UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS PECUARIAS

EVALUACIÓN DE DILUYENTES COMERCIALES SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN CONGELADO CAPRINO.

BOLÍVAR SAMUEL SOSA MADRID

8-791-1967

DAVID, CHIRIQUÍ

REPÚBLICA DE PANAMÁ

2009

EVALUACIÓN DE DILUYENTES COMERCIALES SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN CONGELADO CAPRINO.

TRABAJO DE GRADUACIÓN
SOMETIDO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS PECUARIAS

PERMISO PARA SU PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DEBE SER OBTENIDA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

APROBADO:

DR. REINALDO DE ARMAS, Ph.D. _____
DIRECTOR

DR. ROBERTO ALZAMORA, M.Sc. _____
MIEMBRO

MANUEL DE GRACIA, Ph.D. _____
MIEMBRO

DAVID, CHIRIQUÍ

REPÚBLICA DE PANAMÁ

2009

AGRADECIEMIENTO

Quiero darle gracias a DIOS misericordioso, a JESUSCRISTO nuestro salvador, por darme su gracia para vivir en su Fe, por acompañarme en el camino de la vida, por ser el guía de mis pasos e iluminar el sendero cuando mi voluntad está en la oscuridad. Porque mis palabras no son suficientes para darte gracias por otorgarme la existencia; “GRACIAS SEÑOR”, por permitirme finalizar esta etapa de la vida.

Agradezco a mis padres, por su valioso tiempo y por el financiamiento de mi carrera universitaria y de este proyecto de investigación.

De igual forma, quiero darle las gracias a mi amigo y compañero Farley Canto y a su familia por su hospitalidad y ayuda desinteresada para la culminación del proceso de experimentación.

A la Dirección de Ganadería del Ministerio de Desarrollo Agropecuario, en especial al Coordinador del Centro Nacional Caprino de Reproducción Asistida (CENCRA) y a todo su personal, por brindarme los animales y elementos necesarios.

Gracias también, a mis hermanos, familiares, profesores, amigos, compañeros y a todos los que de alguna forma directa o indirecta, contribuyeron a mi desarrollo y progreso profesional.

Les agradece sinceramente,

Bolívar Samuel Sosa Madrid

DEDICATORIA

Deseo presentar este documento como una expresión de cariño a mis padres, Bolívar Sosa Rodríguez y Nereida Madrid de Sosa, porque han sido ellos los que me dieron algo que muchos panameños carecen en su crecimiento, me ofrecieron y me criaron en un “Hogar” y me enseñaron la mejor lección de la vida: “Que nada tiene sentido, sin el amor de DIOS”.

Además, a los mejores hermanos, Salomón y Gwendoline, cuyos lazos filiales siempre han sido inmensos y han representado el sostén de las acertadas decisiones de mi vida. En fin, a mi familia, por estar siempre conmigo, para que pueden ver hoy, algo del fruto de su aliento, consejo y apoyo en mis metas trazadas.

Les ama mucho;

Samuel

EVALUACIÓN DE DILUYENTES COMERCIALES SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN CONGELADO CAPRINO.

Sosa Madrid, B. S. 2009. Evaluación de Diluyentes Comerciales sobre la Calidad del Semen Congelado Caprino. Tesis de Ingeniero Agrónomo Zootecnicta, Chiriquí, Panamá. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Panamá. 178p.

RESUMEN

El diluyente utilizado tiene gran efecto en los resultados de fertilidad con semen congelado, ya que el plasma seminal caprino es alto en fosfolipasa A; produciendo estas, efectos nocivos sobre los espermatozoides, al ser utilizados diluyentes con adición de compuestos de origen animal (yema de huevo). Por tal razón, se efectuó una evaluación de estos diluyentes, versus los que no utilizan esta clase de compuestos (surfactantes vegetales). La investigación se hizo en el Centro Nacional Caprino de Reproducción Asistida durante 105 días, utilizando cuatro machos (Alpino Francés y Toguenburg). A estos, se les recogió tres colectas seminales por semana, dividida en tres partes, aplicándose en ellas tres tratamientos: en el T1 se utilizó un diluyente comercial con agregado de 2.0% de yema de huevo; el T2 se sometió a un lavado de los espermatozoides con posterior adición del diluyente con yema de huevo al 12.0%; y el T3, utilizó uno con surfactantes vegetales. Después de la congelación y descongelación, se determinó: motilidad masal, motilidad individual progresiva, porcentaje de espermatozoides vivos, morfoanomalías totales de los espermatozoides y proporción de morfoanomalías primaras y secundarias; a las 0, 48 y 96 horas post-congelación como también a la cero y dos horas post-descongelación. El estudio determinó diferencias altamente significativas ($P < 0.01$), en todas las variables de calidad seminal; tanto a la cero hora, como a las dos horas post-descongelación. El diluyente con 12.0% presento los mejores resultados en motilidad individual progresiva (46.4% T2, 42.3% T3 y 35.2% T1), mientras que el diluyente con surfactante vegetales demostró resultados positivos en el porcentaje de espermatozoides vivos y morfoanomalías totales. El diluyente con 2.0% mostró los peores resultados. Con respecto a los machos cabríos, los dos machos alpinos francés resistieron mejor el proceso de criopreservación. En cuanto al tiempo post-congelación, solo influyo en algunos parámetros. No obstante, es necesario el análisis biológico con estos diluyentes.

Palabras claves: Semen, diluyente, caprino, criopreservación, macho cabrío, calidad seminal.

EVALUATION OF COMMERCIAL EXTENDERS ON QUALITY OF FROZEN GOAT SEMEN

Sosa Madrid, B. S. 2009. Evaluation of Commercial Extenders on Quality of Frozen Goat Semen. Thesis on Zootech Agronomy Engineering, Chiriquí, Panama. F.C.A., UP. 178p.

ABSTRACT

The used extender has big effect in the results of fertility with frozen semen, since the caprine seminal plasma is high in phospholipase A; producing these, harmful effects on the spermatozoids, due to the use of extenders containing animal origin compounds (egg yolk).Therefore, it was evaluated this extender types, on those non-animal origin compound extender (vegetables surfactant). The research was done in the National Caprine Center of Assisted Reproduction for 105 days, using four bucks (French Alpine and Toguenburg). Three seminal collections were gathered every week, divided in three parts and three treatments were applied: in the T1, a commercial extender was used with 2.0% egg yolk added; in the T2, collections were surrendered to a wash of the sperms with later addition of extender with 12.0% egg yolk; and the T3, used extender with vegetables surfactant. After freezing and thawing, values for motility in mass, individual progressive motility, percentage of alive spermatozoids, total abnormal morphology of the sperms and proportion of primary and secondary abnormal morphology were determined at 0, 48 and 96 hours post-freezing and also at zero and two hours post-thawing. The study determined highly significant differences ($P < 0.01$), in all the variables of seminal quality as at zero hour as at two hours post-thawing. The extender with 12.0% display the best results in individual progressive motility (46.4% T2, 42.3% T3 and 35.2% T1), whereas the extender with vegetables surfactant demonstrated better results in the percentage of alive spermatozoids and total abnormal morphology. The extender with 2.0% showed the worst results. Regarding goat males, two french alpine bucks resisted better the process of cryopreservation. As for the post-freezing time, only influences some parameters. Nevertheless, it is necessary the biological analysis with these extenders.

Key words: Semen, extenders, caprine, cryopreservation, goat male, seminal quality.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO..... iii

DEDICATORIA..... iv

RESUMEN..... v

ABSTRACT..... vi

ÍNDICE DE CONTENIDO..... vii

ÍNDICE DE CUADROS..... xiii

ÍNDICE DE FIGURAS..... xvi

ÍNDICE DE ANEXOS..... xviii

I. INTRODUCCIÓN..... 1

1.1. Planteamiento del Problema a Investigar..... 2

1.2. Antecedentes..... 4

1.3. Justificación..... 7

1.4. Objetivos..... 8

1.4.1. Objetivo General..... 8

1.4.2. Objetivos Específicos..... 8

1.5. Hipótesis..... 9

1.6. Alcances y Limitaciones del Estudio..... 10

1.6.1. Alcances del Estudio..... 10

1.6.2. Limitaciones del Estudio..... 10

II. REVISIÓN DE LITERATURA..... 12

2.1. Anatomía y Fisiología del Aparato Reproductor del Macho Cabrío..... 12

2.1.1. Anatomía del Sistema Reproductor del Macho Cabrío…….. 12

2.1.1.1. Los Testículos……. 12

2.1.1.2. Saco Escrotal…….. 14

2.1.1.3. Epidídimo……. 15

2.1.1.4. Glándulas Sexuales Accesorias…….. 16

2.1.1.5. Conductos Deferentes…….. 17

2.1.1.6. Pene……. 17

2.1.1.7. Prepucio…….. 18

2.1.2. Fisiología de la Reproducción del Macho Cabrío…… 19

2.1.2.1. Pubertad…….. 19

2.1.2.2. Control Hormonal del Sistema Reproductivo…… 20

a) Espermatogénesis……... 20

b) Control de la Función Testicular y Órganos Reproductivos … 22

c) Esteroidogénesis……. 25

2.1.2.3. Comportamiento Sexual y Cubrición…….. 27

2.2. Características del Semen Caprino……. 29

2.2.1. Composición del Semen…….. 29

2.2.1.1. Plasma Seminal……. 29

2.2.1.2. Espermatozoides…… 31

a) Estructura del Espermatozoide……. 31

b) Fisiología y Metabolismo de los Espermatozoides……... 33

2.2.2. Características Físico-Químicas del Semen …… 35

2.2.2.1. Color……. 35

2.2.2.2. Volumen…….. 35

2.2.2.3. Concentración de Células Espermáticas……... 35

2.2.2.4. Densidad y Viscosidad…….. 36

2.2.2.5. pH…… 37

2.2.2.6. Solutos…….. 37

2.2.3. Factores Correlacionados a la Vitalidad Espermática…… 38

2.2.4. Valoración y Contrastación Seminal…….. 41

2.2.4.1. Análisis Macroscópico……... 42

a) Volumen…… 42

b) Aspecto Físico…….. 42

2.2.4.2. Análisis Microscópico…… 43

a) Motilidad…… 43

- Motilidad Masal…… 44
- Motilidad Individual Progresiva……. 45

b) Vigor…… 46

c) Concentración de Células Espermáticas……. 46

d) Proporción de Vivos y Muertos……. 47

e) Morfoanomalías en Células Espermáticas…….. 48

- Morfoanomalías Primarias y Secundarias…….. 50
- Morfoanomalías Mayores o Menores…….. 52
- Otras Células……... 53

