

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Efecto del diluyente y duración de almacenamiento a 4 °C sobre la motilidad del semen caprino.

POR

JOSÉ VÍCTOR VARGAS CARRILLO

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA

JUNIO DE 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Efecto del diluyente y duración de almacenamiento a 4 °C sobre la motilidad del semen caprino.

POR
JOSÉ VÍCTOR VARGAS CARRILLO

TESIS

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

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

PRESIDENTE:



DR. FRANCISCO GERARDO VELÍZ DERAS

VOCAL:



DR. PEDRO ANTONIO ROBLES TRILLO

VOCAL:



DR. OSCAR ANGEL GARCIA

VOCAL SUPLENTE:



M.C. ALAN SEBASTIAN ALVARADO ESPINO



MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



TORREÓN, COAHUILA

JUNIO DE 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

Efecto del diluyente y duración de almacenamiento a 4 °C sobre la motilidad del semen caprino.

**POR
JOSÉ VÍCTOR VARGAS CARRILLO**

TESIS

**QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

ASESOR PRINCIPAL:



DR. FRANCISCO GERARDO VELÍZ DERAS

ASESOR:



DR. PEDRO ANTONIO ROBLES TRILLO

ASESOR:



DR. OSCAR ANGEL GARCIA



**MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal**

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna**, “Mi ALMA TERRA MATER” por ser como mi casa y cobijarme y darme refugio para realizar mis sueños dándome la oportunidad de culminar esta maravillosa carrera.

A mi asesor principal

Dr. Francisco Gerardo Veliz Deras por haberme dado la oportunidad de ser partícipe de su proyecto para realizar mi tesis de titulación.

A mis coasesores

MC. Alan Sebastián Alvarado Espino por darme la oportunidad de trabajar en su proyecto y la confianza que me brindo.

Dr. Óscar Ángel García por la motivación, confianza y dedicación en este proyecto.

A mis Amigos:

Tomas, Daniel, Alberto, Jesús, Octavio, por todos los momentos que pasamos juntos y su apoyo incondicional que me brindaron durante esta etapa de mi vida.

DEDICATORIA

A Dios, agradezco infinitamente que me haya dado la vida y salud para poder salir adelante siempre en las buenas y en las malas, así como la oportunidad de poder alcanzar mis metas.

A mis padres, Zenón Vargas Navarrete y Nohemí Carrillo Gallegos, a ustedes les dedico estas palabras como un pequeño reconocimiento por su esfuerzo y apoyo incondicional que me han brindado en el transcurso de mi vida y ser parte fundamental en el cumplimiento de mis metas, por haberme enseñado a ser una persona de bien con sus enseñanzas, ejemplos y todos sus consejos que me brindaron.

A mis hermanos, Basilio, María Natividad, Damián, Lulú, María Remedios, Natividad, por todo su apoyo y cariño que me han brindado a lo largo de la vida y ser parte fundamental en cada proyecto de mi vida.

A mis abuelos, Daniel, Natalia, Práxedes y Arnulfo por todos sus consejos y apoyo brindado siempre

A mi esposa, Diana Leydivet, la persona que quiero mucho y por su apoyo incondicional en cada momento.

A mi hijo, Víctor Daniel, por ser uno de los motores de mi vida para seguir adelante.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto de dos diluyentes a base de yema de huevo o leche descremada sobre la motilidad del semen caprino almacenado a 4 °C por 96 h. El estudio se realizó en una granja de cabras de la raza Alpino-Francés con manejo intensivo localizado en el norte de México (25° N, 103° O). Se utilizaron cuatro machos adultos (1 Saneen; 3 Alpino-Francés, de 2 a 5 años de edad) durante la época de actividad sexual (otoño-invierno). El semen fue recolectado con una vagina artificial (VA) y se utilizó una hembra en celo como estímulo para realizar la colecta la cual, fue realizada por el mismo técnico, y solo aquellos eyaculados con una motilidad ≥ 3.0 (escala 0-5), concentración de $>2.5 \times 10^6$ células/mL y $>85\%$ de espermatozoides vivos fueron considerados para el experimento. Después de la evaluación del semen, cada eyaculado fue dividido en dos partes iguales, una fue diluida con Citrato de Sodio (Na) y yema de huevo (YemaBE) y la otra en leche descremada (LecheBE). La motilidad espermática después de adicionar el diluyente (0 h) fue similar para ambos (4.5 ± 0.47 ; $P=1.0$). Dos horas después, se observó una tendencia en la disminución de la motilidad espermática en el semen diluido con LecheBE que con YemaBE (3.0 ± 0.9 vs 4.25 ± 0.50 , respectivamente; $P=0.06$). Conforme el semen se almacena por más tiempo la motilidad disminuye gradualmente sin importar el diluyente empleado y se acrecienta después de 24 h de almacenamiento a 4° C. Se concluye que el semen caprino puede ser conservado a 4° C con citrato-yema de huevo o leche descremada por 24 h. Sin embargo, después de este tiempo la motilidad disminuye.

Palabras clave: Espermatozoides; Conservación; Cabras; Época reproductiva;

Diluyente

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
RESUMEN.....	iii
LISTA DE CUADROS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
CUADRO DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis.....	3
1.2 Objetivo.....	3
2. Revisión de literatura.....	4
2.1. Importancia de la caprinocultura.....	4
2.2 Función sexual del macho cabrío.....	5
2.2.1 Anatomía del aparato reproductor.....	5
2.3 Factores que influyen en la producción y calidad del semen.....	10
2.4 Conservación del semen.....	15
2.5.1 Diluyentes y dilución del semen.....	16
2.5.1.1 Diluyentes empleados en caprinos.....	16
2.5.1.2 Dilución de semen y concentración.....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1 Localización, animales y manejo.....	20
3.2 Recolección de semen y evaluación inicial.....	20
3.4. Análisis del semen.....	23
3.4.1 Motilidad en masa.....	23
3.5 Análisis estadístico.....	23
4. RESULTADOS.....	24
5. DISCUSIÓN.....	26
6. CONCLUSIÓN.....	28
7. LITERATURA CITADA.....	29

LISTA DE CUADROS

		Pagina
Cuadro 1	Sistema de puntuación de la motilidad en masa del eyaculado	11
Cuadro 2	Composición de los principales diluyentes empleados	19
Cuadro 3	Parámetros espermáticos de los machos empleados en el estudio al momento de la colección del semen con vagina artificial durante la estación reproductiva	24
Cuadro 4	Efecto del tipo de diluyente y el tiempo de almacenamiento sobre la motilidad espermática (0-5) del semen caprino colectado con vagina artificial durante la estación reproductiva	24

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Control endocrino de la espermatogénesis.	8
Figura 2	Representación esquemática de la espermatogénesis.	9
Figura 3	Diagrama del procedimiento experimental, que incluye la recolección del semen, la evaluación macro y microscópica inicial, los diluyentes empleados y el tiempo de almacenamiento y evaluación a 4°C.	22
Figura 4	Efecto del tiempo de almacenamiento (0, 2, 24, 48, 72 y 96 h) a 4° C sobre la motilidad del semen caprino durante la estación reproductiva.	25

CUADRO DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

SIMBOLO Y/O ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
T	Testosterona
=	Igual
DE	Desviación Estándar
Kg	Kilogramo
μg	Microgramo
IA	Inseminación artificial
VA	Vagina artificial
mL	Mililitro
%	Porcentaje
<	Menor que
>	Mayor que
<i>P</i>	Probabilidad
<i>et al</i>	y colaboradores
°	Grado
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
LH	Hormona luteinizante

FSH	Hormona folículo estimulante
I	Inhibina
YemaBE	Diluyente a base de yema de huevo
LecheBE	Diluyente a base de leche
PC	Proteína cruda
G	Gramo
DMSO	Dimetilsulfoxido
EE	Estimulación Eléctrica
°C	Grados Celsius o centígrados
THI	Índice temperatura-húmeda
H	Hora
E	Estrógenos
ABP	Proteína ligadora de andrógenos
CE	Concentración espermática
ME	Motilidad espermática
≤	Menor o igual
≥	Mayor o igual
VE	Volumen eyaculado

INTRODUCCIÓN

México cuenta con aproximadamente 8.6 millones de cabras, existiendo una disminución en el inventario desde el 2004 (SIAP, 2013). Esto nos convierte en el segundo país con mayor número en el continente americano solo después de Brasil y el 21 a nivel mundial (FAOSTAT, 2013). En cuanto a producción de leche, en México se generan 150 mil toneladas de leche anualmente y 77 mil toneladas de carne (SIAP, 2013). En nuestro país, la caprinocultura se concentra en las regiones áridas y semiáridas, las cuales ocupan 128 millones de Ha, lo que representa gran parte del territorio mexicano y donde vive cerca de la mitad de la población y es en estas regiones, donde contribuye de manera considerable a la economía de los agricultores (Escareño *et al.*, 2012).

