

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Efecto de diluyentes a base de liposomas y yema de huevo en la crioconservación del semen caprino

POR:

NESTOR RAMIREZ ANGELES

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA

AGOSTO 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Efecto de diluyentes a base de liposomas y yema de huevo en la crioconservación de semen caprino.

Por:

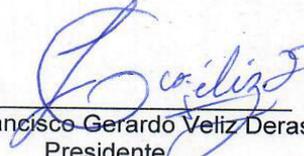
NESTOR RAMIREZ ANGELES

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por:


Dr. Francisco Gerardo Veliz Deras
Presidente


Dr. Oscar Ángel García
Vocal


Dr. Juan Manuel Guillen Muñoz
Vocal


IZ. Hector Manuel Estrada Flores
Vocal Suplente


MC. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México
Agosto 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Efecto de diluyentes a base de liposomas y yema de huevo en la crioconservación de semen caprino.

Por:

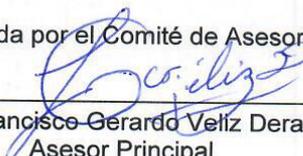
NESTOR RAMIREZ ANGELES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dr. Francisco Gerardo Veliz Deras
Asesor Principal


Dr. Oscar Angel Garcia

Coasesor


Dr. Juan Manuel Guillen Muñoz

Coasesor


MC. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México
Agosto 2019



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna “MI ALMA TERRA MATER” por abrigarme y brindarme el espacio para cumplir mi objetivo, por ser el pilar de mi formación y darme la oportunidad de culminar con éxito mis estudios y de crecer.

Al Dr. Oscar Ángel García. Por haberme brindado la confianza y el tiempo para hacer posible el presente trabajo y por compartir sus conocimientos.

Al I.Z. Héctor Manuel Estrada Flores por el apoyo incondicional que me ha sabido brindar durante estos 5 años al inicio y termino de este proyecto en mi vida profesional.

Al Mc. Jesús Mendoza Carreola. Por todo el apoyo y dedicación que nos brindó para poder concluir con este trabajo y por compartir su conocimientos.

Al Dr. Juan Manuel Guillen Muñoz. Por todo el apoyo y dedicación que nos brindó para poder concluir con este trabajo y por compartir sus conocimientos.

A mis amigos: Alexis, Jhovani, Abraham, Samuel y Saúl por su apoyo incondicional y esa gran amistad que se convirtió en una familia durante estos 5 largos años y por el apoyo que me brindaron cuando más lo necesite. Gracias

A mi novia por el apoyo motivacional que me ha brindado para ser mejor persona y un excelente profesionista.

DEDICATORIAS

A Dios, por estar conmigo en cada momento de mi vida, por no haberme dejado solo en esta etapa tan importante y maravillosa de mi vida durante 5 largos años, por haberme dado la fuerza, salud, sabiduría y el valor para concluir uno de todos los grandes proyectos de mi vida. Por todo esto y más GRACIAS.

A mis padres, Adrián Ramírez Sánchez y Flor Hilda Ángeles Salas, les agradezco de primera Instancia por haberme dado la vida, por tratar de darme lo mejor y siempre tener su apoyo, gracias por haber creído en mí y así brindarme la oportunidad y confianza de alejarme de ustedes para así cumplir un sueño que desde pequeño tuve, y ahora una vez cumplida esta meta les dedico a ustedes este logro y mi pago es darles la felicidad de tener un profesionalista en su familia, agradezco que sin importar todos los sacrificios que pasamos durante estos 5 años, en los cuales reflexione y así pude cambiar para bien muchos aspectos de mi vida. Les doy las gracias ya que sin ustedes no lo habría logrado.

A mi hermano, Erick Adrián Ramírez Ángeles, gracias por el inagotable apoyo que me brindaste, por cada consejo y regaño que sin duda me hicieron ser mejor persona y me llevaron a ser lo que hoy he logrado, por todo el cariño que durante toda mi vida me has regalado, por convertirte en mí modelo a seguir y querer llegar a ser una gran persona como tú. Gracias por todo y te dedico con todo cariño este triunfo que si no hubiese tenido a un hermano como tú, jamás habría logrado tanto.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue comparar el uso de dos diluyentes a base de yema de huevo (Optidyl; OP) y liposomas (OptiXcell; OX) y su efecto sobre la motilidad, viabilidad y normalidad del semen caprino fresco y refrigerado. El estudio se llevó a cabo en la posta caprina de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, localizado en el norte de México (25° N, 103° O). Se utilizaron cuatro machos adultos de la raza Alpino-Francés, de 2 años de edad. El semen se recolecto mediante una vagina artificial (VA), para lo cual se utilizó una hembra en celo como estímulo para realizar la monta del macho y colectar el semen. En el semen fresco se obtuvieron valores similares en los tres diluyentes [motilidad (4.2 ± 0.3), viabilidad (75.4 ± 3.3), normalidad 85.00 ± 3.5). Los valores de la motilidad fueron mayores en el semen refrigerado para el OX (4.00 ± 0.2) comparado con el OP (3.00 ± 0.2 ; $P < 0.05$). La viabilidad se redujo después de la refrigeración ($P < 0.05$). La viabilidad del semen refrigerado con el OX fue $\geq 65\%$ seguido por el (60% del OP ($P > 0.05$)). En conclusión, no se encontró diferencia entre los diluyentes a base de liposomas y los elaborados con yema de huevo en cuanto a los parámetros espermáticos, sin embargo el diluyente a base de liposomas puede ser una alternativa más eficiente para mejorar la calidad seminal en semen refrigerado.

Palabras clave: Diluyentes, Liposomas, Yema de huevo, Calidad seminal, Crioconservacion.

Índice de contenido

AGRADECIMIENTOS.....	II
DEDICATORIAS.....	II
RESUMEN.....	III
Índice de figuras.....	VI
1. Introducción.....	1
2. Revisión de literatura.....	3
2.1 Estacionalidad reproductiva.....	3
2.2 Anatomía del aparato reproductor del macho cabrío.....	4
2.2.1 Pene y prepucio.....	4
2.2.2 Testículos.....	4
2.2.3 Escroto.....	5
2.2.4 Glándulas accesorias.....	5
2.2.5 Conducto deferente.....	5
2.2.6 Uretra.....	5
2.2.7 Epidídimo.....	6
2.3 Endocrinología del macho cabrío.....	7
2.4 Espermatogénesis.....	8
2.5 Características seminales.....	11
2.5.1 Estructura espermática.....	11
2.5.2 Plasma seminal.....	12
2.6 Evaluación espermática.....	13
2.7 Apariencia y volumen.....	14
2.9 Motilidad espermática.....	14
2.10 Concentración espermática.....	15
2.11 Morfología espermática.....	16
2.12 Dilución de semen.....	17
2.13 Refrigeración de semen caprino.....	18
2.14 Congelación de semen caprino.....	18
2.15 Descongelamiento de semen.....	20
2.16 Vagina artificial.....	20
3. Objetivo.....	22
4. Hipótesis.....	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
5.1 Localización del experimento.....	23
5.2 Manejo de los animales.....	23

5.3 Recolección y procesamiento del semen.....	23
5.4 Diluentes y proceso de crioconservación	24
5.5 Análisis estadístico	25
6. Resultados.....	26
7. Discusión.....	28
7. Conclusiones	31
8. Literatura citada	32

Índice de figuras

		Pág.
Figura 1	Anatomía del aparato reproductor caprino	6
Figura 2	Endocrinología de la espermatogénesis	8
Figura 3	Esquematización de la espermatogénesis	10

1. Introducción

La crioconservación espermática es considerada una tecnología reproductiva muy importante con la que se conserva el material biológico del macho (espermatozoide) por tiempo indeterminado, que hace eficiente el mejoramiento animal o programas de conservación en diferentes especies, incluyendo a los pequeños rumiantes (Jiménez-Roldan *et al.*, 2016). No obstante, en ocasiones la respuesta que los espermatozoides generan a la crioconservación es variable entre individuos de diferente especie e incluso puede variar en la misma especie, observando que, en general, los espermatozoides que producen los pequeños rumiantes son extremadamente sensibles al proceso de crioconservación en comparación a otras especies (Aisen *et al.*, 2002; Kucuk *et al.*, 2015), una alternativa diferente sería utilizar semen líquido almacenado entre 0-4° C permitiendo la conservación y por ende el uso del semen por periodos más prolongados que utilizando semen fresco (Menchaca *et al.*, 2005; Goericke-Pesch *et al.*, 2012).