f) Integridad Acrosomal…….. 53

g) Endósmosis o Prueba de Permeabilidad de Membrana…….... 54

2.2.4.3. Análisis Bioquímico…… 55

a) Índice de Fructólisis…… 56

b) Producción de Ácido Láctico, Ácido Cítrico y Otros…….. 56

2.2.4.4. Análisis Biológico……... 57

2.3. Selección y Preparación de Machos para Colecta Seminal…… 58

2.3.1. Métodos de Recolección Seminal…….. 58

2.3.1.1. Recuperación Pos-coital……... 58

2.3.1.2. Electroeyaculación……. 59

2.3.1.3. Vagina Artificial……... 60

2.3.2. Factores relacionados a la Selección y Preparación del Semental Caprino…….. 63

2.3.3. Entrenamiento de los Machos Cabríos para la Recolección Seminal 66

2.4. Dilución y Diluyentes para la Criopreservación de los Espermatozoides…….. 68

2.4.1. Principios de la Dilución……... 68

2.4.2. Diluyentes para Semen…… 69

2.4.2.1. Composición General…… 69

2.4.2.2. Clasificación de los Crioprotectores y Diluyentes……. 70

a) Crioprotectores Penetrantes y No-Penetrantes…….. 70

b) Diluyentes para Semen Refrigerado…… 70

- Compuesto de Origen Animal……. 71
- Compuesto de Origen Vegetal…… 72

c) Diluyentes para Semen Congelado…… 73

d) Diluyentes Naturales y Sintéticos/Comerciales…….. 74
2.4.3. Métodos de Dilución……. 75
2.4.3.1. Dilución Directa…….. 76
2.4.3.2. Dilución por Pasos……. 76
2.5. Criopreservación del Semen Congelado Caprino…….. 78
2.5.1. Antecedentes Técnicos de la Congelación de Semen…….. 79
2.5.2. Equipo para Congelar y Manejo apropiado de Materiales…… 79
2.5.3. Técnicas de Congelación de Semen…..……. 80
2.5.3.1. Congelación en Pellets y Ampollas……. 82
2.5.3.2. Congelación en Pajuelas…….. 84
2.5.4. Proceso de Criopreservación a -196 °C…….. 85
2.5.4.1. Procesos Físicos de la Célula durante la Congelación…… 86
2.5.5. Proceso de Descongelación del Semen Criopreservado……. 88
2.5.5.1. Descongelación según Tipo de Envase……. 89
2.5.5.2. Daños Celulares durante la Descongelación…… 90
III. MATERIALES Y MÉTODOS…….. 93
3.1. Localización de la Investigación…… 93
3.2. Duración de la Investigación…….. 93
3.3. Materiales…….. 93
3.3.1. Animales Experimentales / Machos Cabríos…….. 93
3.3.2. Cabras o Hembras Caprinas……. 94
3.3.3. Diluyentes……. 95
3.3.4. Material para la Recolecta del Semen……. 95

3.3.5. Material para la Conservación del Semen…….. 95

3.3.6. Material para Obtener Parámetros de Calidad Seminal…….. 96

3.4. Métodos……. 96

3.4.1. Metodología Experimental……. 96

3.4.1.1. Evaluación Andrológica……. 96

3.4.1.2. Entrenamiento y Preparación de Sementales……... 97

3.4.1.3. Recolecta y Evaluación Seminal……. 97

3.4.1.4. Tratamientos……..... 98

3.4.1.5. Congelación, Descongelación y Análisis en Laboratorio……. 99

3.4.2. Parámetros a Evaluar y Diseño Experimental……... 103

IV. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN…… 106

V. CONCLUSIONES…… 135

VI. RECOMENDACIONES…… 136

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS……... 137

ANEXOS..... 151

INDICE DE CUADROS

CUADRO I. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE DIFERENTES ESPECIES…….. 36

CUADRO II. CONCENTRACIONES DE Na, K Y Ca EN LOS LÍQUIDOS DE VARIAS LOCALIZACIONES DE LAS VÍAS REPRODUCTORAS DE OCHO MACHOS CABRÍOS (MG/100 ML)…….. 38

CUADRO III. EFECTO DE LA ELIMINACIÓN DEL PLASMA SEMINAL SOBRE LA CALIDAD POST- CONGELACIÓN DEL SEMEN CAPRINO…… 78

CUADRO IV. CRITERIOS DE SELECCIÓN POR EVALUACIÓN SEMINAL…… 98

CUADRO V. COMPOSICIÓN DE DILUYENTE POR TRATAMIENTO….. 99

CUADRO VI. PUNTAJE SUBJETIVO PARA MOTILIDAD MASAL…….. 101

CUADRO VII. CLASIFICACIÓN DE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA… 103

CUADRO VIII. RESUMEN DE SELECCIÓN POR EVALUACIÓN ANDROLÓGICA Y SEMINAL…….. 106

CUADRO IX. PROMEDIOS DE PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL/MACHO CABRÍO…… 108

CUADRO X. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA MOTILIDAD MASAL. 0-HORAS POST DESCONGELACIÓN……. 109

CUADRO XI. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA MOTILIDAD MASAL. 2-HORAS POST- DESCONGELACIÓN…… 109

CUADRO XII. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA MOTILIDAD INDIVIDUAL PROGRESIVA. 0-HORAS POST- DESCONGELACIÓN….. 110

CUADRO XIII. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA MOTILIDAD INDIVIDUAL PROGRESIVA. 2-HORAS POST- DESCONGELACIÓN….. 111

CUADRO XIV. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA ESPERMATOZOIDES VIVOS. 0-HORAS POST- DESCONGELACIÓN……. 112

CUADRO XV. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA ESPERMATOZOIDES VIVOS. 2-HORAS POST- DESCONGELACIÓN……. 112

CUADRO XVI. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA MORFOANOMALÍAS TOTALES. 0-HORAS POST- DESCONGELACIÓN……... 113

CUADRO XVII. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA MORFOANOMALÍAS TOTALES. 2-HORAS POST- DESCONGELACIÓN……... 114

CUADRO XVIII. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PROPORCIÓN DE MORFOANOMALÍAS PRIMARIAS / SECUNDARIAS. 0-HORAS POST- DESCONGELACIÓN……... 115

CUADRO XIX. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PROPORCIÓN DE MORFOANOMALÍAS PRIMARIAS / SECUNDARIAS. 2-HORAS POST- DESCONGELACIÓN……... 115

CUADRO XX. COMPARACIONES DE MEDIAS POR TUKEY PARA DILUYENTE……... 118

CUADRO XXI. COMPARACIONES DE MEDIAS POR TUKEY PARA MACHO CABRIO…….. 123

CUADRO XXII. COMPARACIONES DE MEDIAS POR TUKEY PARA TIEMPO POST-CONGELACIÓN…… 125

CUADRO XXIII. DIFERENCIAS PORCENTUALES ENTRE EL TIEMPO POST-DESCONGELACIÓN (DE CERO A DOS HORAS)…. 128

CUADRO XXIV. RESUMEN DE COMPARACIONES DE MEDIAS POR TUKEY EN LAS FUENTES DE VARIACIÓN: DILUYENTE, MACHO CABRÍO Y TIEMPO POST-CONGELACIÓN, A LA 0-HORA POST-DESCONGELACIÓN…… 130

CUADRO XXV. RESUMEN DE COMPARACIONES DE MEDIAS POR TUKEY EN LAS FUENTES DE VARIACIÓN: DILUYENTE, MACHO CABRÍO Y TIEMPO POST-CONGELACIÓN, A LAS 2-HORAS POST-DESCONGELACIÓN…… 131

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO CABRÍO……. 13

FIGURA 2. PENE DEL MACHO CABRÍO…… 18

FIGURA 3. CONTROL HORMONAL DE LA ACTIVIDAD SEXUAL DEL MACHO……. 24

FIGURA 4. METABOLISMO DE LOS ANDRÓGENOS……. 26

FIGURA 5. ETAPAS DEL COMPORTAMIENTO SEXUAL DEL MACHO CABRÍO……. 28

FIGURA 6. ESTRUCTURA DE LOS ESPERMATOZOIDES…… 32

FIGURA 7. ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS MEDIANTE TINCIÓN EOSINA Y NIGROSINA…… 48

FIGURA 8. TÉCNICA PARA LA PREPARACIÓN DE FROTIS DE SEMEN TEÑIDO…….. 50

FIGURA 9. MORFOANOMALÍAS PRIMARIAS……... 51

FIGURA 10. MORFOANOMALÍAS SECUNDARIAS…… 52

FIGURA 11. PRUEBA DE ENDÓSMOSIS. IZQUIERDA, ESPERMATOZOIDE NEGATIVO AL TEST. DERECHA, ESPERMATOZOIDE POSITIVO AL TEST (1000X)…….. 55

FIGURA 12. MÉTODOS DE RECUPERACIÓN POST-COITAL…… 59

FIGURA 13. ELECTROEYACULADOR DE MACHOS CABRÍOS……. 60

FIGURA 14. VAGINA ARTIFICIAL Y RECOLECCIÓN SEMINAL MEDIANTE ESTE MÉTODO…… 62

FIGURA 15. PRUEBAS DE LIBIDO Y COMPORTAMIENTO SEXUAL…… 65

FIGURA 16. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS FENÓMENOS FÍSICOS EN LA CÉLULA ESPERMÁTICA DURANTE LA CONGELACIÓN…… 87