Una de las formas para incrementar la producción y los ingresos de los productores es a través del uso de la inseminación artificial (IA). Esta, permite optimizar el uso de machos genéticamente superiores, que en turno puedan aumentar la producción de leche, pelo y carne (Lebouef *et al.*, 2000). La criopreservación del semen a bajas temperaturas (-196° C) permite almacenar el semen por periodos prolongados y transportarlo a regiones distantes (Ahmad *et al.*, 2015). Sin embargo, este proceso es costoso y cerca de la mitad de las células mueren durante el procedimiento (Lebouef *et al.*, 2000; Ahmad *et al.*, 2015). Otra alternativa es utilizar semen líquido almacenado entre 0-5° C permitiendo el uso del semen por un periodo más prolongado que con semen fresco (Menchaca *et al.*, 2005; Goericke-Pesch *et al.*, 2012).

Los diluyentes más empleados para conservar el semen en caprinos son a base de yema de huevo adicionando glucosa y un amortiguador como Citrato de Sodio (Na)

o TRIS y leche descremada (Cseh *et al.*, 2012). La sobrevivencia *in vitro* y la fertilidad de los espermatozoides refrigerados y almacenados con los diluyentes antes mencionados llega a ser de 5 a 72 h (Leboeuf *et al.*, 2000; Mara *et al.*, 2007). Otro de los diluyentes para conservar el semen en caprinos es el elaborado a base de leche descremada (Leboeuf *et al.*, 2003). La leche aporta a los espermatozoides energía y a través de su fracción proteica (caseína) protege a las células del choque térmico (Manjunath, 2012). Este diluyente es capaz de conservar el semen por 24 h a 4°C (Mara *et al.*, 2007). Por lo anterior, conservar el semen a 4° C puede ser una ventaja y una alternativa en programas reproductivos para las granjas caprinas y lograr tener animales de alto valor genético a través de la inseminación artificial (IA) en la Comarca Lagunera.

1.1 Hipótesis

La motilidad del semen caprino almacenado a 4° C se verá afectada por el tiempo de almacenamiento pero no por el tipo de diluyente empleado.

1.2 Objetivo

Comparar el efecto de dos diluyentes a base de yema de huevo o leche descremada sobre la motilidad del semen caprino almacenado a 4° C por 96 h.

2. Revisión de literatura

2.1. Importancia de la caprinocultura

Las cabras fueron la primera especie domesticada como ganado hace aproximadamente 8000 años A.C. En el territorio que hoy ocupan los países de Iraq e Irán (Hatziminaoglu y Boyazoglu, 2004). Durante siglos, los humanos han utilizado a las cabras para obtener leche, carne, fibras y pieles bajo diferentes condiciones, por lo que tienen gran importancia a nivel mundial debido a su contribución económica en las áreas rurales de los países en desarrollo, contribuyendo de manera sustancial al mantenimiento de las familias (Dubeuf *et al.*, 2004).

En México, la principal forma de producción caprina es el pastoreo en tierras comunales o sistema extensivo, donde las cabras se alimentan durante todo el año sin ningún tipo de suplementación (Mellado *et al.*, 2003). Este sistema es la base de la producción de leche de cabra, sin embargo, presenta poco nivel de tecnificación y asistencia técnica (Escareño-Sánchez *et al.*, 2011). Además, debido a la estacionalidad en la actividad sexual de los caprinos, hay estaciones del año donde la producción de leche excede a la demanda y como resultado, los productores enfrentan problemas para comercializar el producto, lo que dificulta la producción de lácteos a gran escala (Escareño *et al.*, 2012).

2.2 Función sexual del macho cabrío

2.2.1 Anatomía del aparato reproductor

Los testículos son los órganos principales de la reproducción en el macho, los cuales tienen dos funciones esenciales que son la gametogénesis y esteroidogénesis, ambas reguladas por el sistema endocrino. Los principales componentes del aparato genital del macho incluyen el pene, escroto y los testículos, epidídimo, conducto deferente y glándulas sexuales accesorias, las cuales son: ámpulas, próstata, bulbouretrales (Cowper) y vesículas seminales (Reece, 2005). Una característica distintiva en el pene de los pequeños rumiantes es la presencia de un apéndice filiforme llamado proceso uretral, el cual se proyecta 3 a 4 cm de la uretra. Además, otra característica particular en los rumiantes es la estructura de su pene el cual es fibroelástico y presenta una flexura sigmoidea (Grossman y Getty, 1982). En los caprinos, la posición que guardan los testículos es ventral. Los testículos descienden de la cavidad abdominal durante la vida fetal o posnatal, esto con el fin de mantener la temperatura testicular entre 4 a 7° C menor a la temperatura corporal. Este mecanismo de regulación térmica está a cargo del escroto el cual presenta glándulas sudoríparas que asisten en el enfriamiento por evaporación, el músculo cremáster al subir o bajar los testículos ya sea que la temperatura sea baja o alta respectivamente y el plexo pampiniforme, una red de múltiples venas que rodean a la arteria testicular generando un sistema de contra-corriente de intercambio de calor enfriando la sangre de la arteria testicular antes de que esta alcance el testículo (Reece, 2005).

2.2.2 Control endocrino

El control endocrino está influenciado por diversos cambios en la secreción de hormonas hipotalámicas como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), hormonas de la adenohipófisis; Hormona Luteinizante (LH) y Folículo estimulante (FSH) y hormonas secretadas por el testículo como los andrógenos e inhibina (Roser, 2001). La GnRH es secretada por el hipotálamo dentro del sistema porta-hipofisario alcanzando la hipófisis anterior provocando la secreción pulsátil de LH y FSH (Amann y Schanbacher, 1983). La LH estimula la secreción de Testosterona (T) por las células intersticiales (de Leydig). La secreción de LH está controlada por la interacción entre la GnRH y testosterona (Figura 1). El incremento de los niveles séricos de T provee una retroalimentación negativa en el hipotálamo y suprime la secreción pulsátil de GnRH y por consiguiente la secreción de LH de la hipófisis anterior provocando una disminución en la concentración de T (Amann y Schanbacher, 1983). La FSH estimula la división celular del epitelio germinal, principalmente en el animal pre-puberal, así como el metabolismo de los andrógenos y la proteína ligadora de andrógenos (ABP) (Pineda y Dooley, 2003).

2.2.3 Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso de división celular y diferenciación mediante el cual el macho produce los espermatozoides (figura 2). Este proceso se lleva a cabo en los túbulos seminíferos de los testículos en estrecha relación con las células de Sertoli (Ross y Pawlina, 2007), . La espermatogénesis se divide

en dos fases llamadas *espermatocitogenesis* que representa la fase proliferativa en la que las espermatogonias se dividen por mitosis seguida por divisiones meioticas generando las células haploides (espermatidas) y en *espermiogenesis* que es la fase de diferenciación celular, donde el núcleo y el citoplasma de las espermatidas se transforma generando la forma característica del espermatozoide (Pineda y Dooley *et al.*, 2003).

La espermatocitogénesis inicia con la división mitótica de las espermatogonias. Éstas, son las células más inmaduras en el testículo e incluyen las espermatogonias tipo A, intermedias (solo presentes en roedores) y tipo B (O'donnell *et al.*, 2006). Las espermatogonias experimentan numerosas divisiones mitóticas para generar células germinales de reserva, disponibles para la producción de espermatozoides mientras que otras se transforman en espermatogonias intermedias y posteriormente en tipo B (Pineda y Dooley *et al.*, 2003). Estas últimas se dividen para formar los espermatocitos primarios los cuales entran en meiosis, formando los espermatocitos secundarios y finalmente las espermatides (Amann y Schanbacher, 1983; Figura 2). La formación de las espermatides marca el final de la espermatocitogénesis y el inicio de la espermiogenesis.

