda el área del prepucio con agua destilada y se secó con una toalla de papel higiénico para evitar la contaminación. Posteriormente se lubricó el electroeyaculador y se introdujo vía rectal del semental a una profundidad de 15 centímetros, procurando no lastimar la mucosa y las paredes internas del mismo.

Una vez introducido el electreyaculador por el recto del animal, se inició con los estímulos eléctricos con un intervalo de 2 segundos entre un estímulo y otro, el cual asciende gradualmente hasta 30 voltios.

Para recoger el semen se utilizó un colector, el cual estaba provisto de un embudo de hule látex, que lleva conectado un tubo de ensayo graduado y protegido con un aislante térmico para evitar que la luz solar y los cambios de temperatura puedan dañar a los espermatozoides.

3.5 Evaluación de la muestra de semen

La muestra de semen es mantenida en condiciones adecuadas a 35-37° C con la ayuda de un baño maría, teniendo mucho cuidado de no exponer a los espermatozoides a factores que afecten su viabilidad, como lo es: los cambios bruscos de temperatura, exposición prolongada a la luz solar, material sucio, y agitación brusca.

Para determinar si será óptima la calidad, para ser procesado se incluyeron varios parámetros a considerar como:

- Apariencia.
- Volumen.
- Motilidad.

- Concentración.

3.5.1 Apariencia

Esta se determina cuando el animal eyacula dentro del colector, donde se observa una masa de aspecto cremoso, muy densa, rica en zoospermos con un color blanquecino con tendencia a mate.

3.5.2 Volumen

Se mide directamente en el tubo colector, aunque es sabido que el volumen del eyaculado puede variar entre machos dentro de una misma especie.

3.5.3 Motilidad

La motilidad se determinó mediante el uso del microscopio y es subjetiva, ya que no existen aparatos que proporcionen una medida directa. Se determina en dos formas:

Movimiento masal.- se coloca una gota de semen en un portaobjetos limpio, seco y templado a 35-37°C, se cubre y se observa la onda de movimiento con el objetivo de 10x, la estimación de la motilidad de los espermatozoides se hace sobre la base del vigor o potencia de la onda, según esté o no presente dicho movimiento.

Movimiento individual.- se deposita una gota de semen diluido con una gota de citrato de sodio al 2.9% sobre un portaobjeto limpio y templado a 35-37°C, se coloca un cubreobjetos y se observa a través del microscopio, donde se valora el porcentaje de espermatozoides que son móviles (movimiento rectilíneo progresivo). Para este trabajo se aceptó semen con 50% de movimiento masal/individual como mínimo.

3.5.4 Concentración

La concentración es el número de espermatozoides por ml, esta determinación se realiza por medio de un hemocitometro o cámara de Neubauer y una pipeta para glóbulos rojos con una dilución de 1:200.

Para estimar la concentración se procedió de la siguiente manera, se montó la pipeta y la boquilla y se aspiró una muestra de semen hasta la marca 0.5ml y se adicionó colorante de anaranjado de metilo para facilitar los conteos por la inmovilización que presentan los espermatozoides. Una vez que el semen fué mezclado perfectamente con el colorante se contactó la punta de la pipeta con el borde de la cámara permitiendo que se deslizara el contenido por debajo del cubreobjeto hasta cubrir la superficie señalada y permitiendo un reposo de dos minutos (es importante mencionar que las primeras 4 o 5 gotas del extremo de la pipeta fueron desechadas), lo cual permite que los espermatozoides se sedimenten, posteriormente se colocó el hemocitómetro al microscopio con aumento de 10X , para realizar el conteo de espermatozoides, esta acción consistió en considerar el número de células presentes en los 4 cuadros extremos y uno central (de un total de 16 cuadros) de cinco cámaras del hemocitómetro, de tal forma que cada lectura obtenida se multiplico por 10 millones (factor de dilución) determinando así el número de espermatozoides por mililitro.

3.6 Preparación de los diluyentes a utilizar

La preparación de los diluyentes debe hacerse en un medio aséptico; por lo que el material utilizado en este trabajo fue esterilizado previamente.

3.6.1 Preparación del Triladyl con yema de huevo

El procedimiento para la preparación del diluyente consistió en mezclar 22.5 ml de agua bidestilada, 6 ml de concentrado Triladyl y 1.5 ml de yema de huevo, esta última proporción fue establecida considerando las recomendaciones contempladas en el manual de preparación para este diluyente, dado a que, para el semen caprino se requiere de una cantidad menor de yema de huevo, en comparación con el semen bovino y ovino. Proporcionalmente hablando, la yema de huevo representa para este caso el 5 % de la mezcla, el agua el 75 % y el 20 % de concentrado del Triladyl, el componente final contiene glicerol, ácido cítrico, fructosa, tampones y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina y Lincomicina).

Los pasos para la elaboración fue el siguiente, se depositaron los 6 ml de concentrado triladyl en un vaso de precipitado, posteriormente se agregó 22.5 ml de agua bidestilada. Seguido de esto se partieron dos huevos frescos de manera cuidadosa para separar la clara de la yema, la yema se colocó en un papel filtro, haciéndola rodar cuidadosamente sobre el para eliminar los restos de clara y de la membrana, la yema filtrada se colocó en un vaso de precipitado y con la ayuda de una pipeta se tomaron 1.5 ml de yema; en seguida se agregó la yema a la solución madre (concentrado Triladyl y agua destilada) y se procedió al mezclado general. Es importante respetar este orden en que se agregaron los componentes, para garantizar el 100% de las cualidades del diluyente.

La mezcla final se filtró con la ayuda de una gasa estéril, quedando listo el diluyente para su utilización.

Cuadro 3. Componentes y proporciones utilizadas en el diluyente Triladyl

COMPONENTE	PROPORCIÓN
Concentrado Triladyl	6.0 ml
Agua bidestilada	22.5 ml
Yema de huevo fresco	1.5 ml
Tilosina	5.7 mg/100ml
Gentamicina	28.6 mg/100ml
Espectinomicina	34.3 mg/100ml
Lincomicina	17.2 mg/100ml

3.6.2 Preparación de andromed

El diluyente Andromed se compone de 1 parte de concentrado (diluyente Andromed) y 4 partes de agua destilada, su preparación es sumamente fácil, dado que el concentrado Andromed ya contiene fosfolípidos, ácido cítrico, antioxidantes, glicerina y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina y Lincomicina).