FIGURA 17. ANIMALES EXPERIMENTALES / MACHOS CABRÍOS…… 94

FIGURA 18. GRÁFICO DE MOTILIDAD PROGRESIVA A 0-HORAS POST-DESCONGELACIÓN…….. 132

FIGURA 19. GRÁFICO DE MOTILIDAD PROGRESIVA A 2-HORAS POST-DESCONGELACIÓN…….. 132

FIGURA 20. GRÁFICO DE ESPERMATOZOIDES VIVOS A 0-HORAS POST-DESCONGELACIÓN…….. 133

FIGURA 21. GRÁFICO DE ESPERMATOZOIDES VIVOS A 2-HORAS POST-DESCONGELACIÓN…….. 133

FIGURA 22. GRÁFICO DE MORFOANOMALÍAS TOTALES A 0-HORAS POST-DESCONGELACIÓN…….. 134

FIGURA 23. GRÁFICO DE MORFOANOMALÍAS TOTALES A 2-HORAS POST-DESCONGELACIÓN…….. 134

INDICE DE ANEXOS

FIGURA 1. DILUYENTES COMERCIALES……. 151

FIGURA 2. CENTRIFUGACIÓN Y EQUILIBRACIÓN……. 151

FIGURA 3. VAPORES DE NITRÓGENO Y DESCONGELACIÓN (BAÑO MARÍA)……... 152

FIGURA 4. MUESTREO Y TOMA DE DATOS…… 152

Curva de Concentración de Semen por Espectrofotómetro a 540 nm..... 153

COMPARACIONES DE MEDIAS POR TUKEY……. 154

Cuadro I. Motilidad Masal y Macho Cabrío (0 hrs. PDC)…… 154

Cuadro II. Motilidad Masal y Macho Cabrío (2 hrs. PDC)…… 154

Cuadro III. Motilidad Individual Progresiva y Macho Cabrío (0 hrs. PDC)….. 154

Cuadro IV. Motilidad Individual Progresiva y Macho Cabrío (2 hrs. PDC)….. 154

Cuadro V. Espermatozoides Vivos y Macho Cabrío (0 hrs. PDC)…….. 154

Cuadro VI. Espermatozoides Vivos y Macho Cabrío (2 hrs. PDC)…….. 154

Cuadro VII. Morfoanomalías Totales y Macho Cabrío (0 hrs. PDC)……. 155

Cuadro VIII. Morfoanomalías Totales y Macho Cabrío (2 hrs. PDC)……. 155

Cuadro IX. Morfoanomalías Primarias y Macho Cabrío (0 hrs. PDC)……. 155

Cuadro X. Morfoanomalías Primarias y Macho Cabrío (2 hrs. PDC)……. 155

Cuadro XI. Morfoanomalías Secundarias y Macho Cabrío (0 hrs. PDC)…… 155

Cuadro XII. Morfoanomalías Secundarias y Macho Cabrío (2 hrs. PDC)…… 155

Cuadro XIII. Motilidad Masal y Diluyente (0 hrs. PDC)……. 156

Cuadro XIV. Motilidad Masal y Diluyente (2 hrs. PDC)……. 156

Cuadro XV. Motilidad Individual Progresiva y Diluyente (0 hrs. PDC)…….. 156

Cuadro XVI. Motilidad Individual Progresiva y Diluyente (2 hrs. PDC)…….. 156

Cuadro XVII. Espermatozoides Vivos y Diluyente (0 hrs. PDC)…… 156

Cuadro XVIII. Espermatozoides Vivos y Diluyente (2 hrs. PDC)…… 156

Cuadro XIX. Morfoanomalías Totales y Diluyente (0 hrs. PDC)……... 156

Cuadro XX. Morfoanomalías Totales y Diluyente (2 hrs. PDC)……... 156

Cuadro XXI. Morfoanomalías Primarias y Diluyente (0 hrs. PDC)…… 157

Cuadro XXII. Morfoanomalías Primarias y Diluyente (2 hrs. PDC)…… 157

Cuadro XXIII. Morfoanomalías Secundarias y Diluyente (0 hrs. PDC)…….. 157

Cuadro XXIV. Morfoanomalías Secundarias y Diluyente (2 hrs. PDC)…….. 157

Cuadro XXV. Motilidad Masal y Tiempo PostCong. (0 hrs. PDC)…….. 157

Cuadro XXVI. Motilidad Masal y Tiempo PostCong. (2 hrs. PDC)…….. 157

Cuadro XXVII. Motilidad Individual Progresiva y Tiempo PostCong. (0 hrs. PDC)…….. 157

Cuadro XXVIII. Motilidad Individual Progresiva y Tiempo PostCong. (2 hrs. PDC)…….. 157

Cuadro XXIX. Espermatozoides Vivos y Tiempo PostCong. (0 hrs. PDC)…. 158

Cuadro XXX. Espermatozoides Vivos y Tiempo PostCong. (2 hrs. PDC)…. 158

Cuadro XXXI. Morfoanomalías Totales y Tiempo PostCong. (0 hrs. PDC)… 158

Cuadro XXXII. Morfoanomalías Totales y Tiempo PostCong. (2 hrs. PDC)… 158

Cuadro XXXIII. Morfoanomalías Primarias y Tiempo PostCong. (0 hrs. PDC). 158

Cuadro XXXIV. Morfoanomalías Primarias y Tiempo PostCong. (2 hrs. PDC). 158

Cuadro XXXV. Morfoanomalías Secundarias y Tiempo PostCong. (0 hrs. PDC)…….. 158

Cuadro XXXVI. Morfoanomalías Secundarias y Tiempo PostCong. (2 hrs. PDC)…….. 158

I. INTRODUCCIÓN

La cantidad de animales caprinos para el 2001 fue de 6,165 cabezas aproximadamente, según la Dirección de Estadística y Censo de la Contraloría Nacional de la República de Panamá (2005). Esta cifra es representativa, para un país chico como el nuestro; no obstante, comparando el progreso del rubro caprino con los países vecinos latinoamericanos no representa un gran avance.

El lento progreso productivo, se debe a la poca organización y control, principalmente en el poco uso de registros; además de pocos reproductores disponibles para elevar la productividad de los hatos.

Con la identificación de posibles sementales que puedan ayudar a mejorar la producción en las crías, así como una mejor disponibilidad de su semen sin restricción del tiempo se abrirían las puertas a las metas futuras de la producción caprina en general.

El semen caprino posee particularidades en su composición intrínseca, como en factores externos que afectan su constitución. En el primer caso, porque presenta una fosfolipasa que coagula frente algunos diluyentes (yema de huevo) y en segundo caso porque sus concentraciones espermáticas varían según la estación del año (anestro estacional).

La base del adelanto genético, se apoya, entre otras biotecnologías, en la inseminación artificial y esta, en los efectivos métodos de criopreservación del semen, con la cual se garantiza la disponibilidad de semen durante tiempos prolongados (años). Existen muchos factores que afectan la viabilidad del semen en los diferentes métodos de criopreservación. Uno de estos, es el tipo de diluyente que se ha usado en semen refrigerado como en semen congelado, el cual puede ser de origen vegetal, animal o sintético. En el caso particular de semen congelado, es imprescindible agregar además crioprotectores intracelulares (glicerol) para conseguir una viabilidad alta.

En la especie caprina, se han utilizados diluyentes simples como agua de coco, leche y yema de huevo, con resultados variables según la proporción y la metodología. En las últimas décadas se han fabricado diluyentes comerciales especialmente para bovinos, los cuales se han ajustado para los reproductores caprinos. Sin embargo, se hace necesario utilizar diluyentes específicos para semen caprino y valorarlos en nuestras condiciones para conocer su eficacia sobre los parámetros de calidad seminal, como motilidad masal, motilidad individual progresiva, porcentaje de espermatozoides vivos y muertos y proporción de morfoanomalías, tanto primarias como secundarias.

1.1. Planteamiento del Problema a Investigar

En nuestro país, la explotación caprina no cuenta con programas de mejoramiento genético y productivo. Debido, a la escasa población de animales

caprinos, que en su mayoría es criolla; se hace necesario la identificación del valor genético de los pocos animales procedentes de razas puras que se han aclimatizados a nuestro ambiente, además de material genético nuevo para reducir la consanguinidad.

Los programas de mejoramiento genético, deben estar basados en la selección de animales, para luego hacer uso de la inseminación artificial como primordial herramienta para lograr un progreso genético y fenotípico más rápido, utilizando los mejores animales como reproductores (sementales) a través de la conservación del semen, para acrecentar el número de progenies de un macho cabrío. Sin embargo, la información científica que se tiene en Panamá sobre los métodos de recolección y conservación de semen caprino es casi nula; por lo cual, se hace indispensable estandarizar estos métodos y evaluarlos sobre la base de que un productor pueda realizarlos en campo. El desconocimiento sobre la mejor concentración por pajuela, el tiempo de preparación al congelamiento, el número de colectas de semen por semana, los mejores diluyentes (tradicionales y comerciales), el tipo de envase para criopreservar semen, la mezcla del semen, así como los factores extrínsecos (ambientales, estacionales) e intrínsecos (edad, raza), dificultan las posibilidades de éxito de los programas de mejoramiento en la producción caprina de Panamá.

En el mercado existen algunos diluyentes comerciales utilizados para bovinos, que también pueden ser usados en la especie caprina; como también, se han

fabricado algunos para el característico semen caprino. No obstante, se desconoce qué tan efectivos son en el mantenimiento de los parámetros de calidad del semen caprino congelado en Panamá.

1.2. Antecedentes

La inseminación artificial es una de las biotecnologías de gran relevancia que se viene desarrollando desde hace varios años y que permite un rápido avance genético, con el mejor aprovechamiento de los sementales de características productivas superiores. El éxito de esta técnica depende en gran medida del desarrollo de diluyentes satisfactorios para el semen, el cual debe incrementar el volumen de un eyaculado, proteger a los espermatozoides durante el enfriamiento y descongelamiento, así como prolongar su vida con un mínimo efecto sobre la fertilidad.