Debido a lo antes mencionado, se han realizado investigaciones sobre diferentes diluyentes para poder incrementar la calidad espermática, evitando la formación de cristales de hielo intracelulares los cuales son letales y para disminuir el daño de la membrana al momento y después de la crioconservación (Amirat *et al.*, 2004; Alcay *et al.*, 2015; Arando *et al.*, 2017).

La yema de huevo es un constituyente común de los diluyentes de semen; los componentes de la yema de huevo (su alto peso molecular y la fracción de lipoproteínas de baja densidad) proveen una excelente protección del semen ante el shock por frío (Salamon y Maxwell, 2000), se ha logrado demostrar que funciona como un crioprotector no permeable para la crioconservación, disminuyendo, debido a que el 66% de las proteínas que contiene son de baja densidad, la pérdida de enzimas acrosomales y previendo los cambios degenerativos que se generan en el acrosoma al momento de ser almacenado

(Salamon y Maxwell, 2000; Amirat *et al.*, 2004; Ansari *et al.*, 2016; Murphy *et al.*, 2018). Sin embargo, la composición de huevo de gallina es dependiente de buenas prácticas de manufactura y prácticas nutricionales, además de que el uso de este implica que exista un riesgo de contaminación microbiana (Ansari *et al.*, 2016; Belala *et al.*, 2016), por lo que es demasiado complicado reproducir ensayos. Debido a eso, se ha buscado poder sustituir parcialmente o totalmente los diluyentes de semen con proteínas de origen animal, por otros diluyentes que están compuestos por liposomas y que no contienen proteínas de origen animal (Valente *et al.*, 2010; Ansari *et al.*, 2016).

Se han desarrollado otros diluyentes que no contienen proteínas de origen animal, que son compuestos químicamente por liposomas (Ansari *et al.*, 2016). Se ha demostrado que los liposomas tienen propiedades crioprotectoras del semen al momento del proceso de congelación, las cuales podrían llegar a alterar la conformación y la permeabilidad de la membrana plasmática al agua por las propiedades físicas y químicas de los lípidos de los que está compuesto (Röpke *et al.*, 2011), este proceso de la crioconservación es muy favorable. A diferencia de la proteína animal de la yema de huevo estos lípidos, no son vectores de diferentes agentes infecciosos (Kumar *et al.*, 2015), y se utilizan considerablemente en la crioconservación del semen de bovino (Ansari *et al.*, 2016; Flesch *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018) y búfalo (Kumar *et al.*, 2015; Swami *et al.*, 2017). Sin embargo, el efecto que tienen los diluyentes de semen a base de liposomas es muy poco conocido, sobre la calidad del semen de caprino en la crioconservación. Debido a esto, se evaluó *in vitro*, el impacto de un diluyente en base de liposomas y los elaborados a base de proteína de yema de huevo sobre la calidad del semen de caprino conservado mediante refrigeración.

2. Revisión de literatura

2.1 Estacionalidad reproductiva

Los machos cabríos presentan variaciones con su actividad sexual. El peso testicular es indicativo de la actividad de espermatogénesis. El peso testicular mínimo se observa durante la primavera y el peso testicular máximo durante el otoño (Restall, 1992; Walkden-Brown *et al.*, 1994). Los Machos caprinos situados en la zona norte de México con coordenadas (26° N), en esa región también se presentan variaciones estacionales en cuanto al peso testicular y la producción espermática. En los machos locales, la época de actividad sexual es desarrollada durante los meses mayo-diciembre y la época de reposo se lleva a cabo en los meses enero-abril (Delgadillo *et al.*, 1999). El último período es caracterizado por la testosterona que secreta el macho, por el peso testicular y la producción espermática cualitativa y cuantitativa se hallará disminuida (Delgadillo *et al.*, 1999; Delgadillo *et al.*, 2001).

La estacionalidad reproductiva de los machos caprinos es resultante de la existencia de un ritmo endógeno reproductivo el cual es sincronizado por las variaciones anuales fotoperiódicas (Thiery *et al.*, 2002; Malpoux, 2006; Delgadillo *et al.*, 2011). No obstante, existen diversos factores externos e internos los cuales pueden llegar a modificar el ritmo reproductivo anual como es la nutrición y las relaciones socio-sexuales cabrias (Martin *et al.*, 2004; Blache *et al.*, 2008; Fatet *et al.*, 2011).

El reposo sexual de los machos cabríos puede ocurrir entre enero-febrero a mayo-junio (Delgadillo *et al.* 1999).

2.2 Anatomía del aparato reproductor del macho cabrío

Es de suma importancia conocer la anatomía y fisiología del aparato reproductor de los animales ya que ayuda a comprender la composición y el funcionamiento que el órgano está destinado a llevar a cabo. El aparato reproductor del macho cabrío está constituido anatómicamente por Pene, Prepucio, testículos, escroto, glándulas accesorias, conducto deferente, uretra y epidídimo (Figura 1).

2.2.1 Pene y prepucio

En el macho cabrío el órgano copulador tiene una forma tubular en el cual tiene una espícula delicada y muy sensible conocido como (glande), dentro de la anatomía interna es cavernoso y fibroelástico con una parte en forma de S el cual le permite la extensión durante la eyaculación, la principal función reproductiva es depositar el semen en la vagina de la hembra y su función fisiológica del animal es permitir pasar la orina, el prepucio es una extremidad libre del pene la cual tiene como función cubrirlo para protegerlo del medio exterior (Koeslag, 1982; Vera, 1993).

2.2.2 Testículos

Estos se encuentran suspendidos por el divertículo del abdomen por una bolsa llamada escroto la cual está ubicada en la región inguinal. Estas gónadas son las encargadas de la producción de espermatozoides células encargadas de la reproducción del macho y síntesis de las hormonas sexuales como la testosterona. Los testículos se encuentran separados uno de otro por un tabique y cada testículo cuenta con secciones anatómicas llamadas lóbulos y dentro de ellos se encuentran los túbulos seminíferos los cuales son encargados de alojar a las células productoras de espermatozoides. Cada testículo cuenta con un sistema individual sanguíneo y nervioso, las principales partes anatómicas son: epidídimo, tubos seminíferos, conducto deferente y escroto (De la Rosa, 2011).

2.2.3 Escroto

Saco escrotal contiene los testículos en su interior y los protege, está formado de piel fina cubierta de pelo y por medio de un tabique escrotal es como separa los testículos, así mismo, es el encargado de regula la temperatura manteniéndola por debajo de la temperatura corporal, participando en conjunto con el musculo cremaster externo siendo estor muy importante para la adecuada la producción espermática por el testículo (Vera, 1993).

2.2.4 Glándulas accesorias

Se encuentran cerca unas de otras en el interior del abdomen, están confirmadas por: las vesículas seminales, la próstata y las glándulas de Cowper. Tienen como función: formar la mayor parte del líquido seminal (vesículas seminales), lubricar y limpiar la uretra (próstata), los espermatozoides son activados, producen sustancias para amortiguar los cambios de pH y así ayudar al semen a ser más resistente, aportan ciertos nutrientes al espermatozoide (Amo García *et al.*, 1982; Vera, 1993).

2.2.5 Conducto deferente

Es un tubo tejido muscular liso, conformado por nervios, vasos sanguíneos y vasos linfáticos forman el cordón espermático, tiene como función transportar a los espermatozoides desde la cola de epidídimo hasta la uretra al momento que el animal lleve a cabo la eyaculación (Cantú, 1988; Vera, 1993).

2.2.6 Uretra

Es un tubo que funciona como conducto a la orina y del semen, está constituido de tres partes:

a) Pélvica: está 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).

2.2.7 Epidídimo

Porción complementaria testicular la cual se localiza cerca del tabique escrotal, es un tubo largo y enrollado que se divide en tres partes: cabeza, cuerpo y cola, la función de este consiste en concentrar, madurar, transportar y almacenar los espermatozoides (De la Rosa, 2011; Vera, 1993).