Los pasos para su elaboración fueron muy sencillos, ya que se consideró la proporción de 1:4 (1 concentrado Andromed y 4 agua destilada) para preparar el volumen requerido de diluyente (30 ml), el procedimiento de elaboración se desarrolló de la siguiente manera, se midieron 6 ml de concentrado Andromed y 24 ml de agua destilada, ambas proporciones se temperaron a 35°C por medio de baño maría, para luego mezclarlas y agitarlas manualmente hasta homogeneizar por completo para su posterior utilización.

Cuadro 4. Componentes y proporciones utilizadas en diluyente Andromed

COMPONENTE	PROPORCIÓN
Concentrado Andromed	6.0 ml
Agua bidestilada	24.0 ml
Tilosina	5.7 mg/100ml
Gentamicina	28.6 mg/100ml
Espectinomycinina	34.3 mg/100ml
Lincomicina	17.2 mg/100ml

3.6.3 Preparación de Citrato de Sodio con yema de huevo

La preparación del citrato de sodio consistió en agregar 2.9 gramos de citrato de sodio en 100 ml de agua destilada, de esta solución se tomó el 80% del volumen y se complementó el otro 20% con yema de huevo fresco. La yema se colocó en un papel filtro, haciéndola rodar cuidadosamente sobre el filtro para eliminar los restos de albumina y clara, la solución madre y se mezcló con la yema de huevo y agito perfectamente. Una vez lista se dividió en 2 fracciones (fracción A y fracción B), y a la fracción B se le agregó un 5% de glicerol.

Se forman dos fracciones A y B del diluyente antes de recolectar el semen.

Fracción A: Buffer citrato de sodio 80%

Yema de Huevo 20%

3.8 Cálculos de dilución

Los cálculos de dilución se realizaron de la siguiente manera: para la determinación de células vivas se utilizó la siguiente formula.

$$CELULAS VIVAS= VOLUMEN X CONCENTRACION X \% DE MOTILIDAD$$

La determinación del número de pajillas se obtuvo de la siguiente manera:

$$\# \text{ de pajillas} = \frac{\# \text{ DE CELULAS VIVAS}}{MILLONES DE ESPERMATOZOIDES DESEADOS POR DOSIS}$$

La determinación de la cantidad de diluyente necesario para el procesamiento de semen se utilizó la siguiente formula.

$$CANTIDAD DE DILUYENTE = NUMERO DE PAJILLAS X 0.5 ML$$

Donde:

0.5 = volumen de la pajilla en ml.

Los medios nutritivos probados en este trabajo de investigación son los siguientes:

- Triladyl con yema de huevo.
- Andromed.
- Citrato de sodio con yema de huevo.

3.9 Gliceralización y equilibración

Una vez realizado los cálculos de dilución se procedió a realizar la mezcla de semen diluyente de la siguiente forma.

Para los diluyentes Andromed y Triladyl solo se procedió a darles el tiempo de equilibración, esto debido a que ambos diluyentes ya contienen glicerol en su composición, por lo que no es necesario agregarles.

Para el Citrato de Sodio, se procedió de la siguiente manera, el total calculado se dividió en dos partes iguales, las cuales corresponden a la fracción A y fracción B.

A la fracción A se adicionó el semen a la misma temperatura del diluyente (35°C), posterior a esta mezcla, se procedió a bajar la temperatura gradualmente a 5°C en un tiempo aproximado de 1.5 horas.

A la fracción B, la cual contiene el total de glicerol, se mezcló con la dilución anterior en dos partes iguales con un intervalo de 15 minutos entre uno y otro, ambas mezclas a una temperatura de 5°C para así iniciar el tiempo de equilibración.

El semen mezclado con el diluyente (fracción A y B) a 5°C se mantuvo así por un tiempo de 4 horas como mínimo para que el espermatozoide hiciera contacto efectivo con el diluyente (glicerol) y de esta manera quedara protegido para el proceso de congelación.

3.10 Envasado de semen

Posteriormente al tiempo de equilibración se procedió a envasar el semen diluido en pajillas francesas de 0.5 ml; con la ayuda de la maquina automática envasadora de semen "MRS 1 (I.M.V. 1980) todo esto a una temperatura constante de 5°C. De la misma manera el material utilizado para este procedimiento debio mantenerse a esta temperatura (5°C) y estar previamente esterilizado.

3.11 Congelamiento y almacenamiento de pajillas

Al llenar las pajillas mediante el envasado automático a 5°C, se procedió a colocar las pajillas en una rejilla para congelar a vapores de nitrógeno líquido (-80°C) durante un tiempo de 9 minutos, para de ahí pasarlos a almacenar al termo de nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C, donde se identifican en bastones dentro de las canastillas del termo donde son almacenadas.

3.12 Evaluación post-descongelación

La evaluación post-descongelación por cada diluyente utilizado se realizó al día 1 posterior del almacenamiento del semen diluido, otra a los 3 días, luego a los 6 días y finalmente a los 8 días, (se descongelaron 20 pajillas por diluyente) esto se hizo con la finalidad de observar el comportamiento de la recuperación espermática post-descongelación en relación con el tiempo, tratando de corroborar que este no afectará la recuperación espermática post-descongelación como lo menciona Guevara (1994) en su tesis de licenciatura. Se procedió a descongelar las pajillas en agua destilada a una temperatura de 35°C durante un lapso de 30 segundos, enseguida se observaron las muestras de semen procesado al microscopio y así se determinó el porcentaje de motilidad recuperada post-descongelación y de esta manera se evaluó el efecto del diluyente empleado.

3.13 Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 2 con 20 repeticiones.

Con la ayuda del programa estadístico de la Universidad Autónoma de Nuevo León de la facultad de agronomía de Olivares (1994).

Con el objetivo de saber cuál o cuáles diluyentes son diferentes, se procedió a realizar una prueba de medias para lo cual se aplicó la prueba de Tukey al 95% de confianza. Dado que esta prueba es una de las utilizadas debido a su alto grado de confiabilidad.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con este trabajo se buscaba conocer el porcentaje de motilidad recuperada de los espermatozoides de los caprinos en las fases de pre-congelación y post-descongelación con el uso de los diluyentes (Andromed, Triladyl y Citrato de sodio) empleados en esta investigación.