Se han realizado estudios sobre la presencia de plasma seminal, encontrándose que al estar presente con 20 por ciento de yema de huevo conlleva un marcado descenso en la motilidad a la descongelación. También, investigaciones sobre el tiempo de refrigeración antes del proceso de congelación, en la cual periodos que se extendían hasta cinco horas; se determinó que propiciaban una marcada mejoría en la viabilidad espermática. Por lo cual, se tiene en cuenta que los índices de fecundidad del esperma congelado-descongelado, son más bajos que los del fresco y refrigerado, debido a los daños irreversibles producidos en la

ultraestructura y funcionalidad de la membrana del espermatozoide durante el proceso de congelación y descongelación. **(Dorado *et al*., 2004)**

La mayoría de los diluyentes que han sido probados son de tipo natural y tradicional. El más común es la yema de huevo, que presenta efectos adversos a la viabilidad espermática. No obstante, este efecto negativo puede ser reducido mediante la separación del plasma seminal por centrifugación o en su defecto disminuyendo la concentración de yema de huevo presente en el diluyente **(Vera *et al.*, 2007-a)**. Con respecto a la primera alternativa, **Dorado *et al.* (2004)** realizaron trabajos en semen caprino con previa centrifugación, agregando como diluyentes yema de huevo al dos y 20 por ciento, registrando mejores resultados en el de mayor porcentaje de yema de huevo. Además, investigaron sobre la diferencias posibles encontradas en pajuelas de diferentes volúmenes, resultando las de 0.5 mililitros con mejores parámetros espermáticos. Igualmente, **Ritar y Salamon** en 1982, observaron que concentraciones de yema de huevo superiores a 1.5 por ciento sin previa separación del plasma seminal, provocan una coagulación del medio y muerte celular tras dos horas de incubación a 37 ºC.

También se han efectuado ensayos de la leche como diluyente, comparado su efecto con la yema de huevo. Algunos autores indican que la leche descremada presenta mejor porcentaje de motilidad a la hora cero post-descongelación, mientras que la yema de huevo muestra mayores porcentajes a partir de la hora

12 **(Dubeibe, 2006)**. Sin embargo, la afirmación más aceptada por los investigadores es que los diluyentes de yema de huevo son mejores que la leche, sobre los parámetros de calidad seminal en todos los aspectos; ya sea leche descremada o ultra-pasteurizada **(Palomino *et al.,* 2007)**. Aunque algunos indican que estos diluyentes se ven afectados por la raza del macho cabrío; quizás, en particularidades en los componente del semen de cada raza. **(Dubeibe, 2006)**

En cuanto a diluyentes comerciales, se han utilizados diluyentes bovinos en pruebas de inseminaciones caprinas. En efecto, **Bernal *et al.* (2007)**, investigaron sobre técnicas alternativas para la inseminación artificial caprina. La cual en su primer ensayo, usaron un diluyente de surfactante vegetales, teniendo que volver a realizar un segundo ensayo al no encontrar resultados positivos en ninguno de los grupos. Por lo tanto, utilizaron otro diluyente, con la presunción de disminuir el riesgo de falla por causa del diluyente. Igualmente, se efectuaron ajustes y registros de la estacionalidad en las cabras, reabsorción embrionaria y moco vaginal en el segundo ensayo, sin poder identificar la causa más probable del fracaso en el primer ensayo.

En Panamá, **Santana y Cisneros (2005)** realizaron uno de los primeros trabajos publicados para valorar la criopreservación del semen caprino como biotécnica reproductiva efectiva en algunos animales de las razas Saanen, Toggenburg, Alpina, Nubian y Boer. El semen fue extraído utilizando vagina artificial, diluido

en un diluyente con un agregado de dos por ciento de yema de huevo, utilizando pajuelas de 0.25 mililitros. Los resultados fueron bastante buenos, pero no se hicieron evaluaciones de diferencias por el efecto de las razas.

Los últimos trabajos han sido evaluaciones sobre la viabilidad y fertilidad de espermatozoides caprinos congelados con diluyente sin proteína animal y el agregado de plasma seminal post-descongelado. En la cual, **Vera (2006)**, en sus conclusiones, recomendó buscar mecanismos de inactivación de las enzimas que coagulan frente a la yema de huevo y la leche, o el uso de diluyentes con proteína vegetal. La información nacional e internacional sobre el comportamiento de estos diluyentes de origen vegetal en la congelación de espermatozoides caprinos evaluados tanto *in vitro* como *in vivo*, es prácticamente inexistente.

Estas investigaciones, nos indican que el tópico de los diluyentes comerciales de semen caprino es relativamente nuevo en el campo de la investigación científica panameña.

1.3. Justificación

Esta investigación pretende comparar diluyentes comerciales, unos con agregado de yema de huevo y otro con surfactantes vegetales; utilizados para el congelamiento de semen caprino; y de esta forma, abrir la senda para el

establecimiento de mejores protocolos de criopreservación del material genético de las distintas y pocas razas puras que tenemos en Panamá.

La inexistencia de protocolos estandarizados de conservación de semen en base al diluyente, hace necesario la evaluación de los diluyentes a base de compuestos de origen animal, como la yema de huevo, versus los que no utilizan esta clase de compuestos. Esto se realiza, con la finalidad de conocer la efectividad que tienen estos en la preservación del semen congelado caprino para nuestro medio. Además, contribuiría a mejorar los programas de mejoramiento productivo de los caprinocultores panameños, en cuanto a la calidad del semen que podrían preservar y utilizar en sus respectivas fincas.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

- Determinar el efecto criopreservante de los diluyentes comerciales (que emplean componentes de origen animal y surfactantes vegetales) sobre parámetros de calidad seminal en machos cabríos de razas de alta calidad genética, post-congelación y post-descongelación del semen.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Seleccionar a los machos cabríos según la calidad del semen antes de efectuar la dilución y analizar el efecto del macho (procedencia del

semen), en la calidad seminal post-congelación y post-descongelación de la investigación.

- Relacionar el efecto de los diluyentes, con los parámetros de calidad seminal de los sementales caprinos a diferentes tiempos post-congelación y post-descongelación.
- Evaluar el efecto del tiempo post-congelación sobre la calidad seminal de los machos cabríos, post-descongelación.

1.5. Hipótesis

HO: Los diluyentes que emplean componentes de origen animal y surfactantes vegetales, utilizados en la conservación del semen caprino de razas de alta calidad genética, no tienen efecto sobre su calidad seminal post-congelación y post-descongelación.

HA: Los diluyentes que emplean componentes de origen animal y surfactantes vegetales, utilizados en la conservación del semen caprino de razas de alta calidad genética, tienen efecto sobre su calidad seminal post-congelación y post-descongelación.

HO: No hay efecto del tiempo post-congelación, sobre la calidad del semen congelado de sementales caprinos, post-descongelación.

HA: Hay efecto del tiempo post-congelación, sobre la calidad del semen congelado de sementales caprinos, post-descongelación.

HO: No hay efecto individual de los sementales caprinos de la investigación, sobre la calidad seminal post-congelación y post-descongelación de estos sementales.

HA: Hay efecto individual de los sementales caprinos de la investigación, sobre la calidad seminal post-congelación y post-descongelación de estos sementales.

1.6. Alcances y Limitaciones del Estudio

1.6.1. Alcances del Estudio

Con la evaluación de los diluyentes comerciales se pretende lograr alcanzar las directrices sobre cuales diluyentes comerciales; disponibles en el mercado al productor, mantendrá en mayor proporción la calidad del semen contenido en las pajuelas congeladas. Además, la investigación permitirá identificar a los machos cabríos que poseen mayor calidad seminal para el mantenimiento de los espermatozoides congelados y efectuar los posibles ajustes según el semental. Con esta Tesis de Grado se logra determinar la necesidad de agregar compuesto de origen animal (yema de huevo), que es el método más común, comparado con otros que no utilizan yema de huevo (surfactantes vegetales) en la criopreservación de semen de la especie caprina.

1.6.2. Limitaciones del Estudio

Para el proyecto se utilizarán machos jóvenes procedentes e importados de México que han tenido un periodo corto de aclimatación, los cuales no poseen

ningún entrenamiento para recolección de semen, como tampoco se le ha realizado ningún estudio sobre su calidad seminal. Por lo cual, se tendrá en cuenta, la estacionalidad de la concentración espermática de estos animales.

Por otro lado, existen pocos especialistas en reproducción caprina en Panamá que indiquen las metodologías más propicias para esta clase de estudios. En efecto, la inexistencia de ensayos y literatura panameña en materia de reproducción caprina asistida conlleva a contrastar la investigación solo con experiencias foráneas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

El caprino es una animal perteneciente al grupo de los rumiantes domésticos. La *Capra hircus*, se explota en el mundo por su carne, leche e incluso piel y pelos **(Tabernero, 2006)**. Su domesticación se remonta a los años antes de Cristo y tuvo un papel relevante en la ganadería neolítica y de la Edad de Bronce, como en Oriente Medio y Egipto **(Daza, 2004)**. Además, es una especie reconocida por alta rusticidad, razón por la cual está ampliamente distribuida en diferentes ambientes climáticos. Esta distribución, le ha dado características reproductivas propias, progresando estas con su evolución **(Tabernero, 2006)**.

2.1. Anatomía y Fisiología del Aparato Reproductor del Macho Cabrío

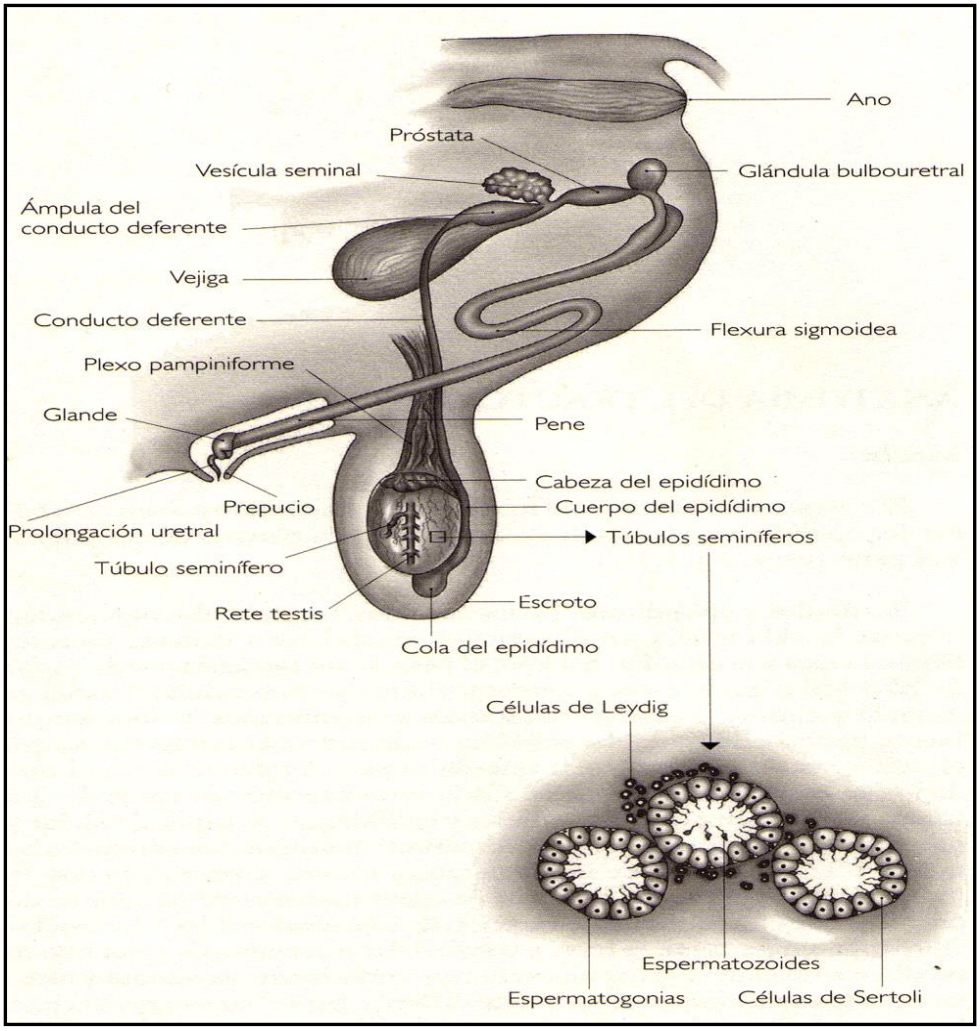
2.1.1. Anatomía del Sistema Reproductor del Macho Cabrío