La espermiogénesis (también conocido como espermioteliosis) comienza en los túbulos seminíferos y finaliza en el epidídimo (Pineda y Dooley *et al.*, 2003). Durante esta fase se forman dos estructuras de suma importancia para la funcionalidad del espermatozoide, el acrosoma y el flagelo (O'donnell *et al.*, 2006).

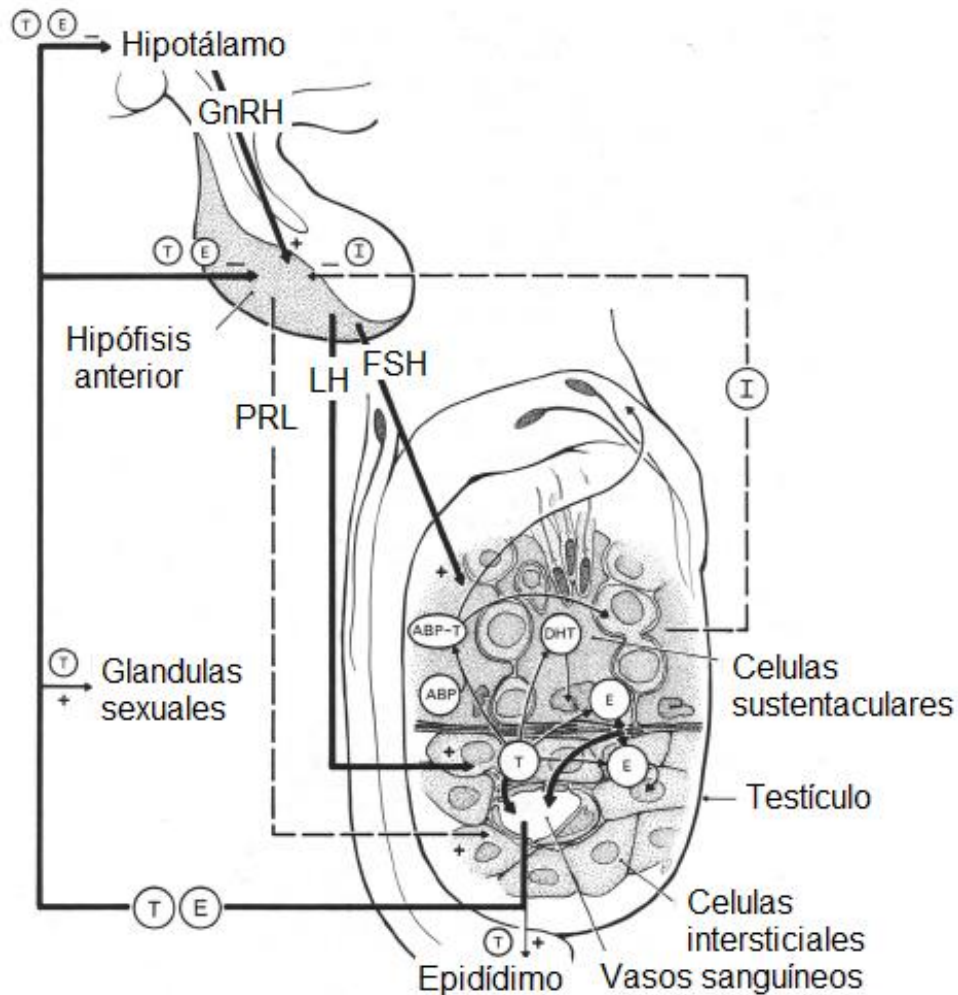


Figura 1. Control endocrino de la espermatogénesis. El aumento en la secreción de testosterona (T) en la sangre ya sea por aumento de la producción por el testículo o por administración exógena suprime la descarga de GnRH y por ende de LH por la hipófisis anterior. Consecuentemente, las células intersticiales reciben menor estimulación por la LH causando menor producción de T. Los estrógenos (E) producidos por las células de intersticiales y sustentaculares afectan la cantidad de LH y FSH secretada por los gonadotropos. La inhibina (I) suprime la descarga de FSH de la hipófisis anterior. Las células sustentaculares producen la proteína ligadora de andrógenos (ABP) que sirve como transportadora de la T y mantiene las concentraciones de T elevadas dentro de los túbulos seminíferos o del epidídimo. De Amann y Schanbacher, 1983.

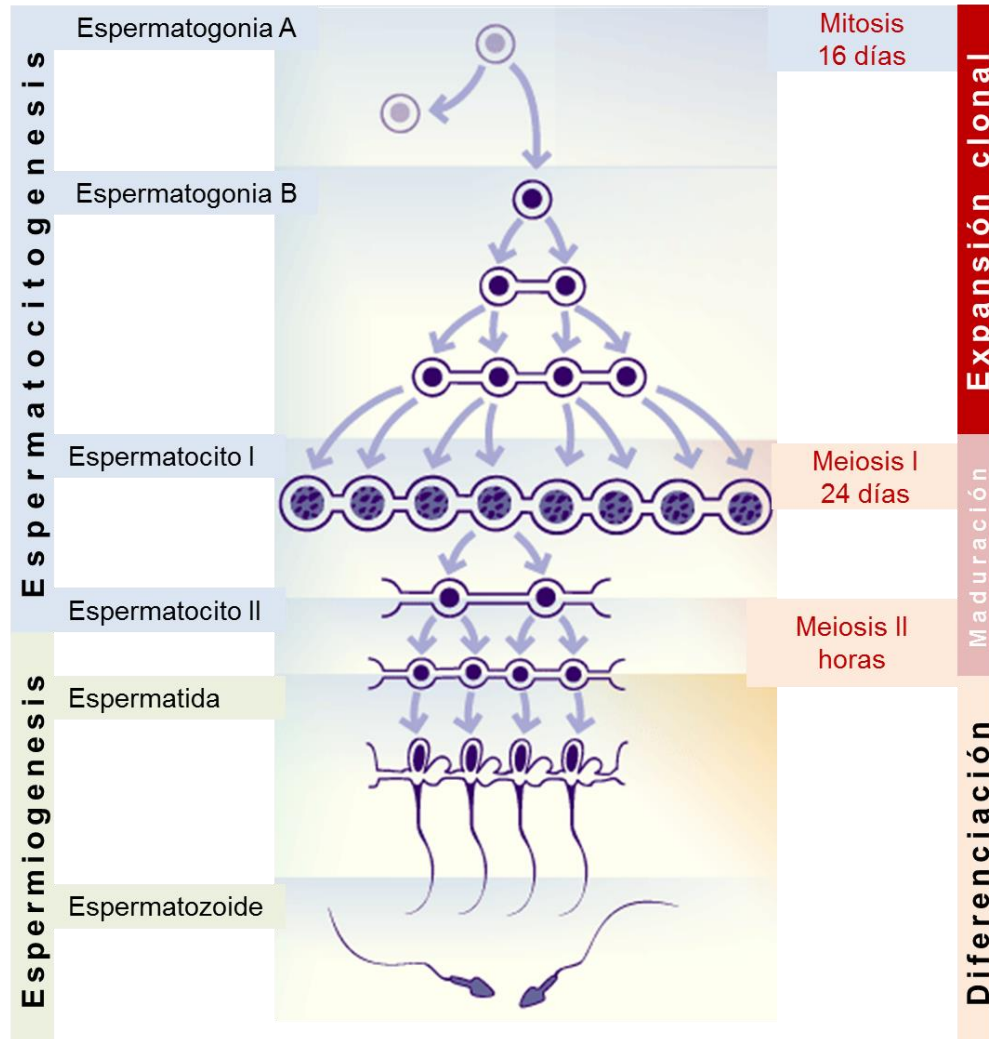


Figura 2. Representación esquemática de la espermatogénesis.