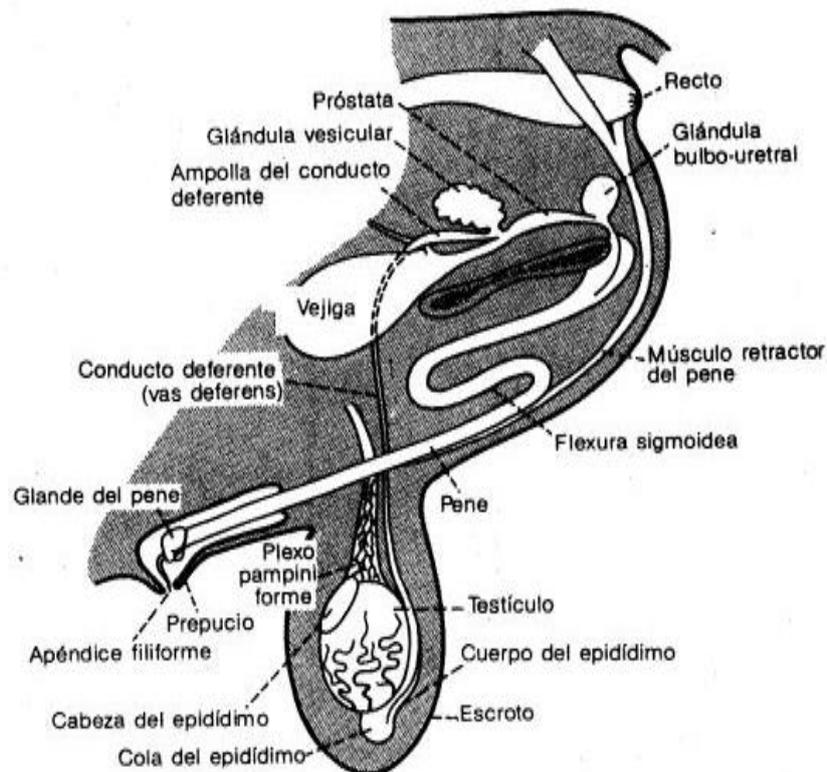


Figura 1 Anatomía del aparato reproductor del macho (Tomado de Salamon's Artificial Insemination of sheep and goats, Evans, G and Maxwell, WMC. Butterworth & Co.)

2.3 Endocrinología del macho cabrío

Fisiológicamente la endocrinología está influenciada por diversos cambios debido a la secreción de hormonas hipotalámicas como lo es la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), hormonas adenohipofisarias; como la hormona Luteinizante (LH) y la hormona Folículo estimulante (FSH) y hormonas que se secretan en los testículo como los andrógenos e inhibina (Roser, 2001). La GnRH se secreta en el hipotálamo dentro del sistema porta-hipofisario así alcanzando la hipófisis anterior la cual provoca la secreción pulsátil de LH y FSH (Amann y Schanbacher, 1983). La LH se encarga de estimular la secreción de Testosterona (T) con las células intersticiales (de Leydig). La secreción de LH se controla por la interacción entre la GnRH y testosterona (Figura 2). El aumento de los niveles séricos de Testosterona proporciona una retroalimentación negativa en el hipotálamo y elimina la secreción pulsátil de GnRH y por lo tanto la secreción de LH de la hipófisis anterior provoca una disminución en la concentración de Testosterona (Amann y Schanbacher, 1983). La FSH se encarga de estimular la división celular que se lleva a cabo en el epitelio germinal, principalmente en los animal inexpertos (pre-puberales), también el metabolismo de los andrógenos y de la proteína ligadora de andrógenos (ABP) (Pineda y Dooley, 2003).

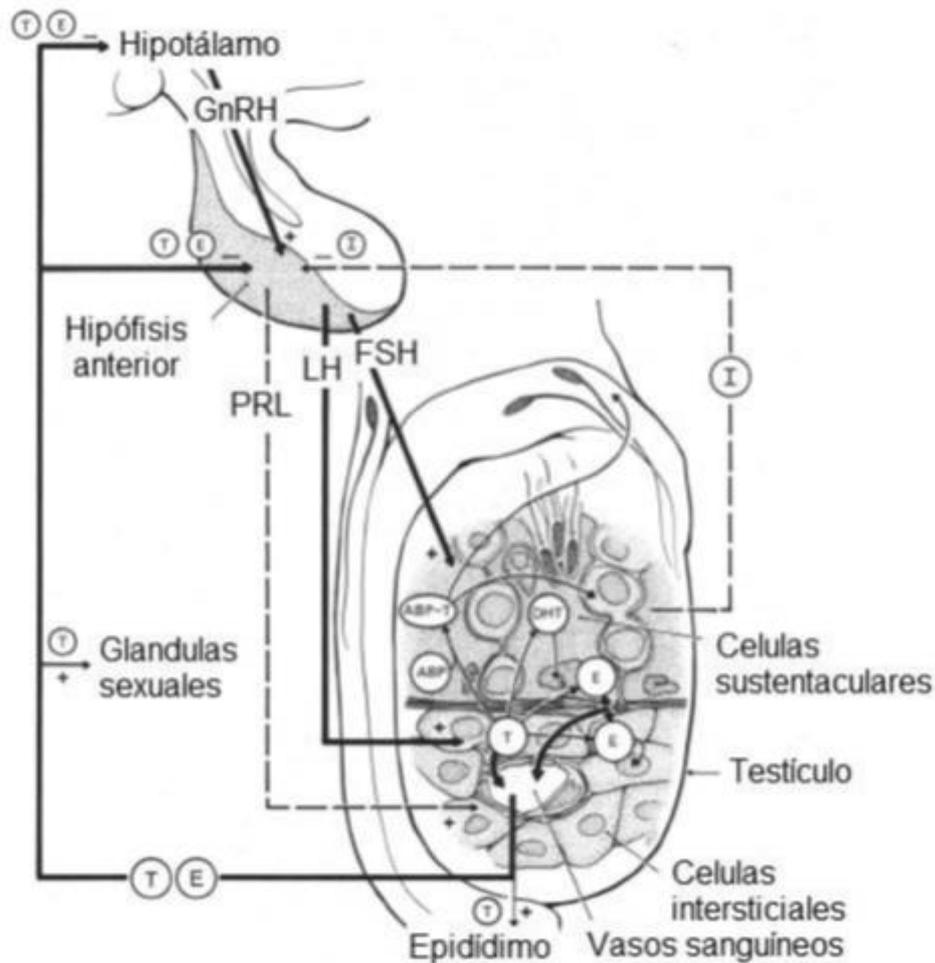


Figura 2. Endocrinología de la espermatogénesis (De Amann y Schanbacher, 1983).

2.4 Espermatogénesis

El macho produce espermatozoides mediante un proceso de división celular y diferenciación conocido como espermatogénesis. Los túbulos seminíferos de los testículos junto a las células de Sertoli son los encargados de realizar este proceso (Ross y Pawlina, 2007). Se conoce que la espermatogénesis consta de dos fases, la espermatocitogenesis la cual es representada por la fase proliferativa donde las espermatogonias se separan debido al proceso mitótico y es seguida por división meiótica dando origen a las células haploides (espermatidas) y la espermatogénesis es la fase donde se lleva a cabo la

diferenciación, la forma del espermatozoide es generada por la transformación del núcleo y el citoplasma de las espermidas (Pineda y Dooley et al., 2003).

El comienzo de la espermatocitogénesis es en base a la división mitótica de las espermatogonias, tipo A, intermediarias (solo existen en roedores) y tipo B (O'donnell *et al.*, 2006). Las numerosas divisiones mitóticas que las espermatogonias experimentan generan células germinales de reserva, mientras las otras se encuentran transformándose en espermatogonias intermedias y posteriormente en tipo B, estas se encuentran disponibles para formación de espermatozoides (Pineda y Dooley et al., 2003). Por último se lleva a cabo la división para la formación de los espermatocitos primarios que a su vez mediante un proceso meiótico dan origen a los espermatocitos secundarios y como resultado final se forman las espermatides (Amann y Schanbacher, 1983; Figura 3). La espermatocitogénesis concluye al formar las espermatides y da inicio a la espermiogénesis.

Espermiogénesis (espermioteliosis) se origina en los túbulos seminíferos y termina en el epidídimo (Pineda y Dooley et al., 2003). Durante la fase existe una la formación de dos estructuras sumamente importantes para la funcionalidad del espermatozoide, el flagelo y el acrosoma (O'donnell *et al.*, 2006).