Parte del aparato genital del macho es externo y el otro interno, el cual, según se aprecia en la Figura 1, está compuesto por los testículos, escroto, epidídimo, conductos deferentes, glándulas accesorias, pene y prepucio **(Delgadillo, 2005; Galina, 1995)**.

2.1.1.1. Los Testículos

Los testículos son los órganos sexuales primarios de los machos, ubicados entre las patas traseras alojadas en la bolsa escrotal, los cuales tienen una forma

FIGURA 1. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO CABRÍO.



FUENTE: Delgadillo, 2005. Inseminación Artificial en Caprinos.

ovoide pero muy comprimida transversalmente. Cada uno de ellos presenta dos caras, dos bordes y dos extremidades **(Sisson, 1977; Galina, 1995; Tabernero, 2006)**. Según la raza y estación del año, el peso de un testículo puede variar de 80 a 150 gramos en un semental caprino **(Delgadillo, 2005)**.

Cada testículo consta de una masa de túbulos seminíferos. Estos son estructuras más o menos cilíndricas que están empaquetados juntos **(Cole, 1984)**. El diámetro de los túbulos seminíferos es de aproximadamente 0.2 milímetros y su longitud es variable, siendo aproximadamente 2,100 metros durante la estación sexual a 1,600 metros durante el período de reposo en los machos Alpinos y Sannen **(Delgadillo, 2005)**. Estos túbulos están rodeados de una recia cápsula fibrosa llamada túnica albugínea. De esta al interior avanzan varias trabéculas, cuyo conjunto es una red o estroma que sostiene los túbulos. Estás trabéculas se unen al centro de la glándula para formar un cordón fibroso llamado mediastino testicular, en la cual se anastomosan los conductos para formar la rete testis **(Frandson, 1992; Sorensen, 1982)**. En su interior, formado de tejido conectivo están los espacios intersticiales, los cuales contienen los vasos sanguíneos y linfáticos, los nervios y las células de Leydig o intersticiales **(Cole, 1984)**. La proporción de células intersticiales en relación con el testículo total es menor del 25 por ciento **(Kolb, 1979)**.

2.1.1.2. Saco Escrotal

El escroto en el caprino es un saco cutáneo, penduloso externamente que en tamaño, forma y situación se adapta a los testículos que contiene. La piel del escroto es fina, delgada, plegable o elástica, casi sin pelo y abundantemente provista de glándulas sebáceas **(Frandson, 1992; Galina, 1995)**. Las paredes de las bolsas tiene cuatro capas o túnicas, que de afuera hacia adentro son: el escroto, que puede ser lampiño o con pelos según la raza. El dartos, tejido

conjuntivo con fibras musculares, que da origen al tabique escrotal que divide al escroto en dos bolsas. La tercera es el músculo Cremaster que se contrae y estira, haciendo subir y bajar el testículo según sea la temperatura. Por último, se localizan a las capas vaginales, envoltura parietal y envoltura visceral, las cuales envuelven a las gónadas y epidídimo **(Tabernero, 2006; Delgadillo, 2005; Frandson, 1992)**.

2.1.1.3. Epidídimo

Los túbulos seminíferos se reúnen para formar el epidídimo; un órgano tubular y enrollado que almacena espermatozoides maduros en cada uno de los dos testículos **(Lesur, 2004; Tabernero, 2006)**. Está dividido en cabeza, cuerpo y cola. La cabeza y la cola, son las porciones agrandadas de los extremos y el cuerpo es la parte más delgada que queda entre ambos. La cabeza del epidídimo está aplicada al mismo polo del testículo por donde penetran nervios y vasos **(Frandson, 1992; Cole, 1984)**. El cuerpo del epidídimo se prolonga generalmente al eje mayor del testículo posicionándose sobre el testículo pero hacia la porción ventral. Conforme el conducto alcanza la región ventral del testículo, se vuelve espiralado otra vez y constituye la prominente cola de epidídimo **(Sorensen, 1982)**. La maduración de los espermatozoides se efectúa en la cabeza y cuerpo, mientras que en la cola se almacenan aquellas células maduras **(Delgadillo, 2005)**.

2.1.1.4. Glándulas Sexuales Accesorias

Las glándulas sexuales accesorias del macho cabrío son: ampollas o ámpulas de los conductos deferentes; vesículas seminales; próstata y glándulas bulbouretreales o de Cowper **(Frandson, 1992; Galina, 1995)**. También existen otras glándulas uretrales (glándulas Littre) y glándulas prepuciales, pero se sabe muy poco de su función o de la composición de su secreción **(Cole, 1984)**. Las vesículas seminales son glándulas pares que desembocan en común, en los conductos deferentes **(Urroz, 2000)**; tienen forma alargada, lobulada y están formadas por grandes lobulillos **(Galina, 1995)**. Estas glándulas se encuentran situadas a cada lado de la parte posterior dorsal de la vejiga y son las responsables de secretar la mayor parte del líquido seminal **(Delgadillo, 2005; Cole, 1984)**. La próstata es la única glándula accesoria impar y se encuentra situada sobre el cuello de la vejiga, constituida por dos porciones: cuerpo y porción diseminada **(Delgadillo, 2005; Galina, 1995)**. En el caprino la próstata es una glándula pequeña y poco visible comparada con la de los otros animales **(Kolb, 1979)**. Las glándulas bulbouretreales o de Cowper están asociadas con la porción caudal de la uretra y desembocan en la uretra pélvica en su región bulbar. En el macho cabrío son comparativamente pequeñas y se asemejan a una avellana o nuez con una densa cápsula **(Cole, 1984; Kolb, 1979; Galina, 1995)**. Continúan las ámpulas, que aparecen como una dilatación de la uretra en la parte final del conducto deferente. Están muy desarrolladas en el caprino **(Mayén, 1989)** y vierten su secreción en los conductos deferentes, para dar al semen más fluidez **(Frandson, 1992)**.

2.1.1.5. Conductos Deferentes

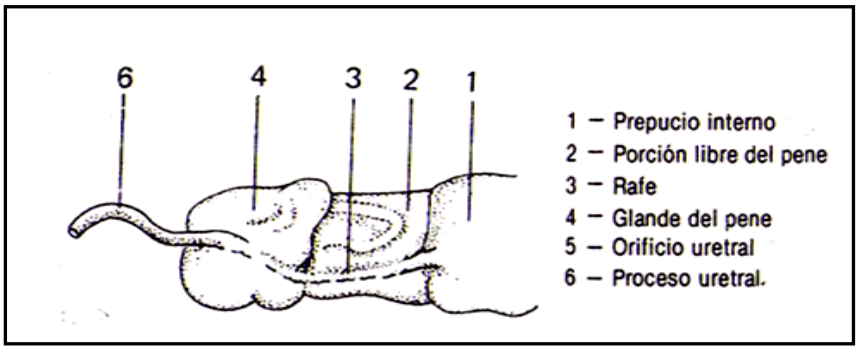
Los conductos deferentes forman parte del cordón testicular, con una arteria, una red venosa y un haza de nervios **(Tabernero, 2006)**. Posee una estructura larga y tubular, la cual se conecta con la cola del epidídimo y pasa dorsalmente a lo largo mediano del testículo, en posición craneal respecto al epidídimo. Posteriormente penetra la cavidad del cuerpo, pasa sobre la vejiga urinaria y desemboca en la uretra **(Sorensen, 1982; Frandson, 1992)**. Estos conductos transportan los espermatozoides desde la cola del epidídimo hasta la porción pelviana de la uretra **(Delgadillo, 2005)**.

2.1.1.6. Pene

El pene es el órgano copulatorio. En la Figura 2 se presenta la anatomía del pene del macho cabrío. En su parte central se encuentra la uretra, por el cual son evacuados el semen y la orina **(Lesur, 2004)**. El pene, puede dividirse en tres grandes áreas: glande, o extremo libre; cuerpo, o parte principal, y dos arcos o raíces, que se unen al arco isquiático de la pelvis cubierto por músculo isquiocavernoso **(Urroz, 2000)**. La raíz del pene se localiza en la región del músculo bulbo esponjoso. El tejido conectivo forma tres áreas esponjosas: una que envuelve a la uretra (el bulbo del pene) y otras dos laterales (la crura penis). El macho tiene un pene de tipo fibroelástico, lo que significa que es muy fibroso y cuenta con cierta elasticidad **(Sorensen, 1982)**. Además, cuenta con ángulo sigmoideo y una composición de mayor proporción de tejido conectivo que de eréctil, por lo que la capsula envolvente tan recia no deja expandirse al miembro.

En estos animales puede decirse que se trata mejor del alargamiento al enderezarse el ángulo de modo **(Frandson, 1992)**. Su porción terminal se proyecta de ordinario de tres a cuatro centímetros más allá del glande formando una prolongación uretral rizada, que gira rápidamente durante la eyaculación para esparcir el semen en la parte craneal de la vagina **(Sisson, 1977; Delgadillo, 2005; Galina, 1995)**.