Al finalizar la meiosis, las espermatidas son redondas por lo que tienen que experimentar una serie de cambios morfológicos que conduzcan a la adquisición de la forma característica del espermatozoide. Durante la elongación de las espermatidas, la cromatina se condensa y el aparato de Golgi comienza a sintetizar el contenido del acrosoma, cuyas vesículas se fusionan y forman el acrosoma (O'Donnell *et al.*, 2011). También, en esta fase, se forma el flagelo,

concentrándose más de 100 mitocondrias en la pieza media, responsables del funcionamiento aeróbico del espermatozoide (Gadella y Luna, 2014). Así, gran parte del citosol y de los orgánulos de la espermatida (aparato de Golgi, retículo endoplásmico, lisosomas, peroxisomas y ribosomas) son removidos para adquirir dar la forma característica del espermatozoide. Una vez que la espermatida ha completado su metamorfosis, es liberada hacia el lumen del túbulo seminífero, este proceso es llamado espermiación y determina el número de espermatozoides que entraran al epidídimo y por consiguiente el número de células que tendrá el eyaculado (Neto *et al.*, 2016; O'Donnell *et al.*, 2016).

2.3 Factores que influyen en la producción y calidad del semen

La producción diaria de espermatozoides (DSP, por sus siglas en inglés) es el número de espermatozoides producidos por día por testículo y es uno de los factores principales en determinar el potencial reproductivo de los machos (Amann y Schanbacher, 1983). En los machos cabríos, la DSP por testículo varía de 2.76 a 7.23×10^9 y se encuentra correlacionada con el tamaño testicular (Leboeuf *et al.*, 2000). El volumen de un macho cabrío adulto debe ser superior a 0.5 mL, con una motilidad en masa de ≥ 3 (escala 0-5; 0 sin movimiento a 5 movimiento en ondas rápidas), motilidad progresiva $\geq 70\%$ (Menchaca *et al.*, 2005). Sin embargo, estos parámetros pueden verse afectados por la estacionalidad reproductiva, edad, raza, nutrición, método de colección del semen y el estímulo sexual (Amann y Schanbacher, 1983; Leboeuf *et al.*, 2000; Prado *et al.*, 2003; Jimenez-Rabadan *et al.*, 2012).

Cuadro 1. Sistema de puntuación de la motilidad en masa del eyaculado¹.

Puntuación	Apariencia microscópica
0	Sin remolinos- oscilaciones nulas o esporádicas de los espermatozoides.
1	Sin remolinos- oscilaciones generalizadas de los espermatozoides
2	Remolinos aparentes muy lentos
3	Remolinos lentos
4	Remolinos moderadamente rápidos
5	Remolinos rápidos

¹De David *et al.*, 2015

2.4.1 Estacionalidad

En zonas templadas (>35°) la calidad espermática disminuye cuando la duración del día aumenta (primavera; estación no reproductiva) y aumenta cuando los días se hacen más cortos (otoño; estación reproductiva; Leboeuf *et al.*, 2000). Estos cambios son sincronizados por el fotoperiodo (Malpoux *et al.*, 1999). El fotoperiodo produce estos cambios al alterar la sensibilidad del hipotálamo al feedback negativo de los esteroides gonadales, disminuyendo la secreción de GnRH durante los días creciente de primavera, provocando una disminución de LH y T disminuyendo la calidad espermática (Ritar *et al.*, 1992; Walkden-Brown *et al.*, 1997).

En caprinos criollos y Alpinos adaptados a latitudes de 26° el fotoperiodo también controla la calidad del semen (Delgadillo *et al.*, 1999; Carrillo *et al.*, 2010). En esta región, en los machos criollos, el periodo de actividad sexual se extiende de mayo a diciembre incrementándose de manera significativa la concentración y motilidad (2.8×10^9 y 3.55 , respectivamente) con respecto a los meses de enero a abril (reposo sexual) (1.4×10^9 y 3.04 ; Delgadillo *et al.*, 1999). Carrillo *et al.* (2010)

observaron en machos Alpinos jóvenes un incremento en la motilidad espermática al pasar de 1.4 ± 0.1 de enero a junio, a 2.5 ± 0.2 de junio a diciembre y un mayor volumen del eyaculado (VE) siendo de 0.1 ± 0.03 ml eyaculado⁻¹ de enero a junio a 0.5 ± 0.04 ml eyaculado⁻¹ durante agosto, septiembre y diciembre.

En los caprinos criados en latitudes tropicales (<25°) el principal modulador de la calidad espermática es el índice temperatura-humedad (THI) (van Tilburg *et al.*, 2015). Durante la época sequía, la concentración y la motilidad en masa fueron menores y se presenta un aumento en las anomalías espermáticas en comparación con la época de sequía (van Tilburg *et al.*, 2015). Por otro lado, Aguiar *et al.* (2013) mencionan que durante la época lluviosa el porcentaje de espermatozoides normales es mayor que aquellos colectados durante la estación seca, pero no encontraron diferencias en otros parámetros como el volumen del eyaculado (VE), concentración espermática (CE) y motilidad espermática (ME).

2.4.2 Edad

En los machos cabríos, se ha reportado que los adultos presentan un mayor VE y que los jóvenes (Al-Ghalban *et al.*, 2004). Ahmad y Noakes (1996) reportan en machos jóvenes (172.7 días de edad) que el VE es de 0.33 ± 0.03 ml con una concentración media de $1.99 \pm 0.16 \times 10^9$ ml⁻¹ con una DSP de $0.66 \pm 0.09 \times 10^9$ por eyaculado mientras que, en machos adultos de la raza Celtibérica, se menciona que el VE llega a ser de 1.1 ± 0.2 con una concentración espermática de $2.4 \pm 0.47 \times 10^9$ (Jimenez-Rabadan *et al.*, 2012).

2.4.3 Nutrición

La nutrición y especialmente la energía influyen enormemente en el correcto funcionamiento reproductivo y cuando los requerimientos nutricionales no son cubiertos, ocurren severos disturbios (Dupont *et al.*, 2014). En borregos y caprinos, los cambios en la masa corporal reflejan cambios en los túbulos seminíferos y en la capacidad espermatogénica (Martin *et al.*, 2010). La producción diaria de espermatozoides se reduce bajo condiciones de subalimentación y los efectos se extienden más allá de la duración de la espermatogénesis (Martin *et al.*, 2010). En borregos Merinos, la subalimentación causa una reducción en la circunferencia escrotal, masa testicular, concentración espermática y motilidad, además incrementa la fragmentación del ADN espermático, por el contrario, niveles mayores a los requerimientos de mantenimiento tienen efectos opuestos (Guan *et al.*, 2014).

La señal por medio de la cual, los nutrientes regulan la espermatogénesis es a través de la concentración de ciertas hormonas tales como leptina, insulina, hormona de crecimiento y factor de crecimiento parecido a la insulina, estas hormonas regulan la reproducción a través de sus receptores localizados tanto en el hipotálamo como en el testículo incrementando la secreción de gonadotropinas o estimulando la diferenciación y proliferación celular dentro del parénquima testicular (Barth *et al.*, 2008).

2.4.4 Raza

Greyling y Grobbelaar (1982) observaron que después de la estimulación eléctrica del macho para obtener el eyaculado, el volumen seminal fue significativamente más bajo en machos Angora comparado con machos de la raza Boer (1.6 vs 2.48 ml, respectivamente).

2.4.5 Método de colección del semen

En el macho cabrío, el semen es colectado principalmente por VA o por estimulación eléctrica (EE) (Leboeuf *et al.*, 2000). Si bien la VA simula al apareamiento natural, esta requiere que el macho sea entrenado para obtener los eyaculados, pudiendo tomar hasta más de tres semanas dependiendo de cada macho por lo que en machos no entrenados o de difícil manejo el método de elección es la EE (Wulster-Radcliffe *et al.*, 2001; Jimenez-Rabadan *et al.*, 2016). Algunos autores mencionan que las características del eyaculado difieren según el método de extracción, mencionando que el semen obtenido por VA artificial presenta mejores características (Greyling y Gobbelaar, 1983). Uno de los parámetros que mayor difieren entre la VA y EE es el volumen del eyaculado y la concentración (Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012). Sin embargo, cuando el semen es colectado por EE la viabilidad del semen post-congelamiento disminuye (Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016). Este cambio podría deberse a que la EE cambia la contribución de la secreción de las diferentes glándulas accesorias y de esta forma cambiar la composición plasmática y la cantidad de la enzima coagulativa de la yema de huevo por lo que en los machos cabríos el método de colección de

semen debe ser tomado en cuenta para asegurar una óptima calidad (Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016).