Una vez finalizado el proceso de la meiosis, las espermatides tienen una forma redonda por lo tanto experimentan una serie de cambios morfológicos que lo conduzcan hasta obtener la forma que caracteriza al espermatozoide. Al momento de la elongación de las espermatidas, la cromatina se comienza a condensar y en el aparato de Golgi se empieza a sintetizar el contenido del acrosoma, cuyas vesículas una vez fusionadas formaran el acrosoma (O'Donnell *et al.*, 2011). En esta fase también se lleva a cabo la formación del flagelo, existiendo una concentración de más de 100 mitocondrias en la pieza

media, siendo las responsables del funcionamiento aeróbico del espermatozoide (Gadella y Luna, 2014). La mayor parte del citosol junto con los orgánulos de la espermatida (aparato de Golgi, retículo endoplásmico, lisosomas, peroxisomas y ribosomas) se remueve y con eso adquieren la forma que caracteriza al espermatozoide. Una vez completada la metamorfosis de la espermatida, se libera en el lumen del túbulo seminífero, se le conoce como espermiación a este proceso y a su vez determina el la cantidad de espermatozoides que alojan en el epidídimo y el número de células que contiene el eyaculado (Neto *et al.*, 2016;).

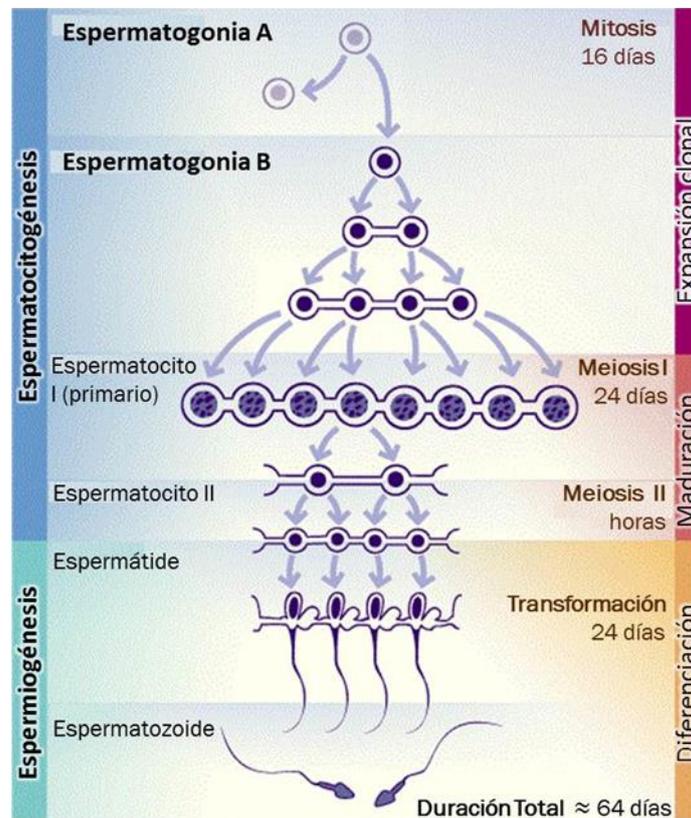


Figura 3 Esquematización de la espermatogénesis

2.5 Características seminales

2.5.1 Estructura espermática

La célula germinal en el macho es el espermatozoide, altamente especializado para cumplir una función biológica compleja, la cual es fecundar la célula germinal de la hembra (ovulo). Es una célula haploide, como producto final del proceso de la gametogénesis en el macho (espermatogénesis), en la que se encuentra la información genética paterna (Evans y Maxwell, 1990; Hidalgo, 2004; Blanco y García, 2004).

Según los estudios de Graham (1996) dice que las propiedades que deben de poseer los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: morfología normal, motilidad progresiva, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactiva, funcionalidad de la membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, capacidad de penetración.

La morfología del espermatozoide se divide en tres partes: la cabeza, donde contiene los cromosomas responsables de aportar la información genética X o Y, la pieza de conexión o cuello y la cola es el órgano que le da motilidad al espermatozoide (Evans y Maxwell, 1990).

La estructura espermática casi es general ya que es muy similar en la mayoría de las especies animales; sin embargo, la morfología externa es específica por especie. En cerdos y caballos la longitud del espermatozoide va desde 60 μm (micras) y en rumiantes hasta 75 μm (micras) (Blanco y García, 2004; Wrobel y Bergmann, 2006; Reece, 2010). Especialmente, el espermatozoide del macho cabrío tiene una longitud de 60 μm (micras), en el cual su cabeza mide de 8 a 10 μm de largo, 4 μm de ancho y 1 μm de grosor (Evans y Maxwell, 1990).

En el espermatozoide la cabeza es la responsable que exista una variedad en su forma según la especie, en el macho cabrío, el toro, el cerdo y el caballo es plana y ovoide; lo cual en el humano es aplastada y elipsoide; a diferencia que el de la rata es falciforme (Bonet et al., 2000, Blanco y García, 2004; Hidalgo, 2004; Wrobel y Bergmann, 2006).

2.5.2 Plasma seminal

Muiño-Blanco *et al.* (2008) hace mención en su estudio que el plasma seminal de los mamíferos es una secreción donde participan múltiples glándulas del aparato reproductor masculino, las cuales juegan un papel de suma importancia en el proceso de maduración de los espermatozoides.

Evans y Maxwell (1990); Reece (2010) señalan en sus estudios que el plasma seminal es un líquido neutro e isotónico, compuesto casi en su totalidad por agua (75%), también cuenta con sustancias orgánicas (fructosa, sorbitol, inositol, ácido cítrico, glicerilfosforilcolina, fosfolípidos, prostaglandinas y proteínas) y sustancias inorgánicas (sodio, potasio y cloro) que actúan como protectores y le brindan nutrientes a los espermatozoides.

En la investigación de Evans y Maxwell (1990) mencionan que los componentes orgánicos poseen un papel muy importante para el mantenimiento de la presión osmótica del semen, más que los iones inorgánicos, aunque se encuentren cantidades notables de estos últimos en el plasma seminal. Los componentes orgánicos son esenciales para el mantenimiento del metabolismo espermático y el pH, siendo que las proteínas son los

constituyentes más importantes de la función de los espermatozoides en los mamíferos (Muiño-Blanco *et al.*, 2008).

Rodriguez (2003) menciona que la mayoría de las proteínas del plasma seminal son producto de la secreción de la vesícula seminal, una glándula reproductiva accesoria que tienen los mamíferos machos. Una variedad de estas proteínas del plasma seminal son relativamente específicas para la regulación de la función espermática y fertilidad. Se conoce una familia de proteínas designadas BSP-A1, BSP-A2, A3 y BSP-BSP-30kDa, conocidas como BSP (proteínas del plasma seminal de bovino) las cuales constituyen la mayor fracción proteica en el plasma seminal del bovino. Las proteínas homólogas propias del macho cabrío son la GSP-14, GSP-15, GSP-20 y GSP-22 kDa (proteínas del plasma seminal de caprino) (Villemure *et al.*, 2003).

El plasma seminal regularmente es de un color blanco pero en el macho cabrío puede variar y el cual puede ser de color amarillento debido al contenido de riboflavina originada en las glándulas vesiculares (Evans y Maxwell 1990; Hafez y Hafez 2002).

2.6 Evaluación espermática

Evans y Maxwell (1990) mencionan que la primera valoración que se debe llevar a cabo del semen, es correspondiente a la valoración macroscópica, donde se determina cuidadosamente el volumen, el color, olor, viscosidad y densidad. Congregado a esto Bonet *et al.*, (2006); Cebrián *et al.*, (2010) señalan que una vez culminada la valoración macroscópica, se prosigue a evaluar las características microscópicas que comprenden la concentración, motilidad, morfología e integridad de membrana y tolerancia osmótica.

2.7 Apariencia y volumen

El color del semen del macho cabrío puede ser blanco grisáceo o amarillento, con variaciones de un eyaculado a otro, aun siendo el mismo semental. El volumen promedio de un eyaculado es de 1.2 ml. Sin embargo, este puede ser variable dependiendo de la edad, condición del corporal y método de recolección. La concentración espermática en el macho cabrío va desde de 3.5 a 6 millones de espermatozoides por mililitro y la consistencia puede variar desde clara-acuosa hasta cremosa espesa, esto va a depender de la relación de contenido entre sus dos constituyentes, espermatozoides y plasma seminal (Evans y Maxwell, 1990; Arrebola, 2012).

2.9 Motilidad espermática

Bonet *et al.* (2006); Furstoss *et al.* (2010); Sancho y Vilagran (2013) señala en sus estudios que un hecho característico del espermatozoide es su motilidad, la determinación puede proporcionar un medio relevantemente fácil como para notar la calidad de semen. Es el parámetro que más se utiliza al igual que la concentración espermática.

La motilidad espermática es caracteriza por breves impulsos de progresión, que a su vez son determinados por el movimiento de látigo de la cola y se combinan con un cambio de dirección de derecha a izquierda llevado a cabo por un movimiento simple de rotación de la cabeza en torno a su eje longitudinal (Salisbury y Vandemark 1964).