FIGURA 2. PENE DEL MACHO CABRÍO.



FUENTE: Galina, 1995. Reproducción de los Animales Domésticos.

2.1.1.7. Prepucio

El prepucio es un pliegue invaginado de piel que rodea la extremidad libre del pene. La superficie externa es comparable a la superficie cutánea, en tanto que la interna está formada por una capa prepucial y otra peneana que cubre la superficie del extremo libre del pene **(Frandson, 1992; Delgadillo, 2005)**. La capa externa consta de epitelio estratificado y está recubierta por pelos. En contraste, la capa interna es un tejido blando, doblado, que debe permanecer por dentro hasta la extensión del pene. Las glándulas prepuciales secretan hacia la superficie y mantienen esa área lubricada. La presencia de los músculos prepuciales, craneal y caudal, permite al prepucio un cierto movimiento.

Después de la erección y extensión, el prepucio se convierte en una cubierta para una parte del cuerpo del pene **(Sorensen, 1982)**.

2.1.2. Fisiología de la Reproducción del Macho Cabrío

Desde el punto de vista embriológico, el aparto reproductor del macho está íntimamente relacionado con el aparato urinario, por lo que sus funciones han sido estudiadas conjuntamente. No obstante, los órganos reproductivos realizan complejas y precisas funciones que ameritan su descripción como un sistema aparte **(Urroz, 2000; Kolb, 1979)**.

2.1.2.1. Pubertad

La pubertad es la época de la vida del macho en la cual comienza a ser capaz de reproducirse como resultado de muchos factores, tanto intrínseco (hormonas, edad) como extrínseco (nutrición, época) **(Tabernero, 2006; Mayén, 1989; Mc Donald, 1981)**. Este evento ocurre en los machos antes que en las hembras y suele ser entre los seis a 12 meses, aunque los espermatozoides se empiezan a producir a los dos o tres meses de edad **(Daza, 2004; Lesur, 2004; Durán, 2007)**. No se debe confundir la pubertad con la madurez sexual, ya que esta última se alcanza más tarde. La pubertad es el momento en que por primera vez se llega a la potencialidad de engendrar, mientras que la madurez sexual es cuando se logra la máxima potencialidad reproductiva, y cuando se haya producido la completa separación de la glándula peneana de la mucosa prepucial **(Sorensen, 1982; Galina, 1995; Mayén, 1989)**. La raza, los nutrientes

y la alimentación, los factores genéticos y las características ambientales influyen directamente sobre el inicio de la pubertad **(Mayén, 1989; Daza, 2004)**. En efecto, la edad de la pubertad varía con la raza; por ejemplo, en razas como Sannen y Alpina esto se manifiesta a los seis a siete meses; y en razas como Guadarrama y Verata es a los cuatro a cinco meses **(Tabernero, 2006)**. En cuanto al régimen alimentario, en diversos grados de nutrición (buenos y malos), la edad de la pubertad fluctúo entre cuatro y ocho meses en las razas Alpina, Angora, Nubia y Baladí. Igualmente, la estación del año puede modificarla, encontrándose diferencias de la edad de pubertad, en machos criollos de la Isla de Guadalupe nacidos en abril y agosto **(Delgadillo, 2005)**.

2.1.2.2. Control Hormonal del Sistema Reproductivo

Los procesos biosintéticos reproductivos; el comportamiento sexual, la función de los órganos reproductivos y la espermatogénesis están controlados en gran parte por la actividad sinérgicas de hormona luteinizante (LH), prolactina, hormona folículo estimulante (FSH), andrógenos y probablemente otras hormonas **(Mc Donald, 1981)**.

a) Espermatogénesis

Durante la vida fetal, las células precursoras de los espermatozoides se alojan en las paredes de los túbulos seminíferos y permanecen inactivas hasta la pubertad **(Evans y Maxwell, 1990; Delgadillo, 2005)**. Pues, es entonces, cuando las células primarias de los testículos producen espermatozoides,

mediante un proceso llamado espermatogénesis. En la cual una espermatogonia, se transforma en espermatocitos primarios, luego en espermatocitos secundarios y en espermátidas, que bajo diferenciación se producen los espermatozoides **(Frandson, 1992)**. Las espermatogonias o células germinales se dividen por mitosis y en su última generación dan lugar a dos espermatocitos primarios, con la reducción del número de cromosomas **(Wittke, 1978)**. Cada espermatocito produce dos espermátidas, formando un total de cuatro espermátidas, después de la división celular por meiosis. En ese momento comienza la espermiogénesis o suma de todos los cambios nucleares y citoplasmáticos que sufren las espermátidas. La espermiogénesis pude ser divida en tres períodos: espermátidas redondas, alargamiento del núcleo y espermátidas alargadas **(Cole, 1984)**. En donde el núcleo tiende a localizarse en la región anterior de la célula, el cuerpo de Golgi se acumula en el polo nuclear anterior formando una vacuola que contiene el idiosoma y en su interior aparece el proacrosoma , el cual termina transformándose en el acrosoma, que con la diferenciación del citoplasma termina por formar un espermatozoide **(Salisbury, 1978)**. Teóricamente una espermatogonia produce 192 espermatozoides, pero debido a degeneraciones durante la espermatogénesis, la máxima producción es de 64 células **(Delgadillo, 2005)**. El ciclo espermático, tiempo que transcurre entre la aparición de la espermatogonia madre y la liberación de los espermatozoides, tiene una duración en el macho cabrío entre 10 a 14 días, siendo un proceso ininterrumpido, a excepción de cuadros estresantes **(Evans y Maxwell, 1990; Kolb, 1979)**. Algunos han propuesto

estudiar con mayor profundidad el ciclo espermático, utilizando dos métodos: uno en base al desarrollo de los acrosomas y otra en la asociación de células germinales. En el macho cabrío se han encontrado 12 fases en la primera clasificación y en la otra solo ocho fases. Por otro lado, el control de la espermatogénesis está dado por factores endocrinos y factores externos, en la cual, las hormonas reproductivas tienen un gran papel **(Cole, 1984)**.

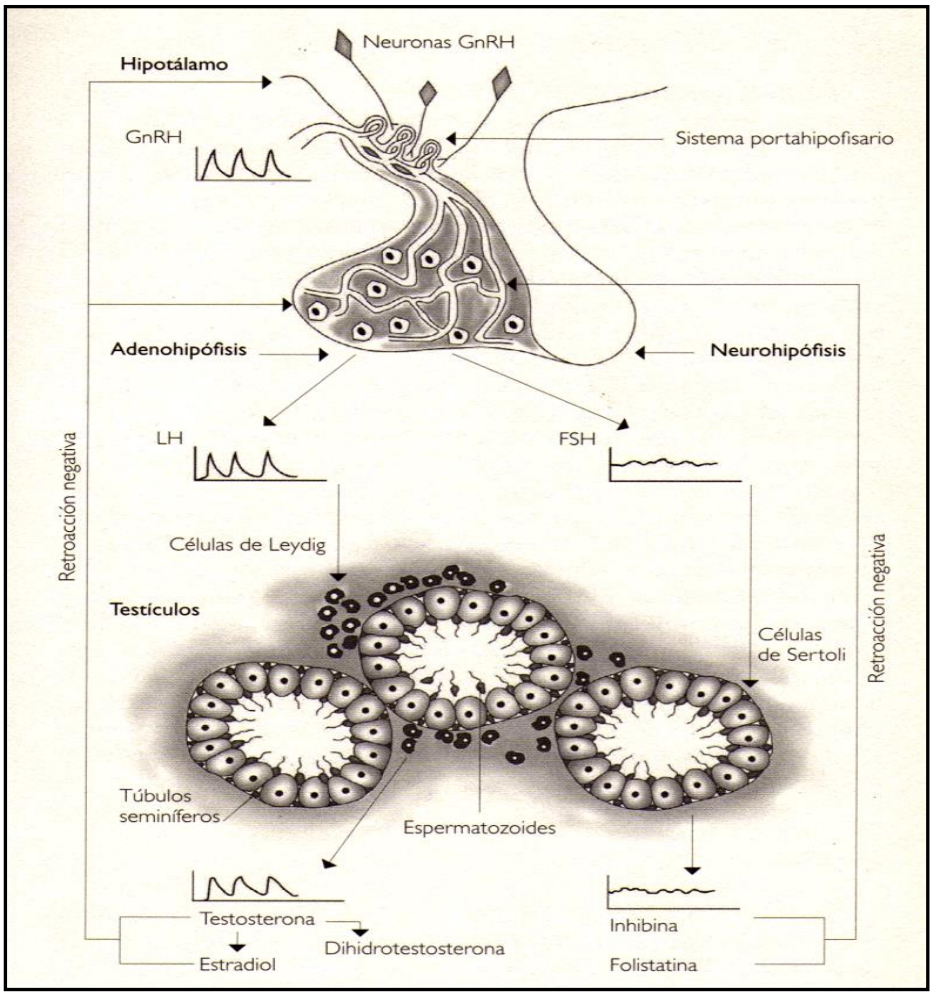
b) Control de la Función Testicular y Órganos Reproductivos

Las funciones de los testículos, fundamentalmente producción de espermatozoides y andrógenos (como función endocrina), están reguladas por hormonas específicas **(Evans y Maxwell, 1990; Frandson, 1992)**. Todo el control está regulado bajo un ciclo de retroalimentación negativa donde la hormona sexual principal inhibe a las células sintetizadoras en el hipotálamo, relacionándose a la vez con el sistema nervioso central **(Wittke, 1978)**. Las neuronas hipotalámicas que se originan principalmente en el área preóptica y en el hipotálamo mediobasal, sintetizan y secretan el factor de liberación de las gonadotropinas (GnRH) en el sistema portahipófisiario. El GnRH llega a la adenohipófisis al través del sistema vascular y estimula las células para que secreten las gonadotropinas; LH y FSH **(Delgadillo, 2005)**. La hormona folículo estimulante, induce el comienzo de la espermatogénesis y es necesaria para la maduración final de las espermátidas **(Sorensen, 1982; Frandson, 1992)**. Además, estimula a las células de Setorli para que liberen la inhibina y folistatina, que modulan su liberación en el hipotálamo **(Delgadillo, 2005)**. La LH

conocida en el macho como hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH), también participa en la diferenciación y multiplicación de las espermatogonias, controla la secreción de la testosterona y junto a la prolactina favorece el mantenimiento de esa secreción **(Sorensen, 1982; Delgadillo, 2005; Frandson, 1992)**. En la Figura 3 se presenta esquemáticamente el control hormonal de la actividad sexual del macho cabrío. Existen diversas hormonas no hipofisiarias involucradas en la función reproductiva del macho, conocidos como andrógenos. Estos son producidos principalmente por las células de Leydig del testículo, cuya principal hormona posee el nombre de testosterona **(Galina, 1995; Wood, 1974)**. En los testículos, los receptores de los túbulos podrían ser los mediadores del estímulo de los andrógenos sobre las células germinales por la presencia de una proteína H_2T-Ligante en el citoplasma de las células del epidídimo **(Cole, 1984)**. La hormona testosterona es de suma importancia, manifestándose desde el comportamiento sexual hasta la osificación y actividad miotrófica de los machos **(Mc Donald, 1981)**.