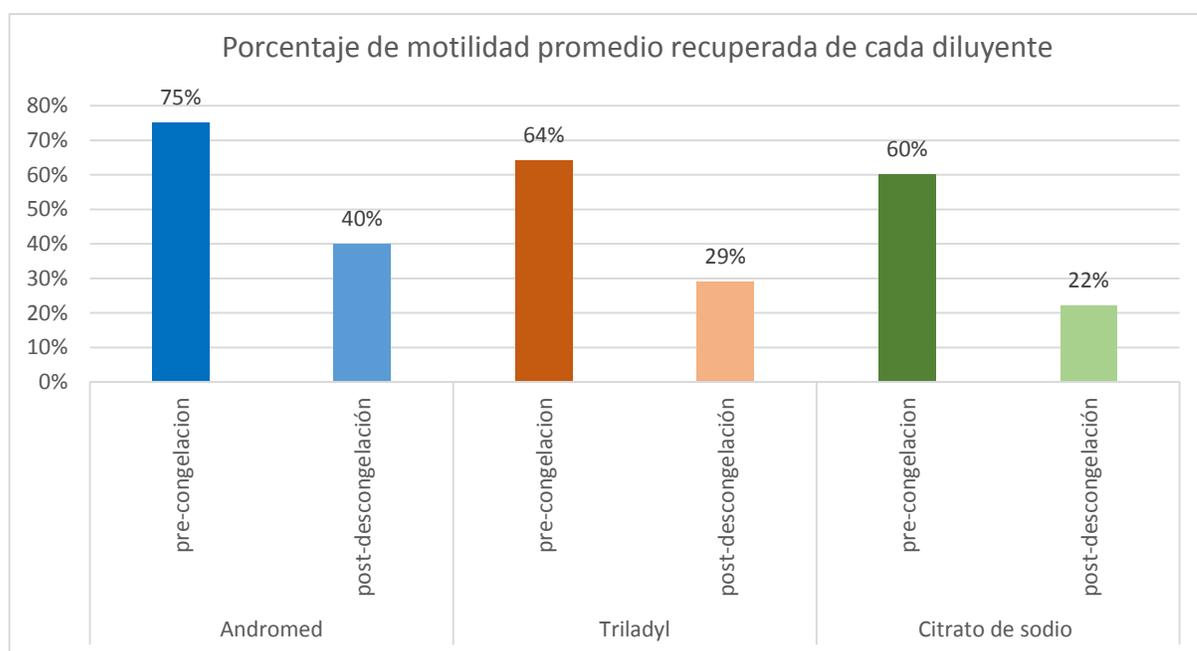
Los resultados de la evaluación en la fase de pre-congelación permitirán conocer la diferencia en el comportamiento del porcentaje de la motilidad espermática con respecto a la fase de post-descongelación de cada uno de los diluyentes.

Por su parte los resultados de la evaluación en la fase de post-descongelación, aunado a la menor diferencia entre porcentajes de motilidad observada en las dos fases (pre y pos), así como con el porcentaje de motilidad espermática del semen fresco, indicarán la o las respuestas del comportamiento entre los diluyentes, , Por lo que el mejor diluyente será aquel que presente el mayor porcentaje de motilidad espermática en la fase de la post-descongelación y la menor diferencia entre la motilidad observada en el semen fresco y en las dos fases (pre y post-descongelación), ya que esto podría mostrar el grado de adaptabilidad de los espermatozoides a los diferentes diluyentes.

Después de haber analizado los datos obtenidos en este trabajo, se pudo observar diferencia significativa (0.95) en la respuesta del porcentaje de motilidad espermática recuperada de los diluyentes empleados en esta prueba.

Como se mencionó previamente, la respuesta del porcentaje de recuperación de motilidad espermática se midió en dos momentos, uno en la fase de pre-congelación, y otro en la post-descongelación. Los resultados de las mediciones en la

primera fase muestran que el diluyente Andromed obtuvo una recuperación de motilidad espermática del 75%, el Triladyl del 64% y el Citrato de sodio el 60%, mientras que al hacer la medición en la fase de post-descongelación, la tendencia que se observó fue similar en el sentido de que el diluyente Andromed muestra una recuperación de motilidad espermática mayor que el Triladyl y el Citrato de sodio, dado a que los resultados obtenidos fueron del 40%, 29% y 22% en promedio respectivamente (gráfica 1).



Gráfica 1. Porcentaje de motilidad promedio recuperada de cada diluyente.

De acuerdo a los resultados presentados en la gráfica anterior y en base a los criterios previamente establecidos donde se determinó que el mejor diluyente será aquel que presente el mayor porcentaje de motilidad espermática en la fase de la post-descongelación aunado a la menor diferencia entre porcentajes de motilidad observada en las dos fases (pre y pos), así como con el porcentaje de motilidad espermática del semen fresco, permite determinar que, el diluyente Andromed presenta un mejor comportamiento de recuperación de motilidad espermática con relación a los diluyentes Triladyl y Citrato de sodio.

Cuadro 6. Diferencias entre el porcentaje de motilidad espermática recuperada de las fases de pre y post-descongelación referente al porcentaje de motilidad del semen en fresco.