Según la investigación realizada por el Instituto Nacional de Capacitación del Sector Agropecuario (1983) menciona que se aprecia el movimiento mediante la observación directa en el microscopio de una gota de semen, la energía está marcada por el movimiento individual espermático y de la concentración. Si el número de células que se encuentran en

movimiento es alto hay una buena concentración, las células producirán un movimiento al cual se le conoce como olas. Este movimiento en masa se clasifica de la siguiente:

Muy bueno= ondas oscuras con un rápido movimiento.

Bueno= ondas aparentes con movimientos moderados.

Regular= movimiento poco perceptibles.

Malo= no forma ondas, células espermáticas móviles.

Muy malo= no existen células móviles.

2.10 Concentración espermática

La concentración espermática se define como la cantidad de espermatozoides por cada unidad de volumen (expresada en millones por ml) del eyaculado.

La concentración espermática es una de las valoraciones más importantes, debido a que la tasa de dilución es dependiente de ella y por ende la cantidad de dosis por eyaculado (Bonet *et al.* 2006; Cebrián *et al.* 2010). La fertilidad incrementa a medida que aumenta la concentración de espermatozoides por dosis, a partir de un determinado nivel ya no existe una mejor fertilidad (Bonet *et al.* 2006). En base a lo antes mencionado se han realizado varias investigaciones para determinar que concentración es la adecuada para llevar a cabo la inseminación artificial, esta concentración va desde $200 \times 10^6/\text{mL}$ hasta $400 \times 10^6/\text{ml}$. Según (Salamon y Maxwell, 1995; Leboeuf *et al.* 2000; Cseh *et al.* 2012; Faigl *et al.* 2012).

Existe una gran variedad de formas con las que se puede realizar este cálculo, las más utilizadas son las cámaras de recuento celular (Burker, Thoma y Makler) y las de menor medida son los contadores celulares electrónicos al igual que los programas informáticos de análisis seminal (Bonet *et al.* 2006; Cebrián *et al.* 2010; Sancho y Vilagran 2013).

2.11 Morfología espermática

El estudio que se realiza para la morfología espermática también es una prueba importante para la evaluación rutinaria del semen. Se demostró que es un indicador importante de la disminución de la fertilidad en humanos y gran parte de las especies animales (Gunalp *et al.*, 2001).

Las anomalías que se generan en la cabeza del espermatozoide se asocia con la disminución de la capacidad que tiene para unirse al ovulo y con la perdida embrionaria temprana, reducción de la fertilidad y calidad de los embriones (Hidalgo *et al.* 2002; Hidalgo *et al.* 2007; Maroto-Morales *et al.* 2010; Yániz *et al.* 2012).

La morfología espermática además de dar una referencia sobre el porcentaje de fertilidad del eyaculado, también permite la posibilidad de detectar alteraciones en la espermatogénesis y la maduración en el epidídimo (Bonet *et al.* 2006; Petrunkina y Harrison 2011).

Bonet *et al.* (2006); De la paz *et al.* (2011) plasmaron en sus investigaciones que la morfología espermática se puede evaluar de dos distintas maneras:

- 1) Por proporción relativa de las células, usando una categoría morfológica predeterminado mediante la observación en microscopio óptica y evaluando el impacto de las formas anormales en la capacidad fecundante de la muestra de semen.
- 2) cálculo morfométrico de los parámetros espermáticos básicos (cabeza, acrosoma, pieza intermedia), con sistemas informatizados y por definición de biotipos celulares básicos empleando técnicas estadísticas que permitan diagnosticar el potencial fecundante de las muestras observadas.

Los eyaculados de machos cabríos son considerados normales cuando el porcentaje de las formas anormales es menor al 15%. Las variaciones que se dan en la morfología espermática son presentadas debido al estrés, factor individual, temperatura y estación del año, las anomalías más frecuentes que se pueden llegar a encontrar en los espermatozoides con la ausencia de cola, cabeza grande, rotura del cuello, cola reducida, cabeza pequeña, cabeza adelgazada y acrosoma anormal (Evans y Maxwell 1990).

2.12 Dilución de semen

El objetivo de la dilución del eyaculado es aumentar el volumen y mantener una concentración espermática oportuna para darle servicio a un mayor número de hembras posibles. El título de la dilución necesita del volumen de inseminación (va a depender del tipo de inseminación como: vaginal, cervical, intrauterina) y con la concentración de los espermatozoides móviles con la que se va a inseminar, la cantidad de espermatozoides móviles se encuentra correlacionado con la fertilidad (Evans y Maxwell 1990; Ritar *et al.* 1990).

Existe una gran variación con la dilución aconsejada en semen caprino, ya que los mejores resultados se logran con títulos de dilución 1:10 y no con títulos de diluciones de 1:1 (Memmon y Ott 1981; Ritar *et al.* 1993).

Las diluciones que son superiores a 1:1 son la principal causa del disminución de la fertilidad. Por consiguiente, teniendo en cuenta lo antes citado, no se recomienda el uso de diluciones superiores a 1:5 para los eyaculados que tienen como fin elaborar dosis seminales para los programas de inseminación artificial (Salamon y Ritar 1982; Park 1989).

2.13 Refrigeración de semen caprino

El semen de los pequeños rumiantes puede mantenerse en un estado líquido a baja temperatura, las cuales pueden ser entre los 10 °C a 15°C o bien a 5 °C (0-5°C). En forma prioritaria se debe prolongar su capacidad fecundante al reducir la motilidad y el metabolismo de forma reversible (Fiser y Fairfull 1986; Mara *et al.* 2007; Cebrián *et al.* 2010).

Cebrián *et al.* (2010); Ashrafi *et al.* (2011) enfatizan en sus trabajos de investigación que cuando se haya diluido el semen a la concentración requerida, se necesita llevar a una temperatura de 15°C o 5°C siguiendo la curva de enfriamiento de -0.2°C a -0.3°C/minuto. Este proceso suele elaborarse mediante un baño termostatzado programado, 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.

2.14 Congelación de semen caprino

El procedimiento de congelación de semen se lleva a cabo en dos etapas, la de enfriamiento y la de congelación. Un punto importante que se debe de considerar antes de iniciar este procedimiento de congelación, es el método de adicionar un crioprotector penetrante, y puede realizarse en uno o dos pasos. Se puede añadir directamente el glicerol en el diluyente en una única etapa (un solo paso) de igual manera se puede agregar en una porción dividida del diluyente, en el momento que la muestra diluida haya alcanzado los 5°C (dos pasos) (Salamon y Maxwell 1995; Anel *et al.* 2003; Cebrián *et al.* 2010).

La etapa de enfriamiento es la duración en la que se lleva a cabo la adaptación de los espermatozoides a un metabolismo disminuido. Una vez que el semen sea diluido se enfría hasta los 5°C, a una velocidad de unos -0.2°C a -0.4°C/minuto. Ya que el semen diluido haya alcanzado los 5°C, se recomienda mantenerlo a esta temperatura durante un periodo de 1 hora y media a 2 horas, este proceso es conocido como equilibrado. Los espermatozoides permanecen en contacto con el glicerol durante este periodo antes de la congelación, logrando que el glicerol ingrese dentro de las células espermáticas y así se pueda establecer un equilibrio entre la concentración intracelular y extracelular, no específicamente de glicerol, sino también de todos los componentes osmóticamente activos (Evans y Mawell 1990; Salamon y Maxwell 1995; Salamon y Maxwell 2000; Cebrián *et al.* 2010).

La congelación se debe realizar a vapores de nitrógeno líquido, ya sea de forma manual o mecanizada (Cebrián *et al.* 2010). La velocidad a la que se congela el semen es regulada por la distancia que hay de las pajuelas a nivel del nitrógeno líquido (10°C a 100°C/minuto). Las pajuelas son expuestas a los vapores de nitrógeno líquido (-80 a -100°C) con una duración de 10 a 20 minutos y posteriormente son depositados directamente en el nitrógeno líquido (-196°C) (Dorado *et al.* 2009; Balcázar y Porras. 2008). Se debe tener en cuenta en base a la velocidad de congelación, que si la velocidad es excesivamente rápida, existe la formación de cristales de hielo intracelular, los que provocan serias lesiones e incluso la ruptura de la membrana plasmática. Y si ocurre lo contrario, que la velocidad sea excesivamente lenta, hay formación de cristales de hielo pero estos comienzan en el exterior de la célula, lo cual produce una salida de agua desde interior de la célula, para intentar compensar el aumento de la osmolaridad en el medio extracelular por ende la célula se deshidrata. La velocidad considerada optima en

congelación, varía por cada especie y donde envase, la velocidad es entre -10°C y $-80^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ (Cebrián *et al.* 2010).