Otra hormona que afecta a la testosterona y a la reproducción del macho cabrío es la melatonina, influenciada a su vez por el fotoperiodo, que en los países con mayor latitud determina la época reproductiva **(Daza, 2004)**. En efecto, otros factores, como lo son temperatura, estado nutricional, enfermedades y otros, tiene efecto sobre la producción de las hormonas sexuales **(Evans y Maxwell, 1990)**. Sin embargo, la actividad funcional de las glándulas sexuales accesorias y otros órganos reproductivos depende primordialmente de los andrógenos

FIGURA 3.CONTROL HORMONAL DE LA ACTIVIDAD SEXUAL DEL MACHO.



FUENTE: Delgadillo, 2005. Inseminación Artificial en Caprinos.

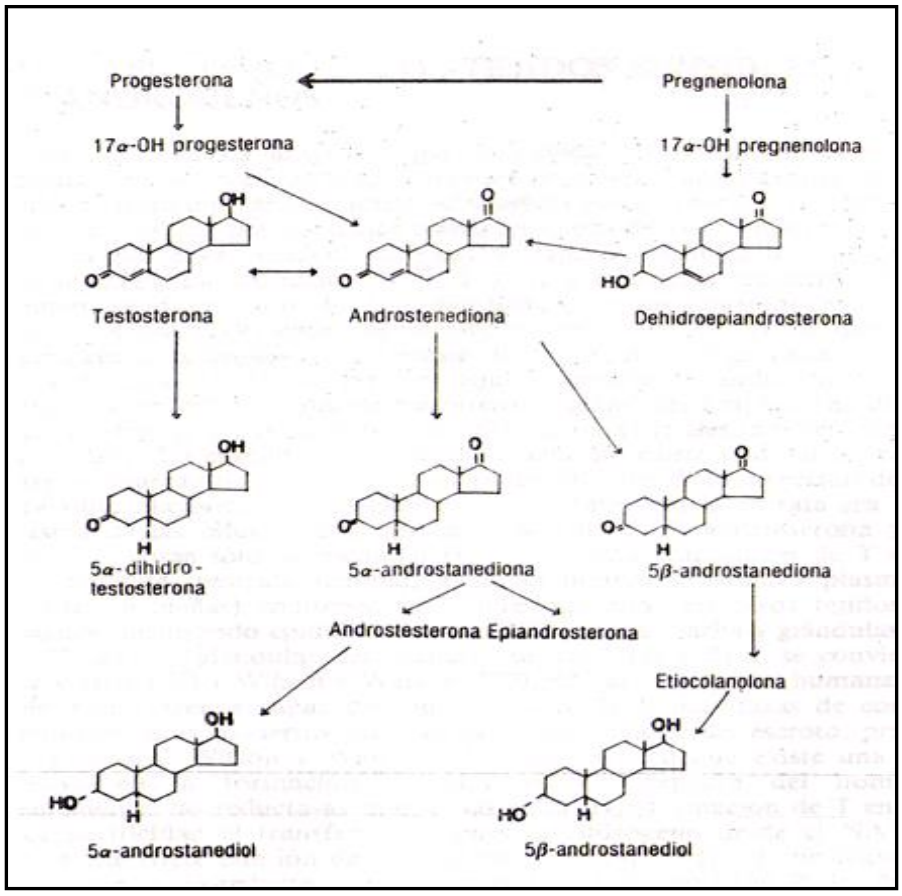
testiculares **(Frandson, 1992; Delgadillo, 2005)**, estimulando la síntesis de las sustancias indispensables para la motilidad de los espermatozoides, las cuales forman parte del plasma seminal **(Kolb, 1979)** y estimula al epidídimo para que sirva como lugar de maduración para los espermatozoides, como área de almacenamiento, actúe como un pasaje espermático y concentre la esperma **(Sorensen, 1982)**. Asimismo, son los responsables de la reabsorción en la

cabeza del epidídimo de los fragmentos celulares que se han desprendido del espermatozoide en el proceso de maduración **(Salisbury, 1978)**.

c) Esteroidogénesis

La biosíntesis de los andrógenos, nombrada como esteroidogénesis, es fundamental para el estudio de la actividad sexual. El testículo es el origen predominante de andrógenos, pero estos también se producen en la corteza suprarrenal **(Frandson, 1992)**. De esta forma, el testículo fetal sintetiza androstenediona y testosterona, antes y durante la diferenciación de los órganos reproductores accesorios y la regresión del sistema de Müller **(Mc Donald, 1981; Sorensen, 1982)**. Tanto los andrógenos, estrógenos, progesterona y hormonas de la corteza adrenal derivan todos biosinteticamente del colesterol y poseen una estructura básica esteroídica (Figura 4). Los andrógenos se denominan químicamente, refiriéndolos a su relación con las estructura esteroídica androstano, que está compuesto de 19 átomos de carbono totalmente reducidos en tres anillos de seis átomos de carbono y uno de cinco átomos de carbono. La biosíntesis total de testosterona a partir del acetato, se lleva a cabo por una ruta en la que son intermediarios el colesterol y el esteroide C_{21}; y en la que están implicadas la pregnenolona (P_5) y progesterona (P_4), efectuándose en el testículo y en los tejidos productores de esteroides. No obstante, esta debe metabolizarse a otros esteroides, principalmente a dihidrotestosterona (H_2T), para obtener una actividad biológica máxima **(Cole, 1984)**. Por lo tanto, la testosterona en el testículo, es fijada por receptores

FIGURA 4. METABOLISMO DE LOS ANDRÓGENOS.



FUENTE: Cole, 1984. Reproducción de los Animales Domésticos.

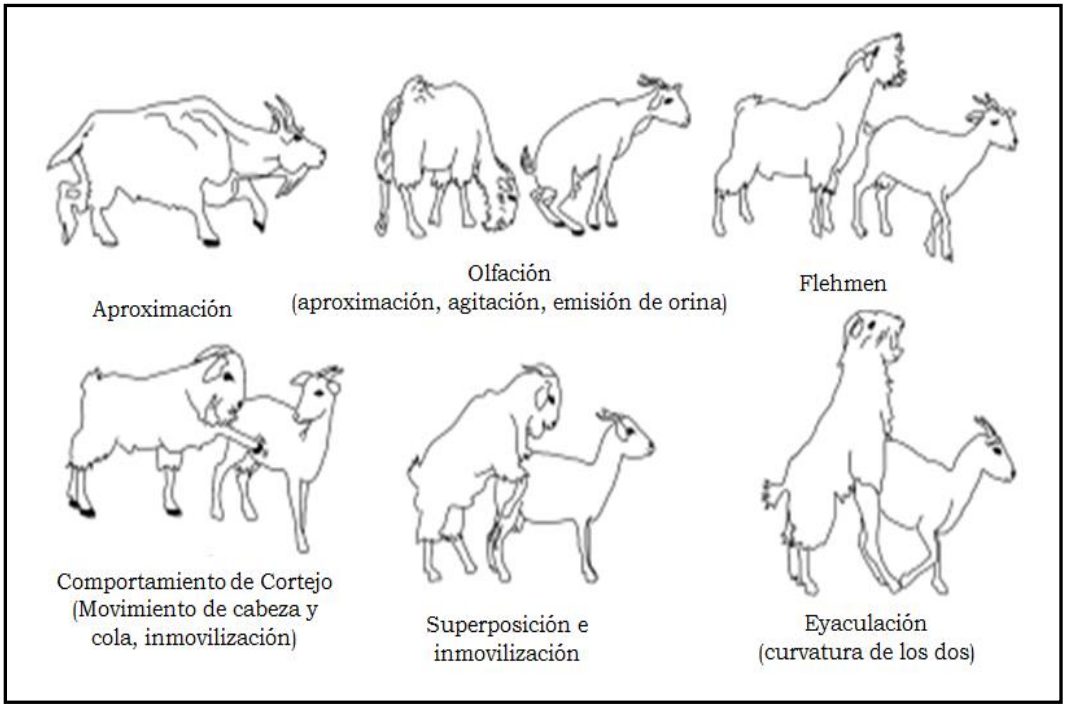
específicos del citoplasma de determinadas células y es metabolizada por enzimas; constituyéndose en la próstata: la androstanolona (17β-hidroxi-5α-androstan-3-ol) y el 3β-androstandiol, los productos de transformación de la testosterona de principal acción fisiológica **(Kolb, 1979)**. También se conocen la androsterona, epiandrosterona y etiocolanolona, productos de la degradación metabólica de la testosterona. Estos últimos son 17-cetosteroides, los cuales se excretan en la orina y pueden cuantificarse partiendo de su concentración en ella **(Frandson, 1992)**.

2.1.2.3. Comportamiento Sexual y Cubrición

En una explotación caprina, la cubrición consiste en la introducción de los espermatozoides en el aparato genital de la cabra y esta puede hacerse de forma natural o utilizando la inseminación artificial **(Tabernero, 2006)**. En los machos, la erección del pene es esencialmente el aumento de su turgencia, debido a que hay más entrada que salida de sangre dentro del sistema circulatorio peneano. Sin embargo, en el macho cabrío la erección se da sobre todo por enderezamiento del ángulo sigmoideo. **(Frandson, 1992)**.