En machos que han sufrido un daño severo o la muerte, la obtención de espermatozoides del epidídimo permite la conservación de genes de animales con alto valor genético (Dong *et al.*, 2008).

2.4.6 Estimulo sexual

Una de las formas de aumentar el desempeño reproductivo en los machos bovinos, caprinos y cerdos es permitiendo que estos observan a otros machos montar a hembras en celo (Price *et al.*, 1998). Algunos de los comportamientos presentados por las cabras en celo tales como los movimientos de cola y montas hembra-hembra estimulan y excitan a los machos cabríos (Haulenbeek y Katz, 2011). Después de colecciones de semen sucesivas, el volumen y el número de células por eyaculado disminuyen sin embargo, este efecto puede revertirse si la hembra utilizada como estímulo para realizar las colectas es cambiada, aumentando la producción espermática (Prado *et al.*, 2003).

2.4 Conservación del semen

La preservación del germoplasma masculino a través de la criopreservación potencializa la transferencia de material genético a regiones geográficas distantes y entre razas para mejorar o preservar las existentes y el éxito de los programas reproductivos a través de la IA depende de la calidad del semen preservado (Ahmad *et al.*, 2015). El principal problema por el cual la IA en caprinos con semen congelado no es una práctica común en los sistemas de producción

caprina es que los espermatozoides son severamente dañados durante el proceso de congelamiento disminuyendo considerablemente la viabilidad de estos (Roca *et al.*, 1997). Otra alternativa al semen congelado, puede ser la disminución del metabolismo de los espermatozoides al reducir la temperatura y así prolongar su vida fértil permitiendo así transportar el semen de los centros de recolección a las granjas donde será utilizado (Salamon y Maxwell, 2000).

2.5.1 Diluyentes y dilución del semen

El objetivo de la dilución del semen es proteger a los espermatozoides del choque térmico y aumentar el volumen del eyaculado para que un mayor número de hembras puedan ser inseminadas exitosamente con un solo eyaculado. Los diluyentes empleados para la conservación del semen ya sea en fresco, frío o congelado, deberán tener las siguientes características: i) proveer un pH adecuado y capacidad amortiguadora; ii) osmolaridad adecuada y iii) proteger a los espermatozoides del daño térmico (Salamon y Maxwell, 2000). En general, los diluyentes contienen un crioprotector no penetrante (leche o yema de huevo) un crioprotector penetrante, para semen congelado (glicerol, dimetilsulfoxido [DMSO]), un amortiguador de pH (Tris, citrato de sodio, ácido cítrico), azúcar (glucosa, lactosa, fructuosa, rafinosa o trehalosa) y antibióticos (penicilina, estreptomicina) (Barbas y Mascarenhas, 2009).

2.5.1.1 Diluyentes empleados en caprinos

Los diluyentes más empleados para conservar el semen en caprinos son a base de yema de huevo adicionando glucosa y un amortiguador como Citrato de

Na o TRIS y leche descremada (Cseh *et al.*, 2012). Sin embargo, se están probando con excelentes resultados diluyentes a base de lecitina de soya (Roof *et al.*, 2012) Los diluyentes a base de TRIS y citrato-yema de huevo han sido utilizados para preservar el semen caprino con buenos resultados (Dorado *et al.*, 2010; Matos-Brito *et al.*, 2013). La eficiencia de estos diluyentes en la conservación del semen se atribuye a la capacidad amortiguadora del pH, a la adición de azúcar para proveer energía y al efecto protector de la yema de huevo (Matos-Brito *et al.*, 2013). La yema de huevo es empleada de manera rutinaria en los diluyentes debido a su efecto protector contra el choque térmico ya que cuenta con proteínas de baja densidad, las cuales se adhieren a la membrana celular durante el proceso de preservación previniendo el daño celular (Bispo *et al.*, 2011). La sobrevivencia *in vitro* y la fertilidad de los espermatozoides refrigerados y almacenados con los diluyentes antes mencionados llega a ser de 5 a 72 h (Leboeuf *et al.*, 2007). Otro de los diluyentes para conservar el semen en caprinos es el elaborado a base de leche descremada (Leboeuf *et al.*, 2003). La leche aporta a los espermatozoides energía y a través de su fracción proteica (caseína) protege a las células del choque térmico (Manjunath, 2012). Este diluyente es capaz de conservar el semen por 24 h a 4°C (Mara *et al.*, 2007). Otros autores mencionan que el semen puede conservarse hasta por 4 días sin efectos adversos en la motilidad (Leboeuf *et al.*, 2003).

Una de las causas de la reducción de la viabilidad del semen caprino es que, al mezclarse el plasma seminal con la yema de huevo o la leche de los diluyentes se reduce considerablemente la calidad de los espermatozoides ya que

el plasma contiene enzimas que interaccionan con los lípidos de la yema o leche (Dorado *et al.*, 2007). Una de las enzimas es la enzima coagulante de la yema de huevo (EYCE, por sus siglas en inglés), la cual hidroliza la lecitina de la yema de huevo a ácidos grasos y lisolecitina los cuales causan daños irreversibles a los espermatozoides (Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012). La BUSgp60 (Bulbourethralgland) con un peso de 54 a 60 Daltones, tiene similitud con las lipasas pancreáticas, presentando actividad fosfolipasa, hidrolizando los lípidos (Pellicer-Rubio *et al.*, 1997). El efecto de la BUSgp60 puede ser directo, al causar la hidrólisis de los fosfolípidos de los espermatozoides o indirecto, al generar derivados tóxicos de los lípidos presentes en la leche (Pellicer-Rubio y Combarous, 1998).

Para evitar este daño a los espermatozoides, se ha recomendado remover el plasma seminal antes de adicionar el diluyente (Leboeuf *et al.*, 2003) sin embargo, otros no encontraron ningún efecto adverso del plasma seminal sobre la motilidad o viabilidad del semen (Ferreira *et al.*, 2014; Küçük *et al.*, 2014). Así mismo, cuando se emplea leche descremada, esta debe ser calentada a 92 - 95° C durante 8 – 10 min y luego dejar enfriar a temperatura de cuarto, esto con el fin de inactivar la lactenina, un factor espermicida presente en la leche, no obstante, para evitar es paso, se puede emplear leche ultra-pasteurizada (Ari *et al.*, 2011).

2.5.1.2 Dilución de semen y concentración.

Para alcanzar una tasa de fertilidad alta después de la inseminación artificial, el semen debe ser diluido apropiadamente. Se ha reportado que una

excesiva dilución del semen provoca una reducción en la motilidad espermática (Hayden *et al.*, 2015). La mejor forma de diluir el semen es basándose en la concentración espermática. En caprinos, la dilución final con fertilidad aceptable se logra con dosis de 80 a 500×10^6 células/ml (Purdy, 2006).

Cuadro 2. Composición de los principales diluyentes empleados para la preservación de semen.

Diluyente citrato-yema

2.37 g citrato de Na ($2H_2O$)

0.50 g glucosa

15 mL yema de huevo

100,000 UI Penicilina

100 mg Estreptomina

Agua destilada c. b. p. 100 mL

Diluyente TRIS

3.36 g Tris

0.50 g Fructosa

1.99 g ácido citrato

14 mL yema de huevo

100,000 UI Penicilina

100 mg Estreptomina

Agua destilada c. b. p. 100 mL

Diluyente Leche

9 g de leche descremada en polvo

100,000 UI Penicilina

100 mg Estreptomina

Agua destilada c. b. p. 100 mL

*De Salamon y Maxwell, 2000.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización, animales y manejo

El estudio se llevó a cabo en una granja de manejo intensivo de cabras de la raza Alpino-Francés localizado en el norte de México (25° N, 103° O). Se utilizaron cuatro machos adultos (1 Saneen; 3 Alpino-Francés), de 2 a 5 años de edad durante la época de actividad sexual (otoño-invierno). Esta región es semiárida localizada a una altitud de 1140 msnm. La temperatura media anual es de 23.5°C (rango -2 a 43°C) con una precipitación anual de 230 mm. La duración del día es de 13 h, 41 min en el solsticio de verano y de 10 h, 9 min en el solsticio de invierno. La alimentación fue a base de heno de alfalfa (17% proteína cruda (PC); 1.95 Mcal de energía metabolizable (EM)) a libre acceso y 200 g de concentrado comercial (14% PC; 1.7 Mcal de EM) por día y por animal durante el periodo experimental. Las sales minerales (blocks) y el agua fueron proporcionadas a libre acceso.