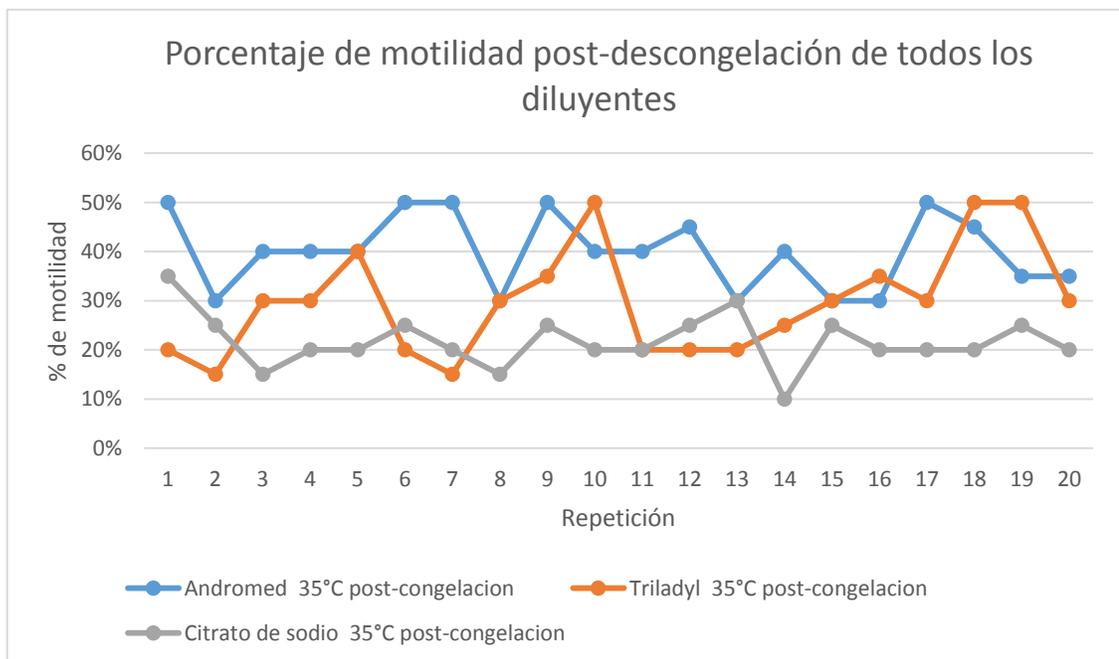
Motilidad de semen fresco (%)	Diluyente	Motilidad pre congelación (%)	Motilidad post-descongelación (%)	Diferencia de motilidad en fresco vs pre-congelación (%)	Diferencia de motilidad pre vs post (%)	Diferencia de motilidad en fresco vs post (%)
76	Andromed	75	40	1	35	36
76	Triladyl	64	29	12	35	47
76	Citrato de sodio	60	22	16	38	54

En este medio de conservación (Andromed) encontramos una mejor respuesta de supervivencia, esto probablemente se deba a su composición química y a los nutrientes disponibles para los espermatozoides y posiblemente también a que se encuentra libre de compuestos de origen animal como lo es la yema de huevo, dado que este componente afecta directamente la viabilidad del esperma. Este efecto ya ha sido evaluado por autores como Gacitua y Arav (2005), donde en su investigación mencionan el efecto de la enzima coagulante de la yema de huevo (EYCE) y la fosfolipasa secretada al plasma seminal por las glándulas bulbo-uretrales, la cual hidroliza la lecitina de la yema ocasionando un efecto tóxico para el esperma del macho cabrío.

Si bien, en esta investigación, el diluyente Andromed mostró ser sobresaliente en el porcentaje de recuperación de la motilidad espermática con respecto a los otros

dos diluyentes, sin embargo, en otras pruebas han demostrado respuestas similares del Triladyl con las que se obtuvieron en el presente trabajo con el Andromed, haciendo hincapié en que las especies animales empleadas en los otros estudios han sido diferentes (bovino y ovinos).

Carballo (2005), probó el diluyente Triladyl con semen bovino, y obtuvo resultados muy prometedores con una media de recuperación espermática de 30.95%. Por su parte Cruz (2014) en su tesis de licenciatura obtiene resultados favorables con el diluyente Triladyl obteniendo una recuperación espermática de semen bovino del 40%.

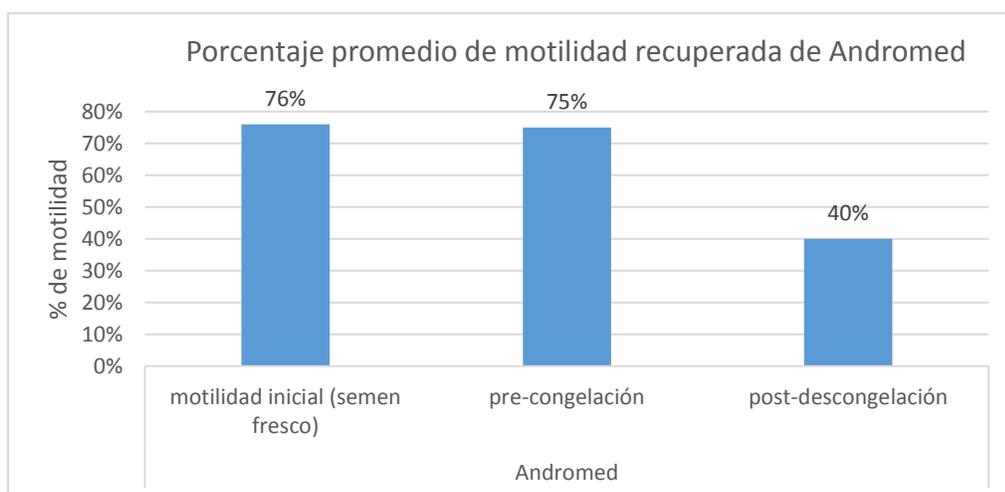


Grafica 2. Porcentaje de motilidad post-descongelación de cada uno de los diluyentes en el total de las pajillas evaluadas.