2.15 Descongelamiento de semen

El proceso de descongelación es un punto crítico, ya que es de suma importancia al igual que el proceso de congelación para la supervivencia espermática. Junto a los daños que se ocasionan durante la congelación, los espermatozoides pueden deteriorarse si no se realiza de manera apropiada el proceso de descongelación. La regla que se toma en cuenta es, entre más rápido sea el congelamiento del semen, se debe descongelar más rápido, esto tiene el fin de lograr más rápida la recuperación de los espermatozoides. Siendo así el semen de los machos cabríos congelado, se tiene que descongelar a una temperatura de 37°C . Dichas muestras se pueden descongelar a velocidad rápida o lenta. Si las temperaturas son elevadas ($60-70^{\circ}\text{C}$) el ritmo de descongelación se incrementa. Y debido al descongelado rápido las células permanecen menor tiempo en contacto con los solutos y el crioprotector, por ende, la recuperación del equilibrio intracelular y extracelular se lleva a cabo más rápido. Pero al utilizar altas temperaturas por tiempos cortos, existe el riesgo de una exposición a temperaturas sobre el nivel crítico, pueden ser mortales para las estas células. Lo que se realiza con mayor frecuencia es descongelar el semen por inmersión a baño de agua atemperada a $35^{\circ}\text{C}-37^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 30 segundos o incluso a temperaturas de 50°C por un periodo de 9 segundos. (Evans y Maxwell 1990; Cebrián *et al.* 2010).

2.16 Vagina artificial

La elaboración de una vagina artificial consta de un tubo cilíndrico de plástico rígido y resistente, con las siguientes medidas: siete centímetros de diámetro y 35 a 40

centímetros de largo, cubierto internamente por una manga de goma las cuales se dobla sobre cada extremo del cilindro para formar una cámara que contendrá agua caliente con una temperatura de 45 a 46 ° C y aire, tiene como fin asemejar el estímulo adecuado en cuanto a temperatura y presión, para lograr la eyaculación del animal (Morillo *et al.*, 2012).

Para que el macho realice la monta se utiliza un maniquí o puede utilizarse una hembra. Antes y después de la colecta de semen se deben de considerar dos aspectos importantes: el estímulo del semental y la higiene (Rangel., 2007).

Siguiendo con la recolección del eyaculado del macho cabrío junto con la vagina artificial, previamente preparada, un operador diestro se debe colocar del lado derecho del macho, al momento que el animal intente de monta, se tiene que desviar el pene sosteniendo el prepucio con la mano izquierda con dirección al lado derecho, Con la mano derecha se sostiene la vagina artificial, se coloca en el extremo que se lubrico por delante del pene, y como resultado del estímulo (presión y temperatura) que asemeja la vagina de la hembra en celo, el macho cabrío penetra la vagina, llevando a cabo el golpe de lomo (Morillo *et al.*, 2012).

3. Objetivo

Evaluar In vitro, el impacto de un diluyente en base de liposomas y uno elaborado a base de proteína de yema de huevo sobre la calidad del seminal de machos cabríos, conservado mediante refrigeración.

4. Hipótesis

La calidad seminal crioconservada de los machos cabríos será mejor utilizando diluyentes a base de liposomas en comparación con el de proteína a base de yema de huevo en el semen refrigerado.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización del experimento

El presente estudio se llevó a cabo durante la época natural reproductiva de los machos cabríos (Primavera-invierno) en el norte de México en la posta caprina de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna en Torreón, Coahuila, en un sistema de producción intensivo de caprinos en las coordenadas (25° N, 103°O). Una región Subtropical con un clima semidesértico, con una precipitación pluvial promedio anual de 203 mm y una temperatura que oscila entre 6° C y 37° C (en invierno y verano, respectivamente).

5.2 Manejo de los animales

Se utilizaron cuatro machos caprinos multirraciales de la raza Alpino-Francés de dos años de edad con fertilidad probada mediante monta natural. Los machos cabríos fueron alimentados dos veces al día (10:00 y 18:00 hrs) con el sobrante de ganado lechero (17% PC y 1.5 EM), se les administraron sales minerales y agua a libre acceso, se les dio un periodo de adaptación durante 3 semanas previas al periodo de estudio.

5.3 Recolección y procesamiento del semen

La recolección del semen de los cuatro machos cabríos se realizó una vez por la mañana (08:00 hrs) en un intervalo de 7 días con una vagina artificial atemperada a 37° C, así mismo se utilizó una hembra en celo, como estímulo para realizar la colecta del semen.

Al término de cada extracción, el semen se colocó a baño maría a una temperatura de 37° C e inmediatamente se evaluó, la concentración, la motilidad masal y la viabilidad. la concentración se determinó a través del análisis fotométrico (Spermacue®, 12300/0500

Minitub, Landshut, Germany) utilizando semen sin diluir y expresado en 10^6 células; la motilidad masal se calculó utilizando una escala arbitraria de 1 a 5 (1=25% a 5=100% de espermatozoides motiles), con el que se necesitó el uso de un portaobjetos precalentado a 37° C y un microscopio en el objetivo X400; la viabilidad de los espermatozoides fue determinada utilizando eosina- nigrosina, una técnica estandarizada descrita por Kafi *et al.* (2004). Solo los eyaculados con una concentración $\geq 2.5 \times 10^9$ ml, motilidad masal ≥ 3.0 (escala 0-5) y viabilidad $\geq 85\%$ fueron los que se consideraron en el experimento. Las mediciones que fueron realizadas en el experimento las elaboro una sola persona.

5.4 Diluentes y proceso de crioconservación

En el proceso de crioconservación se utilizaron 2 diluyentes los cuales se componen de la siguiente manera:

Diluyente OP (Optidyl®, producto comercial; CRYO-VET, Francia), que difiere con el diluyente CY por el remplazo de lipoproteína de baja densidad por un 20% de yema de huevo.

Diluyente OX (OptiXcell®, producto comercial; IMV-Tecnologies, Francia), sin proteínas de yema de huevo con liposomas.

Las muestras de semen fueron sometidas a dos procesos para ser evaluadas: Enfriado de 37° C a 4° C, durante 2 horas (semen refrigerado, SR), y semen congelado (SC), para lo cual, con las muestras mantenidas en baño María se llenaron pajillas de 0.25 ml y se colocaron a 4 cm de nitrógeno líquido (vapores) por 10 min; al pasar este tiempo, se sumergieron en el nitrógeno y se guardaron hasta su análisis (Jerez *et al.*, 2016).

En cada uno de los diferentes estados de conservación (SR y SC) el semen se analizó para evaluar la motilidad, el porcentaje de viabilidad. En el caso del SC, la pajilla fue

descongelada siendo sumergida en agua atemperada a (37° C) durante un lapso de tiempo de 26 s.

5.5 Análisis estadístico

Los datos recopilados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) usando el procedimiento Modelo Lineal General (GLM). Las medias obtenidas de los parámetros seminales fueron comparadas usando una prueba de *t*. El ANOVA de las medidas repetidas fue realizado comparando los resultados a los diferentes diluentes, los estados del proceso de crioconservación y la interacción de estos. Todos los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc. Cary. NC. USA, V9.1). Las diferencias fueron consideradas significativas a un valor de $P \leq 0.05$.

6. Resultados

Los resultados obtenidos de los dos parámetros de calidad espermática que se evaluados en semen de machos cabríos diluido con Optidyl (OP), o OptiXcell (OX) y posteriormente evaluado en fresco (SF) y después de ser refrigerado durante 2 horas (SR) son resumidos en el cuadro 1.

Al ser analizados los efectos de los diferentes diluyentes utilizados sin importar las condiciones del semen, no se notaron diferencias significativas para el semen fresco en cada una de las variables evaluadas ($P>0.05$). En el semen fresco se obtuvieron valores similares independientemente del diluyente agregado en cada una de las variables evaluadas [motilidad (4.2 ± 0.3), viabilidad (75.44 ± 3.3) y normalidad (85.00 ± 3.5). La motilidad espermática disminuyó progresivamente después del proceso de refrigeración y congelación ($P<0.05$). Los valores de la motilidad fueron mayores en el semen refrigerado cuando fue diluido con OX y OP (4.00 ± 0.2 ; $P>0.05$), en comparación con el diluyente OP que presentó menor movimiento celular (3.00 ± 0.3 ; $P<0.05$).