3.2 Recolección de semen y evaluación inicial

El semen fue recolectado con VA una vez por semana durante un mes. La VA consistió en un tubo externo de caucho y un revestimiento interior de látex liso. El revestimiento de látex se extendía 2.0 cm más allá del final del tubo externo de caucho, se replegó sobre este y se aseguró cada extremo con ligas para formar una cámara. La cámara se llenó con agua a 48-55° C para conseguir una temperatura en el revestimiento de 40-45°C al momento de la colecta de semen. En un extremo de la VA se fijó un cono al cual estaba unido un tubo

graduado (0.1 mL). Todas las recolectas de semen se realizaron por el mismo técnico. El extremo libre de la VA fue lubricado . Cada eyaculado se colocó en baño maría a 37° C y se evaluó la motilidad en masa, concentración y espermatozoides vivos. Se emplearon solo aquellos eyaculados con una motilidad ≥ 3.0 (escala 0-5), concentración de $>2.5 \times 10^6$ células/mL y ≥ 85 % de espermatozoides vivos.

3.3 Procedimiento experimental

Después de la evaluación inicial del semen, cada eyaculado fue dividido en dos partes iguales, una fue diluida en Citrato de Na y yema de huevo (YemaBE) y la otra en leche descremada (LecheBE). La composición del diluyente YemaBE consistió en 2.37 g de citrato de Na (2H₂O), 0.50 g de glucosa, 15 mL de yema de huevo, 100,000 UI de penicilina sódica, 100 mg de estreptomina y c. b. p. 100 ml de agua destilada. Para el diluyente LecheBE, disolvimos 9.0 g de leche descremada en polvo (Svelty[®], Nestle) en 100 mL de agua destilada. Una vez que se disolvió por completo, el diluyente se calentó a 96° C durante 10 min, después de este tiempo la muestra se dejó enfriar a temperatura de laboratorio. Agregamos 100,000 UI de penicilina sódica. Los diluyentes se ajustaron para obtener un pH final de 6.7. Las muestras se diluyeron hasta obtener una concentración de 800×10^6 de espermatozoides por mL. Al momento de hacer la dilución los diluyentes tenían una temperatura de 37° C. Una vez diluido, el semen fue colocado en baño maría (37° C) después fue colocado en una hielera cubierta con hielo para bajar su temperatura. Una vez realizado esto, el semen fue transportado hasta el laboratorio donde inmediatamente fue puesto en un refrigerador para

continuar con su proceso de equilibrio por 2 h y que alcanzará una temperatura de 4° C. Una vez que alcanzó esta temperatura el semen fue evaluado a las 2, 24, 48, 72 y 96 h (Figura 3).

Diagrama experimental

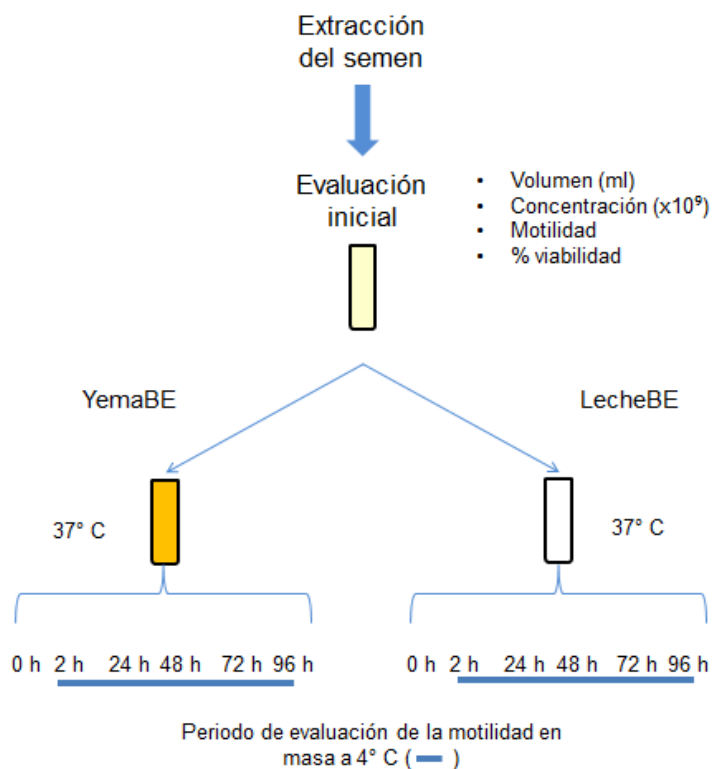


Figura 3. Diagrama en el cual se muestra el procedimiento experimental, que incluye la recolección del semen, la evaluación macro y microscópica inicial, los diluyentes empleados y el tiempo de almacenamiento y evaluación a 4°C.

3.4. Análisis del semen

3.4.1 Motilidad en masa

La motilidad fue evaluada subjetivamente al observar una gota uniforme de la muestra de cada protocolo empleando un microscopio de campo claro (Olympus, CH2, México, DF, México) para lo cual se observaron 5 campos y de acuerdo a la metodología de David *et al.* (2015).

3.5 Análisis estadístico

Se realizó una prueba de normalidad (Shapiro-wilk) para la motilidad. Los datos se transformaron con arc sine y se analizaron con un análisis de varianza. Los análisis se realizaron con el GLM del paquete estadístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). El diseño factorial incluyó el diluyente (Yema y leche) y el tiempo de almacenamiento (0, 2, 24, 48, 72 y 96 h). Para determinar si había diferencia estadística entre tratamientos se empleó un nivel de probabilidad de ≤ 0.05 . Se determinó que existía tendencia si $P > 0.05$ y ≤ 0.1 .

4. RESULTADOS

En el cuadro 3 se presentan las características seminales de cada macho. La motilidad del semen de los diluyentes a base de Citrato Na-yema de huevo (YemaBE) y leche (LecheBE) almacenado durante 96 h se presentan en el cuadro 4. No hubo interacción ($P>0.05$) entre el diluyente y el tiempo de preservación del semen. La motilidad espermática después de adicionar el diluyente fue similar para ambos (4.37 ± 0.47 ; $P=1.0$). Dos horas después, se observó una tendencia en la disminución de la motilidad espermática en el semen diluido con LecheBE que con YemaBE (4.25 ± 0.50 vs 3.0 ± 0.9 , respectivamente; $P=0.06$). Después de este tiempo no se apreció diferencia significativa entre los diluyentes sobre la motilidad ($P>0.05$).

Cuadro 3. Parámetros espermáticos de los machos empleados en el estudio al momento de la colección del semen con vagina artificial durante la estación reproductiva.

		Volumen (ml)	Concentración ($\times 10^9$)	Motilidad (0-5)	% células vivas
# Macho	1	0.75	3560	4.0	85
	2	0.80	3800	4.5	80
	3	0.63	4189	5.0	80
	4	1.0	3966	4.0	85

Cuadro 4. Efecto del tipo de diluyente y el tiempo de almacenamiento sobre la motilidad espermática (0-5) del semen caprino colectado con vagina artificial durante la estación reproductiva.

	0 h	2 h	24 h	48 h	72 h	96 h
YemaBE	4.37 ± 0.47	4.25 ± 0.50	2.6 ± 1.25	2.25 ± 1.7	1.5 ± 1.7	1.0 ± 1.4
LecheBE	4.37 ± 0.47	3.0 ± 0.9	2.6 ± 1.4	1.63 ± 1.1	0.88 ± 0.6	0.75 ± 0.5
Valor P	1.0	0.06	1.0	0.56	0.53	0.75

Valor P dentro columnas. Media \pm DE

Por otro lado, conforme el semen se almacena por más tiempo la motilidad disminuye gradualmente sin importar el diluyente empleado y se acrecienta después de 2 h de almacenamiento a 4° C ($P < 0.0001$; Fig. 4).