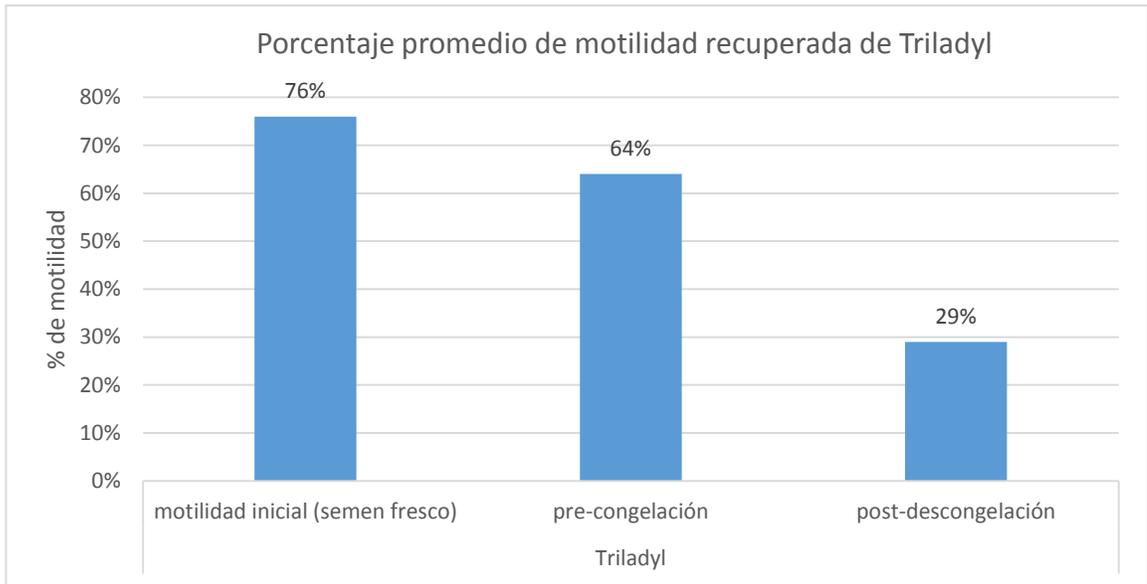
En la gráfica anterior (grafica 2), podemos observar el comportamiento que mostraron los tres diluyentes en torno a los porcentajes de recuperación de la motilidad

espermática en la fase de post-descongelación empleando cada una de sus respectivas muestras, en la cual se aprecia la superioridad en la respuesta del diluyente Andromed.

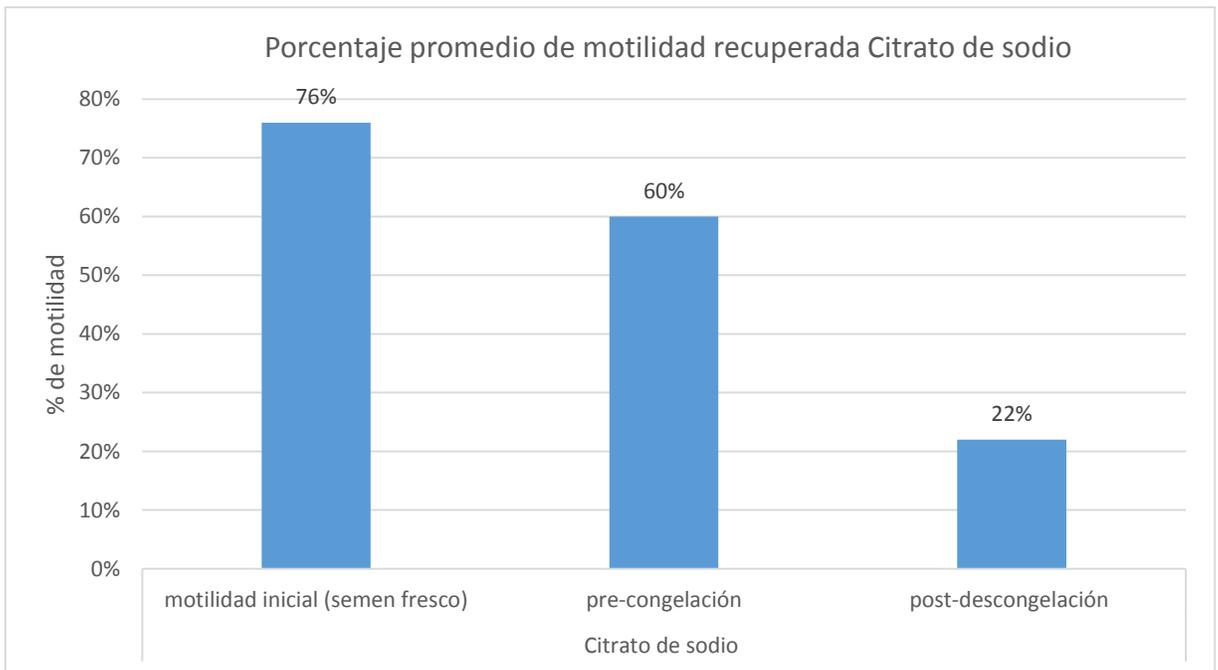
En las siguientes graficas (grafica 3, grafica 4, grafica 5) se observa el comportamiento de cada uno de los diluyentes usados en este trabajo de investigación con respecto al porcentaje de recuperación espermática que presentó cada uno en la fase de pre-congelación y post-descongelación.



Grafica 3. Porcentaje promedio de motilidad recuperada del diluyente Andromed



Grafica 4. Porcentaje promedio de motilidad recuperada del diluyente Triladyl.



Grafica 5. Porcentaje promedio de motilidad recuperada del diluyente Citrato de sodio-yema

V.CONCLUSIONES

Una vez realizado y analizado este trabajo de investigación podemos concluir que:

1. El diluyente Andromed fue superior al Triladyl y Citrato de Sodio al mostrar el mayor porcentaje de recuperación espermática en la fase de post-descongelación.
2. Se observó mejor comportamiento del diluyente Andromed al comparar las diferencias de los porcentajes de motilidad entre las fases de pre-congelación y pos-descongelación, así como con el porcentaje de motilidad espermática del semen fresco.
3. Con base en los resultados obtenidos en esta investigación, el diluyente Andromed es el que ofrece la mejor respuesta para el procesamiento de semen caprino.

VI. LITERATURA CITADA

- Abolanga** 2004 EME, Terada T. effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa Theriogenology.
- Ahdelhakeam** AA, Graham E.F., Vazquez I. & Chaloner K.M. 1991. Studies on absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen.
- Aires**, V.A. 2003. In vitro and vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extender for cryopreservation of bovine semen theriogenology.
- Amo** García. Et al. 1982. Manual sobre cabras Ed. Publicaciones de extensión agraria. Página 39-51. Obtenida de <http://cdigital.dgb.uanl.mx/la/1020082501/1020082501.PDF>.
- Anel L**, De La Paz P, Álvarez M, Chamorro CA, Boixo JC, Manso A, González M, Kaabi M, Anel E. 2003. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. Theriogenology.
- Angelino** Olivera, J. N. 2009. Manual de evaluación de semen en bovinos. Trabajo Práctico Educativo. FMVZ, Universidad Veracruzana. Veracruz, Ver., Méx. pp. 30-37.
- Arrebola**, 2012. Capítulo 13: Macho cabrío. Manejo y datos específicos. In: Ferre MLM, Ramos AJJ, Lacasta LD. Gestión integral del macho: en las explotaciones de ovino y caprino. España: ICE SALUD & Vet.: 150-166.