Cuadro 1. Medias \pm EEM de motilidad (en escala de 1-5), viabilidad (%), normalidad (%), de semen de macho cabríos diluido con Optidyl citrato de yema de huevo (OP), o OptiXcell (OX) y posteriormente evaluado en fresco (SF), después de ser refrigerado durante 2 horas (SR).

	Fresco		Refrigerado por 2 h	
	OP	OX	OP	OX
Motilidad (1-5)	4.0 ± 0.3^a	4.3 ± 0.2^a	3.0 ± 0.3^b	4.0 ± 0.3^a
Viabilidad (%)	78.3 ± 3.9^a	74.5 ± 3.4^a	63.3 ± 3.4^{bc}	66.7 ± 3.4^{bc}
Normalidad (%)	85.5 ± 2.8^a	85.5 ± 2.8^a	87.0 ± 3.2^a	84.7 ± 2.8^a

a,b,c, d= Literales diferentes indican diferencia ($P<0.05$) entre los diluyentes utilizados (OP, OX) y los estados de conservación del semen (SF y SR).

El porcentaje de espermatozoides vivos se redujo después del proceso de refrigeración ($P < 0.05$). La viabilidad del semen refrigerado y diluido con OX fue superior a 65% seguido por los diluentes OP (63.25 ± 4.07 , $P > 0.05$), sin embargo, solo se mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) con el semen diluido con OP (52.75 ± 2.89) que obtuvo un menor porcentaje de células vivas.

7. Discusión

Los resultados del presente estudio mostraron no hubo un efecto de los diluyentes a base yema de huevo o liposoma en la motilidad, viabilidad y normatividad del semen de caprinos después refrigerado. Lo anterior, puede ser una alternativa para la crioconservación del semen, sin embargo, en otras especies como los equinos y venados, se ha reportado que el semen después de ser congelado, la motilidad seminal es mayor cuando este se ha diluido con diluyente en base a yema de huevo que con liposomas (Pillet et al., 2012; Stewart et al., 2016). Sin embargo, nuestros resultados concuerda con lo reportado, por Fleisch et al. (2016) quienes mencionan que en semen de toros huevo o liposomas, lo cual concuerda con nuestros resultados. Lo anterior, también está de acuerdo con Forouzanfar et al. (2010), quienes no encontraron diferencias en la motilidad y viabilidad espermática en semen de ovino crioconservado con diluyentes a base de yema de huevo y liposomas. Además, Stewart et al. (2016) demostraron que los diluyentes a base de liposomas en semen de venado cola blanca son efectivo para la crioconservación del semen, pero son superiores a diluyentes a base de yema de huevo. Una posible explicación a estas diferencias observadas en la motilidad espermática entre especies en los diferentes estudios, puede ser debido a la diferente composición de los diluyentes en base a yema de huevo y liposomas, y a la diferencia entre especies, especialmente cuando se considera la composición lipídica de la membrana plasmática (Kumar et al., 2015). En un trabajo realizado en semen de búfalo, mencionan que los diluyentes a base de liposomas son más eficientes comparado con los diluyentes a base de yema de huevo, los cuales pueden ser usados como crioprotectores, estos resultados, concuerdan a lo reportado por Ansari et al. (2016), quienes indican que los diluyentes liposomales a base de lípidos de grano de soya son eficientes para reemplazar los diluyentes elaborados a base a yema de huevo para congelar semen de bovino (Ansari et al., 2016). Esto debido a que se conoce que los

diluyentes liposomales son libres de proteínas de origen animal lo cual mejora la fertilidad sobre todo en ovicaprinos (Murphy et al., 2018). Las propiedades protectoras de los liposomas son atribuidas a los lípidos y colesterol que se transfiere entre la membranas liposomal y celular (Ansari et al., 2016), de tal manera, el efecto crioprotector de los liposomas depende de su tamaño, y el éxito relativo de cada método dependerá de la sensibilidad de cada célula al daño por el proceso (Garret et al., 1999; Röpke et al., 2011). Al respecto, bajo nuestras condiciones experimentales la sobrevivencia espermática se mantuvo mayor en el semen refrigerado y diluido a base de liposomas en comparación con el semen diluido a base de yema de huevo. En efecto, se ha relacionado que en el semen de caprinos y ovinos las enzimas bulbouretrales reaccionan con la yema de huevo causando una hidrólisis sobre la lecitina y triglicéridos presentes en la yema de huevo lo cual causa una alta toxicidad del semen (Menchaca et al., 2014).

Por otra parte, después de pasar el proceso de enfriamiento no se mostraron diferencias entre los diluyentes utilizados en nuestro estudio, es probable que lo anterior, se deba que los crioprotectores utilizados en este estudio aumentaron la resistencia del esperma al shock del frío en ambos tratamientos (Osuagwuh y Palomo, 2017).

Finalmente, en cuanto a la motilidad espermática el diluyente OP mostró una menor motilidad comparado con el OX. Esto resultados son similares a lo reportado por Thagilou et al. (2017) quienes reportaron el porcentaje medio de motilidad y viabilidad espermática de semen ovino diluido con yema de huevo y adicionado con ácidos grasos poliinsaturados y refrigerado por 3 h fue significativamente menor ($35,6 \pm 1,8\%$) comprado con el grupo control ($43,1 \pm 1,8\%$). Lo anterior, se puede atribuir a que el OP diferencia de los elaborados a base de yema de huevo no cuenta con citrato de sodio, aun cuando los dos son base de yema de huevo, se conoce que esta último ayuda a disminuir la presencia de altos niveles de ácidos grasos polinsaturados en la membrana espermática que hacen que el esperma

se mas más susceptible a la peroxidación, aunado a una acción dispersante de los glóbulos grasos de la yema de huevo (Cerolini et al., 2001).

En conjunto, los resultados aquí mostrados y los datos de la literatura muestran que el nivel de protección de un diluyente depende fuertemente de varios factores y del procesamiento del semen (Fleisch et al., 2017). En el caso particular los diluyentes con liposomas pueden proteger la membrana plasmática a través de vesículas artificiales compuestas por una o varias capas biológicas de lípidos concéntricos, que tienen la capacidad de encapsular moléculas (Pillet et al., 2012; Belala et al., 2016).

7. Conclusiones

Los resultados del estudio han demostrado que al emplear los diluyentes a base de liposomas son más eficaces para la protección del semen refrigerado de machos cabríos en comparación a los diluyentes a base de yema de huevo.

8. Literatura citada

- Aisen, E. G., Medina, V. H., & Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57(7), 1801-1808.
- Alcay, S., Toker, M. B., Gokce, E., Ustuner, B., Onder, N. T., Sagirkaya, H., & Soylu, M. K. (2015). Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. *Cryobiology*, 71(2), 329-333.
- Amann RP, Schanbacher BD. 1983. Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science*, 57: 380-403.
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gérard, O., Courtens, J. L., & Anton, M. (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61(5), 895-907.
- 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*.
- Ansari, M. S., Rakha, B. A., Akhter, S., & Ashiq, M. (2016). OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. *Theriogenology*, 85(3), 528-532.
- Arando, A., Gonzalez, A., Delgado, J. V., Arrebola, F. A., & Perez-Marín, C. C. (2017). Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification. *Animal Reproduction Science*, 181, 175-185.
- 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, Najjian H, Bahreini M, Mirzakhani H. 2011. Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa. *BMC Research Notes*.
- Balcázar SJA, Porras AAI. 2008. Manual de prácticas en manejo reproductivo de ovinos y caprinos. Mexico: UNAM.
- Belala, R., Briand-Amirat, L., Vinciguerra, L., Tainturier, D., Kaidi, R., Thorin, C., & Bencharif, D. (2016). Effect of equilibration time on the motility and functional integrity of canine spermatozoa frozen in three different extenders. *Research in veterinary science*, 106, 66-73.
- Blache, D., Maloney, S.K., Revell, D. k., 2008. Use and limitations of alternative feed resources to sustain and improve reproductive performance in sheep and goats. *Anim Feed Sci Tech*. 147, 140-157.
- Blanco RA, García MJ. 2004. Capítulo 16: Aparato genital masculino. In: Vázquez OA, Blanco RA. *Tratado de historia veterinaria*. España: Masson. P 363-379.
- 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.
- 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.
- Cerolini, S., Maldjian, A., Pizzi, F., & Gliozzi, T. M. (2001). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*, 121(3), 395-401.
- 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 paz P, Mata-Campuzano M, Tizado JE, Alvarez M, Álvarez-Rodríguez M, Herraiz P, Anel L. 2011. The relationship between ram sperm head morphometry and fertility depends on the procedures of acquisition. *Theriogenology*.
- 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.
- Delgadillo, J. A., Carrillo, E., Morán, J., Duarte, G., Chemineau, P., Malpoux, B., 2001. Induction of sexual activity of male creole goats in subtropical northern México using long days and melatonin. *J Anim Sci.* 79, 2245-2252.
- Delgadillo, J.A. 2011. Environmental and social cues can be used in combination to develop sustainable breeding techniques for goat reproduction in the subtropic. *Animal* 5: 1-8.
- De la Rosa Carbajal, Sebastián. 2011 Manual de producción caprina. 1ª edición. Formosa.
- 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*.
- Faig 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.
- Evans G, Maxwell WMC. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. España: Acribia.
- Fatet, A., Teresa-María, P.R., Leboeuf, B., 2011. Reproductive cycle of goats. *Anim Reprod Sci.* 124, 2011- 219.
- 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.
- Fleisch, A., Malama, E., Witschi, U., Leiding, C., Siuda, M., Janett, F., & Bollwein, H. (2017). Effects of an extension of the equilibration period up to 96 hours on the characteristics of cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 89, 255-262.
- Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S. M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., ... & Nasr-Esfahani, M. H. (2010). In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 73(4), 480-487.
- 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.
- Gadella B, Luna C. 2014. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. 81; 74-84
- Garrett, F. E., Goel, S., Yasul, J., & Koch, R. A. (1999). Liposomes fuse with sperm cells and induce activation by delivery of impermeant agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1417(1), 77-88.
- Gareth Evans, WMC Maxwell. (1990). Salomon's Artificial Insemination of sheep and goats. España: Acribia. s.a; P 204.