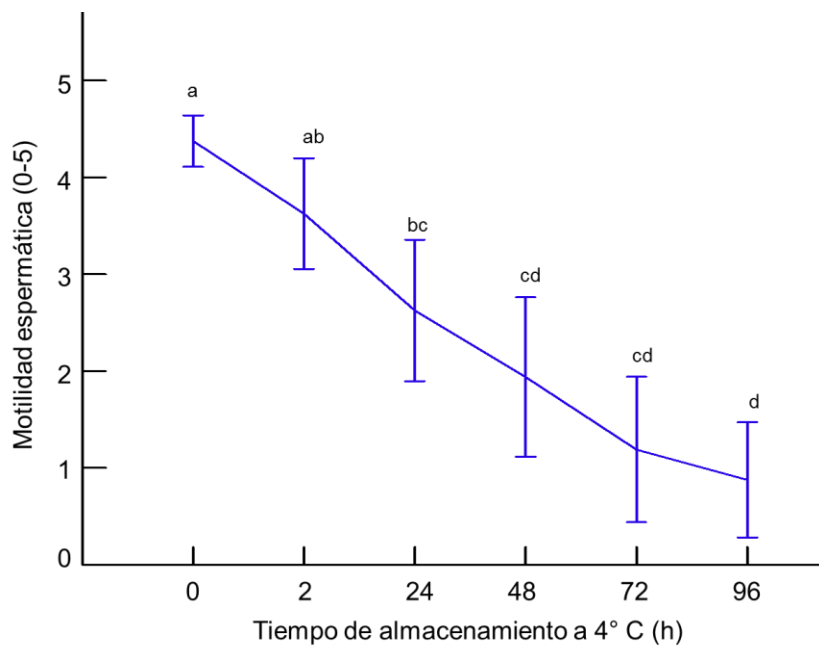


Figura 4. Efecto del tiempo de almacenamiento (0, 2, 24, 48, 72 y 96 h) a 4° C sobre la motilidad del semen caprino durante la estación reproductiva. Letras diferentes indican diferencia $P < 0.05$ (media \pm DE).

5. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que el semen de los machos cabríos sin remover el plasma seminal puede ser conservado a 4°C con diluyentes a base de citrato de Na o leche sin afectar la motilidad después de 24 h de conservación. Esto es similar a lo reportado por Matos-Brito *et al.* (2013) al emplear Citrato de Na y por Mara *et al.* (2007) con un diluyente a base de leche.

La habilidad de estos diluyentes para proteger a los espermatozoides del choque térmico se debe a su fracción proteica presente en la yema como en la leche la cual se une a la membrana celular previniendo su desorganización (Bispo *et al.*, 2011). Se ha mencionado que las enzimas presentes en el plasma seminal tales como la EYCE y BUSgp60 interaccionan con los lípidos presentes en la yema o la leche causando efectos adversos sobre la motilidad por lo que se sugiere que este sea removido (Leboeuf *et al.*, 2000). En contraste, estudios recientes han demostrado que la remoción del plasma seminal no afecta la calidad espermática (Cabrera *et al.*, 2005; Roof *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2014), por lo que este procedimiento que consume tiempo podría no ser necesario.

La exposición de los espermatozoides a bajas temperaturas reducen la viabilidad y la motilidad del semen debido a cambios en la arquitectura, permeabilidad de la membrana y en los canales iónicos similares a los que ocurren durante la capacitación (Watson, 2000). Además, se producen especies de oxígeno reactivo que afectan severamente la viabilidad de las células (Ahmad

et al., 2015). En este estudio, se observó una disminución gradual de la motilidad conforme se incrementaba el tiempo de almacenamiento (Figura 4).

La motilidad es parámetro confiable para predecir la fertilidad del macho (David *et al.*, 2015) ya que, la presencia de espermatozoides con una mayor motilidad, incrementa la probabilidad de que los espermatozoides lleguen al ovocito (Santolaria *et al.*, 2015). Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Mara *et al.* (2007) y Matos-Brito *et al.* (2013), quienes reportan una motilidad en masa similar (2.6 ± 0.2) después de conservar el semen a 4°C durante 24 h con un diluyente a base de leche descremada o citrato-Yema, respectivamente. Además, son similares a lo que se reporta para machos cabríos jóvenes durante la estación reproductiva en la misma área del estudio (Carrillo *et al.*, 2010) por lo que estos resultados podrían considerarse aceptables.

Siqueira *et al.* (2009) no encontraron diferencias significativas sobre la tasa de concepción en cabras inseminadas después de la detección del celo con semen enfriado a 5° C por 12 o 24 h. Esto es similar a lo reportado en cabras Murciano-Granadina por Roca *et al.* (1997) quienes reportan una tasa de gestación de 76% después de la inseminación artificial con semen enfriado a 5° C.

6. CONCLUSIÓN

El semen en caprino puede ser conservado a 4° C con citrato-yema de huevo o leche descremada por 24 h. Después de este tiempo la motilidad disminuye. Es necesario corroborar estos resultados bajo condiciones de campo.

7. LITERATURA CITADA

- Aguilar GV, van Tilburg MF, Catunda AGV, Celes CKS, Lima ICS, Campos ACN, A AA Moura, and AA Araújo. 2013. Sperm Parameters and Biochemical Components of Goat Seminal Plasma in the Rainy and Dry Seasons in the Brazilian Northeast: The Season's Influence on the Cooling of Semen. *Arq Bras Med Vet E Zoot.*
- Ahmad M, Nasrullah R, Ahmad, N. 2015. Effect of cooling rate and equilibration time on pre-freeze and post-thaw survival of buck sperm. *Cryobiology.* 70: 233–8.
- Ahmad N, Noakes DE. 1996. Seasonal variation in the semen quality of young british goats. *Br. Vet. J.* 152: 225-236
- Al-Ghalban, AM, Tabbaa MJ, Kridli RT. 2004. Factors affecting semen characteristics and scrotal circumference in Damascus Buck. *Small Rum Res.* 53, 141-149.
- Amann RP, Schanbacher BD. 1983. Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science,* 57: 380-403.
- Ari UC, Kulaksiz R, Öztürkler Y. 2011. Freezability of tushin ram semen extended with goat or cow milk based extenders. *Reprod Dom Anim.* 46: 975-979.
- Barbas JP, Mascarenhas RD. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank.* 10: 49-62.
- Barth AD, Brito LFC, Kastelic JP. 2008. "The Effect of Nutrition on Sexual Development of Bulls." *Theriogenology* 70:485–94.
- Bispo CAS, Pugliesi G, Galvão P, Rodrigues MT, Ker PG, Filgueiras B., Carvalho GR. 2011. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small Rumin Res.* 100:54–58.
- Cabrera F, Gonzalez F, Batista 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*). *Reprod Dom Anim.* 40: 191-5.
- Carrillo E, Meza-Herrera CA and Véliz FG. 2010. Estacionalidad reproductiva de los machos cabríos de la raza Alpino-Francés adaptados al subtrópico mexicano. *Rev Mex Cienc Pec.* 169–78.
- Cseh S, Faigl V, Amiridis GS. 2012. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Anim Reprod Sci* 130: 187–92.
- David Ingrid, Kohnke P, Lagriffoul G, Praud O, Plouarboué F, Degond P, Xavier D. 2015. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Anim Reprod Sci.* 161: 75–81.