Ashrafi I, kohram H, Naijian H, Bahreini M, Mirzakhani H. 2011. Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa. *BMC Research Notes*.

Ávila-Portillo LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, Delgado LG, Gómez C, Lozano, JM, Reguero MT. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*.

Azawi OI, Dahash SY, Juma FT. 1993. Effect of different diluents on Shami goat semen. *Small Ruminant Res* 9: 347-352.

Balakrishnan P.P & Neelakanta C.P. 1982. Preservation of buck semen at room temperature in coconut milk extender. *Kerala Veterinary Science*.

Balcázar SJA, Porras AAI. 2008. Manual de prácticas en manejo reproductivo de ovinos y caprinos. Mexico: UNAM.

Barbas JP, Mascarenhas RD. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*.

Berger, T. 1990. Pisum sativum agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. *Theriogenology*, 33 (3): 689-695.

Blanco RA, García MJ. 2004. Capítulo 16: Aparato genital masculino. In: Vázquez OA, Blanco RA. *Tratado de historia veterinaria*. España: Masson. P 363-379.

- Bonadonna**, T. 1989. Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Tomo II. Primera edición. Ed. Hemisferio sur S. A.
- Bonet S**, Briz M, Pinart E, Sancho S, Garcia-Gil N, Badia E. 2000. Morfología espermática en porcino. España: Institut d'Estudios Catalans.
- Bonet S**, Martínez E, Rodríguez JE, Barrera X. 2006. Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino. España: Universidad de Girona. Red nacional de reproducción porcina.
- Bwanga**, C.O. 1991. Cryopreservation of boar semen. IA literature review, department of Obstretics and Gynecology. Swedish University of agricultural Sciences Uppsala, Sweden. Acta Vet Scan, 32, 4:431-453. Obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1818503>.
- Cabrera F**, Gonzalez F, Bastia M, Calero P, Medrano A, Gracia A. 2005. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*capra hircus*). Reproduction domestic and animal.
- Cancino** Aguirre, S. A. 2009. Comparación de la motilidad postdescongelado del semen bovino criopreservado mediante la utilización de la técnica manual y automática con el diluyente comercial One Step. Tesis Licenciatura. FMVZ, Universidad Veracruzana. Veracruz, Ver., Méx. p. 32.
- Cantú Brito J.E.** 1988. Zootecnia de ganado caprino capitulo IV, pagina 57-74.

- Cebrián** PJA, Muiño-Blanco MT, Perez-Pé R, Casao GA, Palacios RC. 2010. Capítulo 8: Manejo del semen e inseminación artificial. En: Abecia MA, Forcada MF. Manejo reproductivo en ganado ovino. España: Serevt. Pag: 113-144.
- Carballo**, G. D. M 2005. Comparacion de dos diluyentes comerciales para crioconservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo. Tesis. Univ. Veracruzana, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México.
- Castelo** TS, TR Frota, AR Silva. 2008. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Vet Bras* 2, 67-75.
- Chauhan** M.S. and Ananad S. 1990. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Teriogenology*.
- Compuesto** Tris. Obtenido de <http://biomodel.uah.es/an/plasmido/0/comp.htm>. (27/02/2018).
- Corteel** J.M. 1981. Collection, process mg and artificial insemination of goat semen. En: Goat Production Ed. Academic press Inc. London.
- Cupps**, P.T., 1991. Reproduction in Domestic Animals. 4th Edition, Academic Press Inc., San Diego, New York, Boston.
- Cruz** Solís Diego, 2014. Estudio comparativo de 3 diluyentes (Tris, Citrato de sodio y Triladyl en el procesamiento de semen bovino. Tesis. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. División de Ciencia Animal. Departamento de Producción Animal. Saltillo, Coahuila. México.

- Cseh S**, Faig V, Amiridis GS. 2012. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminant. *Animal reproduction science*; 130: 187-192.
- De Alba Jorge**. 1964. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A., Cornell University.
- Deka B.C. & Ralo NR**. 1985. Effect of glycerol and DM50 on sperm motility in frozen buck semen. *Ind. 1. Animal Science*.
- Deka B.C & Ralo A.R**. 1986. Effect of glycerol level in tris-based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. *Theriogenology*.
- De la Rosa Carbajal, Sebastián**. 2011 *Manual de producción caprina*. 1ª edición. Formosa.
- De la Vega A.C. y Wilde O.R**. 1991. Fundamentos biológicos de la criopreservación. *Rev. Arg. Prod. Animal* 11(2): 151-165.
- De paz P**, Mata-Campuzano M, Tizado JE, Alvarez M, Álvarez-Rodríguez M, Herrera P, Anel L. 2011. The relationship between ram sperm head morphometry and fertility depends on the procedures of acquisition. *Theriogenology*.
- Dorado J**, Hidalgo M, Muñoz A, Rodríguez I. 2009. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Animal reproduction science*.

- Duarte** Elías, C. C. 2008. Efecto de la aplicación de oxitocina sobre la calidad seminal en bovinos en el trópico húmedo. Tesis Licenciatura. FMVZ, Universidad Veracruzana. Veracruz, Ver., Méx.
- Dubeibe**, D., Pinzón, B.; Salazar, P. y Serrano, C. 2007. Comparación de dos diluyentes para el congelamiento de semen caprino de la raza santandereana. *Rev Col Cienc Pec*; 20:4, 535.
- Dunner S.** 1991. Utilización de productos zwitteronicos en la dilución, refrigeración y congelación del semen de macho cabrío. Tesis Doctoral. UCM, España.
- E. Quitet**, 1978. La cabra. Guía para el ganadero. Ed. Mundiprensa. Página 62-78. Obtenida de <http://cdigital.dgb.uanl.mx/la/1020082501/1020082501.PDF>.
- Evans G, Maxwell WMC.** 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. España: Acribia.
- Faigl V, Vass N, Javor A, Kulcsár M, Solti L, Amiridis G, Cseh S.** 2012. Artificial insemination of small ruminants- a review. *Acta Veterinaria Hungarica*; 60: 115-129.
- Fernández A, Gonzalvo MA, Clavero A, Ruiz de Assín R, Zamora S, Roldan M, Rabelo B, Ramirez JP, Yoldi A, Castilla JA.** 2009. Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. Artículo III.
- Fiser P.S. Ainsworth L & Lanoford G.K.** 1981. Effect of osmolarity skim milk diluents and thawing rate on cryosurvival of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 18.