- Goericke-Pesch S, Klaus D, Failing K, Wehrend A. 2012. Longevity of chilled canine semen comparing different extenders. *Anim Reprod Sci.* 135: 97–105.
- 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.*
- Gürler, H., Malama, E., Heppelmann, M., Calisici, O., Leiding, C., Kastelic, J. P., & Bollwein, H. (2016). Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, 86(2), 562-571.
- Hafez B, Hafez ESE. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales; Ed. INTERAMERICANA Mc GRAW-HILL; ed. 7ª; México, D.F.
- 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 PM. 2004. Estudio del efecto de la congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos del espermatozoide de macho cabrío. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba. Córdoba.
- Hidalgo M, Rodríguez I, Pérez C, Dorado J, Sanz J, Sánchez M. 2002. Parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide del macho cabrío. SEOC.
- Instituto Nacional de Capacitación del Sector Agropecuario, 1983. Inseminación artificial en ganado bovino, segunda parte. México D.F.
- 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.
- Jerez, R., González, N., Olacirequi, M., Luño, V., de Blas, I., & Gil, L. (2016). Use of soy milk combined with different cryoprotectants for the ram semen cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 134, 34-38.
- Kaeoket, K., Sang-urai, P., Thamniyom, A., Chanapiwat, P., & Techakumphu, M. (2010). Effect of docosahexaenoic acid on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. *Reproduction in domestic animals*, 45(3), 458-463.
- Koeslag J.H. 1982. Cabras. Manual para educación agropecuaria Área: producción animal SEP/Trillas México.
- 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(3), 327-331.
- Kumar, P., Saini, M., Kumar, D., Balhara, A. K., Yadav, S. P., Singh, P., & Yadav, P. S. (2015). Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*, 159, 38–45.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen from artificial insemination. *Animal reproduction science*; 62: 113-141.
- Malpaux, B., 2006. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*, Third Edition, Ed. JD Neill. Amsterdam: Elsevier 2231-2281.
- Mara L, Dattena M, Pilichi S, Sanna D, Branca A, Cappani P. 2007. Effect of different diluents on goat semen fertility. *Animal reproduction science.*
- 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.*
- Martin-Rillo MS, Martinez, E. Garcia, A. C., De Alba, C. 1996. Boar semen evaluation in practice. *Reproduction in domestic animal*; 31:519-526.

- Martin, G.B., Rodger, J., Blache, D. 2004. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. *Reprod Fert Dev.* 16: 491-501.
- Memmon M.A & OTT, RS. 1981. Methods of semen preservation an artificial insemination in sheep and goats. *Animal Reoproduction.*
- Menchaca A, Pinczak A, Queirola 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.
- 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.
- Murphy, E. M., O'Meara, C., Eivers, B., Lonergan, P., & Fair, S. (2018). Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on in vitro sperm kinematics and in vivo fertility of frozen-thawed bull semen. *Animal reproduction science*, 191, 70-75.
- 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. Edocrine 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. *Spermioogenesis.* 1: 14-35.
- Osuagwuh, U. I., & Palomo, M. J. (2017). Effect of semen washing on thawed ram spermatozoa subjected to a four hour post-thawing thermal evaluation test. *Small Ruminant Research*, 155, 81-86.
- 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.*
- Petrunkina AM, Harrison RAP. 2011. Cytometric solutions in veterinary Andrology: Developments, Advantages, and limitations. *Cytometry Part A;* 79A: 338-348.
- Pillet, E., Labbe, C., Batellier, F., Duchamp, G., Beaumal, V., Anton, M., & Magistrini, M. (2012). Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology*, 77(2), 268-279.
- Pineda, M. H., & Dooley, M. P. 2003. McDonald's veterinary endocrinology and reproduction. 5a Edición.
- Rangel P.L.E. 2007. Evaluación de la salud de sementales bovinos. *Reproducción bovina*, FMVZ-UNAM.
- Reece WO. . 2010. Capítulo 38: Reproduccion del macho en mamíferos. In: *Dukes fisiología de los animales domesticos.* 12ª ed. España: Acribia.
- Restall, B.J., 1992. Seasonal variation in reproductive activity in Australian goats. *Anim Reprod Sci.* 27, 305-318.
- 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.*
- Ritar A.J., Ball P.D & O'MAY Pi. 1990. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reproduction and fertility Development.*
- Rodriguez-Martinez H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia. *Reproduction domestic animals* 312-318.
- Röpke, T., Oldenhof, H., Leiding, C., Sieme, H., Bollwein, H., & Wolkers, W. F. (2011). Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology*, 76(8), 1465-1472.

- Ross MH, Pawlina W. 2007. Histología. Ed. Médica Panamericana.
- Roser JF. 2001. Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. *Anim Reprod Sci.* 68: 139-151.
- 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 of 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, Pág: 471-516.
- Stewart, J. L., Shipley, C. F., Katich, A. S., Po, E., Ellerbrock, R. E., Lima, F. S., & Canisso, I. F. (2016). Cryopreservation of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) semen using soybean-, liposome-, and egg yolk-based extenders. *Animal reproduction science*, 171, 7-16.
- Swami, D. S., Kumar, P., Malik, R. K., Saini, M., Kumar, D., & Jan, M. H. (2017). Cysteamine supplementation revealed detrimental effect on cryosurvival of buffalo sperm based on computer-assisted semen analysis and oxidative parameters. *Animal reproduction science*, 177, 56-64.
- Taghilou, P., Rostami, B., Masoumi, R., & Mirzaei-Alamouti, H. (2017). Effects of supplementation of the Tris-egg yolk extender with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on frozen-thawed ram semen characteristics. *Small Ruminant Research*, 155, 1-5.
- Thiery, J.C., Chemineau, P., Hernandez, X., Migaud, M., Malpoux, B., 2002. Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domest Anim Endocrinol* 23, 87-100.
- Ungerfeld, R., Forsberg, M., Rubianes, E., 2004. Overview of the response of anestrus ewes to the ram effect. *Reprod Fertil Dev.* 16, 479-490.
- 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.*
- Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Norton, B.W., Scaramuzzi, R.J., Martin, G.B., 1994. Effect of nutrition on seasonal patterns of LH, FSH and testosterone concentration, testicular mass, sebaceous gland volume and odour in Australian Cashmere goats. *J Reprod Fertil.* 102, 351-360.
- 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.*
- Yang, D. H., Standley, N. T., & Xu, Z. Z. (2018). Application of liquid semen technology under the seasonal dairy production system in New Zealand. *Animal Reproduction Science.*
- Fleisch, A., Malama, E., Witschi, U., Leiding, C., Siuda, M., Janett, F., & Bollwein, H. (2017). Effects of an extension of the equilibration period up to 96 hours on the characteristics of cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 89, 255-262.