- Delgadillo, J A, Canedo GA, Chemineau P, Guillaume D, Malpoux B. 1999. Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male creole goats in subtropical northern Mexico. *Theriogenology* 52: 727–37.
- Dong Q, Rodenburg SE, Huang C, Vandervoort CA. 2008. Cryopreservation of rhesus monkey (*Macacamulatta*) epididymal spermatozoa before and after refrigerates storage. *J. Androl.* 29:283-292.
- Dorado J, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M. 2010. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Anim Reprod Sci.* 121:115–23.
- Dubeuf JP, Morand-Fehr P, Rubino R. 2004. Situation, changes and future of goat industry around the world. *Small Rum Res.* 51:165-173.
- Dupont J, Reverchon M, Bertoldo MJ, Froment P. 2014. Nutritional signals and reproduction. *Molecular and Cell Endocrinol.* 382:527–37.
- Escareño-Sánchez LM, Wurzinger M, Pastor López F, Salinas H, Sölkner J, Iñiguez L. 2011. La cabra y los sistemas de producción caprina de los pequeños productores de la Comarca Lagunera, en el norte de México. *Serie ciencias forestales y del ambiente Revista Chapingo.* 17:235-246.
- Escareño L, H. Salinas-Gonzalez M, Wurzinger Iñiguez L, Sölkner J, Meza-Herrera CA. 2012. Dairy goat production systems. *Trop Anim Health Prod.* 45:17-34.
- FAOSTAT. 2013. Consulta: 16 enero 2015. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/569/DesktopDefault.aspx?PageID0569#ancor>.
- Ferreira, VDS, Bourg MR, de Mello, Elysio C, Fonseca M, Ferreira Dias AC, Cardoso MJ, Silva RB, Martins WPJ. 2014. Effect of seminal plasma and egg yolk concentration on freezability of goat semen. *Rev Bras de Zoot.*
- Gadella B, Luna C. 2014. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. 81; 74-84
- Goericke-Pesch S, Klaus D, Failing K, Wehrend A. 2012. Longevity of chilled canine semen comparing different extenders. *Anim Reprod Sci.* 135: 97–105.
- Greyling JPC, Grobbelaar JAN. 1983. Seasonal variation in semen quality of Boer and Angora goat rams using different collection techniques. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 13: 250-252.
- Grossman JD, Getty R. 1982. *Anatomía de los animales domésticos (Tomo I)*. Salvat.

- Guan Y, Malecki IA, Hawken PAR, Matthew ML, GraemeGM. 2014. Under-Nutrition reduces spermatogenic efficiency and sperm velocity, and increases sperm DNA damage in sexually mature male Sheep. *Anim Reprod Sci.* 149:163–72.
- Hatziminaoglu I. y J. Boyazoglu. 2004. The goat in ancient civilizations: from the fertile crescent to the aegean sea. *Small Rumin Res.* 51: 123-129.
- Haulenbeek, Andrea M, and Larry S Katz. 2011. Female tail wagging enhances sexual performance in male goats. *Hormones and Behavior* 60 : 244–47.
- Hayden SS, Blanchard TL, Brinsko SP, Varner DD, Hinrichs K, Love CC. 2015. The 'Dilution Effect' in stallion sperm. *Theriogenology* 83 : 772–77.
- Jiménez-Rabadán P, Soler AJ, Ramón M, García ÁO, Maroto MA, Iniesta CM, Fernández SMR, Montoro V, Pérez GMD, Garde JJ. 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Anim Reprod Sci.* 167: 103–8.
- Jiménez-Rabadán P, Ramón M, García Á O, Maroto MA, Olmo E, Pérez GMD, Bisbal A, Fernández SMR, Garde JJ, Soler AJ. 2012. Effect of semen collection method (artificial vagina and electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. *Anim Reprod Sci.* 132: 88–95.
- Küçük N, Aksoy M, Uçan U, Ahmad E, Naseer Z, Ceylan A, Serin I. 2014. Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. *Cryobiology* 68: 327–31.
- Leboeuf, B, Guillouet P, Batellier F, Bernelas D, Bonné J.L, Forgerit, Renaud G, Magistrini M. 2003. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. *Theriogenology.* 60: 867–877.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci:* 113–141.
- Malpoux B, Migaud M, Tricoire H Chemineau P. 2001. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms.* 16: 336-347.
- Manjunath P. 2012. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim Reprod Sci.* 9:809-815.
- Mara L, Dattena M, Pilichi S, Sanna D, Branca A, Cappai P. 2007. Effect of different diluents on goat semen fertility. *Anim Reprod Sci.* 102: 152–7.
- Martin G, Blache B, Miller D, Vercoe PE. 2010. Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male. *Animal.* 4: 1214-1226.

- Matos-Brito BG, Lima ICS, Pereira JF, Barboza FM, Linard MAB, Aguiar GV, Catunda AGV, Moura AAA, Nunes JF, Campos ACN. 2013. Effect of initial seminal plasma fructose concentration on goat semen storage at 5° C. *Arch Zootec.*62: 143-146
- Mellado M, Valdez R, Lara LM, Lopez R. 2003. Stocking rate effects on goats: A research observation. *J Range Manag.* 56: 167–73.
- Menchaca A, Pinczak A, Queirolo D. 2005. Storage of ram semen at 5° C: Effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes. *Anim Reprod.* 2: 195-198.
- Neto FT, Bach PV, Najari BB, PV, Li PS,Goldstein M. 2016. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol.* *In press*
- O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, McLachlan RI. 2006. Endocrine regulation of spermatogenesis. En: Neill JD, Ed. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction.* San Diego, CA: Elsevier; 1017-69.
- O'Donnell L, Nicholls P, O'Bryan M, McLachlan R, Stanton P. 2011. Spermiation. *Spermiogenesis.* 1: 14-35.
- Pellicer-Rubio M T, Magallon T, Combarous Y. 1997. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-Kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol Reprod.* 57: 1023–31.
- Pellicer-Rubio MT, Combarous Y. 1998. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *J Reprod Fertility.* 112 : 95–105.
- Pineda, M. H., & Dooley, M. P. 2003. *McDonald's veterinary endocrinology and reproduction.*5a Edición.
- Prado, Victor, Orihuela A, Lozano S, Pérez L.I. 2003. “Effect on Ejaculatory Performance and Semen Parameters of Sexually-Satiated Male Goats (*Capra Hircus*) after Changing the Stimulus Female.” *Theriogenology* 60: 261–67.
- Price, Edward O, Borgwardt R, Orihuela A, R Dally Martin. 1998. “Sexual Stimulation in Male Sheep and Goats.” *Applied Animal Behaviour Science* 59: 317–22.
- Purdy, P.H. 2006.“A Review on Goat Sperm Cryopreservation.” *Small Ruminant Research* 63: 215–25.
- Reece, W. O. 2009. *Functional anatomy and physiology of domestic animals.*John Wiley & Sons.

- Ritar AJ, Mendoza G, Salamon S, White IG. 1992. Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (*Capra hircus*). *J. Reprod. Fertil.* 95: 97-102
- Roca J, Carrizosa JA, Campos I, Lafuente A, Vazquez JM, Martinez 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: 147–53.
- Romano JE. 2004. Synchronization of estrus using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the breeding season in Nubian goats. *Small Ruminant Res.* 55: 15–19.
- Roof DJ, Bowley S, Price LL, Matsas DJ. 2012. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology.* 77: 412–20.
- Roser JF. 2001. Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. *Anim Reprod Sci.* 68: 139-151.
- Ross MH, Pawlina W. 2007. *Histología*. Ed. Médica Panamericana.
- Santolaria P, Fiel SV, Palacín I, Fantova E, Blasco ME, Silvestre MA, Yániz JL, 2015. Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Anim Reprod Sci.* 163: 82–88.
- SIAP.2013. Resumen Nacional. Población ganadera, avícola y apícola. Consulta: 20 enero 2015. Disponible en: www.siap.gob.mx/ganaderia.
- Siqueira AP, Fonseca JF, Silva Filho JM, Bruschi JH, Viana JHM, Palhares MCM, Brischi MCM, Peixoto MP, 2009. Reproductive parameters of Toggenburg goats inseminated with cooled semen diluted in egg yolk extender. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 61:299-305.
- van Tilburg MF, Salles M G F, Silva M M, Moreira R A, Moreno FB, Monteiro-Moreira ACO, Martins JAM, Candido MJD, Araujo AA, Moura AAA. 2015. Semen variables and sperm membrane protein profile of Saanen bucks (*Capra hircus*) in dry and rainy seasons of the northeastern Brazil (3 S). *Int J Biometeorol.* 59: 561-573.
- Walkden-Brown SW, Restall BJ, Scaramuzzi RJ, Martin GB, Blackberry MA. 1997. Seasonality in male Australian cashmere goats: Long term effects of castration and testosterone or oestradiol treatment on changes in LH, FSH and prolactin concentrations, and body growth. *Small Ruminant Res.* 26: 239-252.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 60-61: 481–92.

Wulster-Radcliffe MC, Williams MA, Stellflug JN, Lewis GS. 2001. Technical note: artificial vagina vs. A vaginal collection vial for collecting semen from rams. *J. Anim. Sci.* 79: 2964-2967.