Fiser PS, Fairfull RW. 1986. The effects of Rapid Cooling (Cold Shock) of ram semen. Photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing cryobiology.

French M.H. 1970. Observaciones sobre cabras. FAO: Estudios Agropecuarios 80. 234 p.

Furstoss V, Borderes F, Forgerit Y, Guillouet B, Leboeuf B. 2010. The value of the percentage of motile sperm in predicting a significant portion of the fertility variation of frozen-thawed buck semen. *Theriogenology*; 74: 1197-1206.

Gacitua, H. y Arav, H. 2005. Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen *Theriogenology*.

Garde JL., Aguado M.J., Perez S., Garrido D. y Vázquez I. 1995. Tecnología para la conservación de semen morueco. *Ovis*.

Garde, L.B, 1995. Congelación de semen en la especie ovina: características biológicas de las dosis congeladas. Tesis. Univ. Complutense de Madrid. España.

Gilmer JA, McGann LE, Ashworth E, Acker JP, Bush M, I. 1998. Fundamental cryobiology of selected African mammalian spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome resource banking. *Animal of reproduction science*; 53 (1-4):277-97.

Gorlach A. 1999. Transferencia de embriones en el Ganado vacuno. España, Acribia.

- Graham, J** 1996. Cryopreservation in stallion spermatozoa. *Vet. Clin. North. Ame.* 12:131-147.
- Greyling, J.P.C.**, 1988. Reproductive physiology in the Boer goat doe. Ph.D. Thesis, University of Stellenbosch, South Africa.
- Guerin Y.** 1990. Méthodes de conservation de la semence ovine. *Elevege & Insemination* 236.
- Guevara Juárez Evangelina.** 1994. Estudio comparativo de dos diluyentes (Tris, y Citrato de sodio) en el procesamiento de semen de carnero y su efecto en la temperatura y tiempo de descongelamiento. Tesis. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Division de Ciencia Animal. Departamento de Producción Animal. Saltillo, Coahuila. México.
- Gunalp S, Onculoglu C, Gurgan T, Kruger TF, Lombard CJ.** 2001. A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds. *Human reproduction.*
- Hafez B, Hafez ESE.** 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales; Ed. INTERAMERICANA Mc GRAW-HILL; ed. 7ª; México, D.F.
- Hafez E.S.E,** 1968. Reproducción de los animales de granja, editorial hemisferio, S.A Filadelfia, Pensilvania E.U.A.
- Hammerstedt R.H.** 1993. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of effect a desing of storage preservation systems. *Reproduction and fertility Development* 5.

- Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado JM.** 2007. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Animal reproduction science*.
- Hidalgo M, Rodríguez I, Pérez C, Dorado J, Sanz J, Sánchez M.** 2002. Parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide del macho cabrío. SEOC.
- Hidalgo PM.** 2004. Estudio del efecto de la congelacion-descongelacion sobre los parámetros morfométricos del espermatozoide de macho cabrío. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba. Córdoba.
- Holt WV.** 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal reproduction science*.
- Hunter, R.H.F.,** 1980. *Physiology and Technology of Reproduction in Female Domestic Animals*. Academic Press, London, NewYork.
- INEGI.** Georreferencia obtenida de <http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/mapadigital>. (27/02/2018).
- Instituto Nacional de Capacitación del Sector Agropecuario,** 1983. Inseminación artificial en ganado bovino, segunda parte. México D.F.
- Iritani A, Nishikawa Y, Nagasawa S.** 1964. Studies on the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen. VII Variations in the enzyme activity of the semen between breeding season and non-breeding season, and in each ejaculate collected three times successively. *Jap. Journal animal reproduction*; 10: 52-56.

Jiménez-Rabadán P, Ramón M, Garcia-Alvarez O, Maroto-Morales A, Del Olmo E, Perez-Guzman MD, Bisbal A, Fernández-Santos MR, Garde JJ, Soler AJ. 2012. Effect of semen collection method (artificial vagina vs electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculate. *Animal reproduction science*; 132: 88-95.

Jones JM, Bavister BD. 2000. Acidification of intracellular pH in bovine spermatozoa suppresses motility and extends viable life. *Journal of andrology*.

Koeslag J.H. 1982. Cabras. Manual para educación agropecuaria Área: producción animal SEP/Trillas México.

Kozdrowski, R., Dubiel, A., Bielas, W. y Dziecioł, M. 2007. Two Protocols of Cryopreservation of Goat Semen with the Use of Computer-Assisted Semen Analysis System. *Acta Vet. Brno*, 76: 601-604.

Kundu CN, Chakrabarty J, Dutta P, Bhattacharyya D, Ghosh A, Majumder GC. 2002. Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. *Reproduction*.

Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen from artificial insemination. *Animal reproduction science*; 62: 113-141.

Manual, 2017. Uso y preparación del diluyente Andromed, de laboratorios minitube.

Manual, 2017. Uso y preparación del diluyente Triladyl, de laboratorios minitube.

- Manual**, 1995. Uso y preparación del diluyente universal IMV, de laboratorios universal de IMV.
- Mara L**, Dattena M, Pilichi S, Sanna D, Branca A, Cappani P. 2007. Effect of different diluents on goat semen fertility. *Animal reproduction science*.
- Martin-Rillo MS**, Martinez, E. Garcia, A. C., De Alba, C. 1996. Boar semen evaluation in practice. *Reproduction in domestic animal*; 31:519-526.
- Mc. Donald LE**. 1991. *Endocrinología veterinaria y reproducción*. Edit interamericana. México. Cuarta edición.
- Maroto-Morales A**, Ramon M, Garcia-Alvarez, Soler AJ, Estes MC, Martinez-Pastor F, Perez-Guzman MD, Garde JJ. 2010. Characterization of ram (*ovies aries*) sperm head morphometry using the sperm-class analyzer. *Theriogenology*.
- Maxwell W.M.C y Evans**. 1990. *Inseminacion Artificial de ovejas y cabras*. El Acribia S.A. (Madrid). Can. 34.
- Memmon M.A & OTT, RS**. 1981. Methods of semen preservation an artificial insemination in sheep and goats. *Animal Reoproduction*.
- Mocé E**, Purdy PH, Graham JK. 2010. Treating ram sperm with colesterol-loaded cyclodextrins improvers cryosurvival. *Animal reproduction science*.

- Molina F.C.**, Evans O. Quintana P. & Maxwell W.M.C. 1990. Effect of mono-and disaccharides in tris-based diluents on motility of pellet-frozen mm spermatozoa. Proceedings Australian of Society Reproduction Rial.
- Montero N.**, Cortes 5, Tome A. y Vazquez 1. 1995. Yema de huevo desecada como crioprotector alternativo del semen ovino. VI Jornadas sobre producción animal. Vol. Extra. 16-Tomo 1.
- Morillo, M.**, Salazar, S. y Castillo, E. 2012. Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. Maracay, VE, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. pp. 23-28.
- Muiño-Blanco T**, Perez R, Cebrián-Perez JA. 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in domestic animals*: 43 (Suppl. 4):18-31.
- Nunes J.F.** y Flores Salles MG. 1993. El agua de coco (*cocas nucifera*) como diluyente del semen caprino. *Revista Científica. FCV-LUZ III* (3).
- Olivares Sáenz Emilio.** 1994. Paquete de diseños experimentales FAUANL. Versión 2.5. Facultad de agronomía UANL, N.L.
- Park C.S.**, Yang M.H., Hwang D.S., Lee KS. & Seo KW. 1989. Study on fresh and deep-frozen storage pf Korean native goat spermatozoa. *Korean Journal of Animal Science*.

- Perez Fuentes J. y Alcaide M.** 1993. Vitalidad y congelación del esperma del morueco de raza Manchega. Efecto de la presión osmótica y de la concentración del glicerol en el diluyente. Mundo Gadero.
- Pérez B, Mateos E.** 1996. Effects of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malagueña breeds. Small Ruminant Res 22: 163-168.
- Petrunkina AM, Harrison RAP.** 2011. Cytometric solutions in veterinary Andrology: Developments, Advantages, and limitations. Cytometry Part A; 79A: 338-348.
- Petrunkina AM, Harrison RAP.** 2013. Fluorescence technologies for evaluating male gamete (dys) function. Reproduction domestic animals 11-24.
- Polge, C.; Smith, A.U.; Parkes, A.S.** 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature, v. 164, p. 666.
- Purdy PH.** 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Small ruminant research.
- Rangel P.L.E.** 2007. Evaluación de la salud de sementales bovinos. Reproducción bovina, FMVZ-UNAM.
- Rasul Z, Anzar M, Jalali S, Ahmad N.** 2000. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. Animal Reproduction science.

- Reece WO.** . 2010. Capítulo 38: Reproduccion del macho en mamíferos. In: Dukes fisiología de los animales domesticos. 12^a ed. España: Acribia.
- Ritar A.J.**, Ball P.D & O'MAY Pi. 1990. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reproduction and fertility Development*.
- Ritar A.J.** & Ball P.D. 1993. The effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at a big density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination. *Animal Reproduction Science*.
- Roca J**, Carrizosa JA, Campos I, Lafuente A, Vázquez JM, Martínez E.1997. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Ruminant Res* 25: 147–153.
- Rodriguez-Martinez H.** 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia. *Reproduction domestic animals* 312-318.
- Salamon S**, Maxwell WMC. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal reproduction science*.
- Salamon S**, Maxwell WMC. 2000. Storage or ram semen. *Animal reproduction science*.
- Salamon S.** & Ritar A.3. 1982. Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluents composition and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Australian Journal of Biology science*.

- Salisbury G. W.** y **N. L. Vandemark**, 1964. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bovinos. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Sancho S**, Vilagran I. 2013. Capítulo 9: The boar ejaculate: sperm function and seminal plasma analyses. In: Bonet S, Casas I, Holt WV, Yeste M. Boar reproduction fundamentals and new biotechnological trends. Springer, Pag: 471-516.
- Singh M.P.**, Sinha A.K. & Singh B.K. 1995. Effect of cryoprotectants in certain seminal attributes and en the fertility of buck spermatozoa. Theriogenology 43.
- Smith**, M.C., 1980. Caprine reproduction. In: Morrow, D.A (Ed.), Current therapy in theriogenology diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London.
- Stojanov T**, Rhodes SL, Maxwell WMC, Evans G. 1994. The effect of antioxidants on the fertilising capacity of chilled-stored ram spermatozoa. J Reprod Fertil 13.
- Tuli R.K** & Holtz W. 1994. Effect of glycerolizatién procediture and removal of seminal plasma en post-thaw and GOT-release from bear goat spermatozoa. Theriogenology 42.
- Vallecillo**, A.; Trigo, P.; Delgado, J.; Cabello, A.; Santos, E. y Tenorio, T. 2004. Effects of cryopreservation on sperm motility in blanca serrana andaluza goat. South African Journal of Animal Science, 34: 116-118.
- Vera** Garza Telésforo, 1993. Universidad Autonomía de Nuevo León, centro regional de fomento agropecuario. Reproducción de ganado caprino.

Villemure M, Lazure C, Manjunath P. 2003. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reproductive biology and endocrinology*.

Watson PF, Martin ICA.1976. Artificial insemination of sheep. The effect of semen diluents containing egg yolk on the fertility of ram semen. *Theriogenology*.

Watson PF, 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawin function. *Reproduction and fertility development*; 7: 871-891.

Wrobel KH, Bergmann. Chapter 12. 2006: Male reproductive system. In: Eurell JA, Frappier BL. Dellmann's editors. *Textbook of veterinary histology*. 6a ed. EU: Blakwell. P 233-255.

Yániz JL, Vicente-Fiel S, Capistros S, Palacin I, Santolaria P. 2012. Automatic evaluation of ram sperm morphometry. *Theriogenology*.