El proceso de la cubrición, con la penetración y eyaculación efectiva, es el resultado de una serie de eventos que constituyen el comportamiento sexual del macho (Figura 5). Los machos cabríos producen un olor característico (olor hircínico) que suele estimular a las hembras, por lo cual se considera a la olfación el estimulo sexual principal **(Tabernero, 2006; Evans y Maxwell, 1990)**. La primera etapa de la fase del apetito sexual es marcada con la postura de la cabeza alargada. Le sucede en general, una etapa de identificación olfativa por la olfación de la zona ano-genital de la hembra, que es seguida particularmente si la hembra orina, por una mímica particular, el labio superior arremangado y destinado al "flehmen". Luego, el macho cabrío colocado atrás de la hembra se entrega eventualmente a un comportamiento de cortejo con una rotación de la cabeza hacia la hembra, una emisión sonora breve y de baja frecuencia, y un movimiento de la pata anterior en extensión hacia la hembra. Después de esto, empieza la fase de monta o copulación, en la que procede a hacer intentos de

FIGURA 5. ETAPAS DEL COMPORTAMIENTO SEXUAL DEL MACHO CABRÍO.



FUENTE: Adaptado de: Fabre-Nys, 2003. Le Comportement Sexuel des Caprins: contrôle hormonal et facteurs sociaux.

monta, luego de un período de locomoción durante el cual el macho entra en erección, seguido por un salto o monta con la penetración y eyaculación **(Fabre-Nys, 2003)**. La intensidad de este comportamiento es distinto entre machos, por lo que se utilizan diversas pruebas para evaluar al animal **(Mateo, 1990)**. En resumen, se puede decir que en el comportamiento sexual se observa: seguimiento, olfación, micción, reacción de flehmen, limpieza, manoteo, topeo, baleo y monta sin servicio. De estos, se encontró en machos Boer, que el seguimiento, el baleo, la olfacción y la reacción de flehmen tiene la mayor correlación con la monta de servicio efectivo **(Tehuitzil *et al.,* 2004)**. La eyaculación es un reflejo por el que se dan contracciones musculares y se

vacían las secreciones del epidídimo, la uretra y las glándulas sexuales accesorias del macho, cuya descarga final se produce por las contracciones rítmicas de los músculos del pene y la relajación del esfínter uretral **(Frandson, 1992; Salisbury, 1978; Kolb, 1979)**. En el macho cabrío, la eyaculación sigue en general a la primera penetración; es espontanea, breve (del orden del segundo) y es acompañada por un golpe de riñón y de un movimiento de la cabeza hacia atrás, eventualmente con despegadura de los miembros posteriores y una deposición del semen en la vagina anterior **(Fabre-Nys, 2003; Evans y Maxwell, 1990)**.

2.2. Características del Semen Caprino

El semen es un líquido viscoso que contiene los gametos masculinos. Sus componentes varían inmensamente, aún dentro de las distintas razas caprinas frente a variados escenarios climatológicos **(Evans y Maxwell, 1990)**.

2.2.1. Composición del Semen

El semen eyaculado se compone de los espermatozoides suspendidos en el plasma seminal; un líquido viscoso y blanquecino producido por las glándulas sexuales accesorias **(Cole, 1984; Tabernero, 2006)**.

2.2.1.1. Plasma Seminal

El plasma seminal normalmente es un líquido isotónico y neutro; está constituido principalmente de agua, aunque también aparecen sustancias orgánicas e inorgánicas. El testículo no contribuye casi nada a la formación del plasma

seminal. Además, la presión osmótica del semen se mantiene más por los componentes orgánicos que por los inorgánicos y tiene como funciones principales: actuar como vehículo para los espermatozoides, transportándolos desde el sistema reproductor del macho durante la eyaculación; servir de activador a los espermatozoides, previamente no móviles; y proporcionar un medio rico en nutrientes, amortiguado, que colabora en mantener la supervivencia de los espermatozoides **(Evans y Maxwell, 1990; Urroz, 2000)**. El plasma es abundante en compuestos orgánicos: fructosa, ácido ascórbico, ácido cítrico, inositol, espermina, colina, creatina, glicerilfosforilcolina, ácido glutámico y ciertas enzimas que son muy importantes en el metabolismo de los espermatozoides **(Delgadillo, 2005; Kolb, 1979; Cole, 1984)**. De igual forma, contiene una gran cantidad de proteínas, aminoácidos libres y amoniaco; como también, constituyentes inorgánicos: sodio, potasio, calcio, minerales vestigiales y dióxido de carbono **(Sato *et al*, 1992; Salisbury, 1978)**. El plasma seminal caprino es rico en fosfolipasa A, producida en la glándula bulbouretral. Dentro de estas, las principales son: la enzima coagulante de la yema de huevo (EYCE) y la Glicoprotein-Lipasa (BUSgp60) **(Vera, 2006)**. En contraste, la glicerilfosforilcolina se forma en el epidídimo y no en las glándulas accesorias. **(Mann, 1964)**. Esto último nos indica, que los componentes específicos de cada glándula, pueden ser utilizados como marcadores bioquímicos de la función glandular **(Borque, 1989)**.

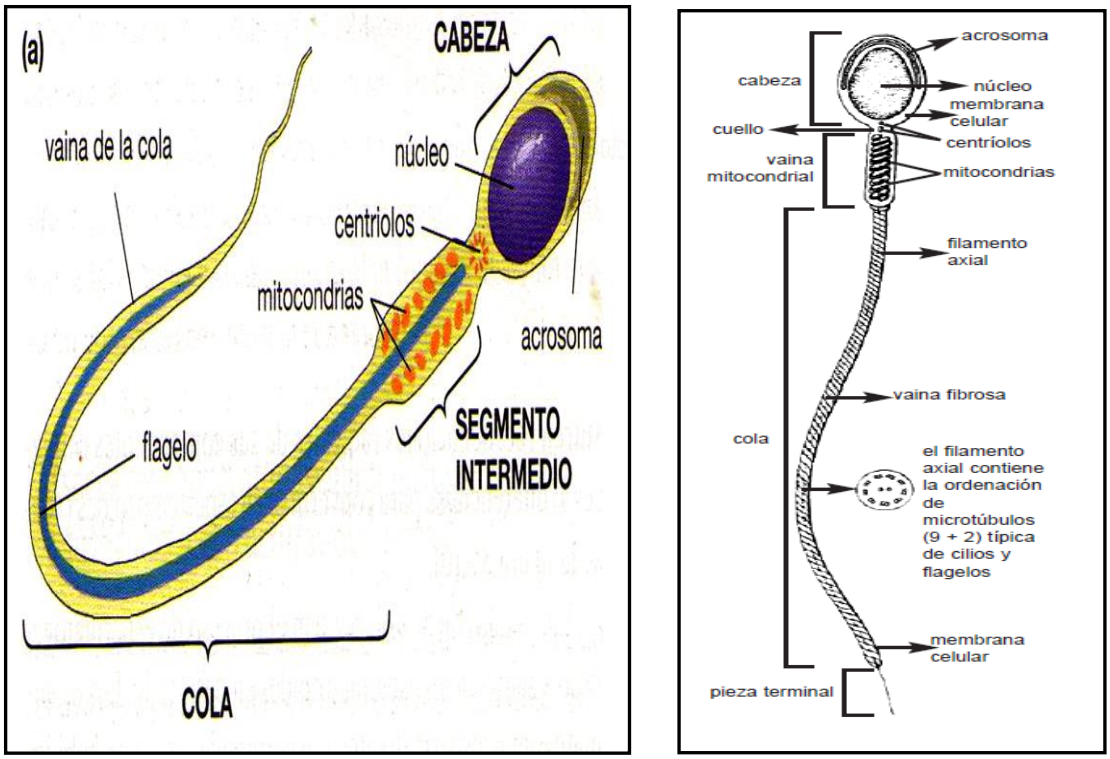
2.2.1.2. Espermatozoides

Los espermatozoides son los gametos masculinos que han evolucionado para ejecutar como función única la fecundación del ovocito **(Mc Donald, 1981)**.

a) Estructura del Espermatozoide

Un espermatozoide es una célula altamente especializada, que consta, según se observa en la Figura 6: de cabeza, segmento medio y cola **(Frandson, 1992; Urroz, 2000)**. La cabeza es plana y ovoide; y ocupada por el núcleo, en casi su totalidad. Este núcleo se extiende un tercio de la longitud de la cabeza, conteniendo el material genético paterno, en el acido desoxirribonucleico de los cromosomas **(Evans y Maxwell, 1990; Frandson, 1992; Kolb, 1979)**. En la parte anterior se localiza el acrosoma (caperuza cefálica) y en la posterior por la membrana posnuclear **(Mc Donald, 1981)**. El acrosoma favorece la penetración del espermatozoide al ovulo, gracias a que posee grandes cantidades de una enzima llamada hialuronidasa **(Salisbury, 1978)**. Los espermatozoides maduros contienen muy poco citoplasma. Por lo tanto, no es de extrañar que el espermatozoide contenga muy poco ácido ribonucleico **(Cole, 1984)**. El segmento medio ha sido descrito como el motor del espermatozoide, pues la mitocondria se concentra en esta región **(Frandson, 1992)**. Otros incluyen el segmento medio dentro de la sección de la cola, diferenciando así tres regiones: pieza proximal, pieza principal y pieza terminal. La pieza proximal es la región más gruesa de la cola que equivale al segmento medio **(Evans y Maxwell, 1990; Mc Donald, 1981)**. La pieza intermedia o principal, es la parte más larga

FIGURA 6. ESTRUCTURA DE LOS ESPERMATOZOIDES.



FUENTE: Audesirk, 2003. Biología. La Vida en la Tierra.
Hidalgo, 2005. Análisis del Semen Bovino.

de la cola, y de dos centriolos asentados en la parte terminal del segmento medio se extienden unas fibrillas (generalmente nueve externas y nueva internas) que se dirigen a la cola. La pieza terminal es relativamente corta y no tiene vaina ninguna **(Frandson, 1992; Sorensen, 1982)**. La largura total de los espermatozoides es de unos 60 micrones (µm) y la cabeza mide de ocho a 10 µm **(Evans y Maxwell, 1990)**. Un estudio sobre los parámetros morfosimétricos de la cabeza del espermatozoide caprino, definidos a través de un ASMA (Análisis Automático de la Morfología Espermática), determinaron medias de longitud 8.056 µm, anchura 3.661 µm, área 24.625 μm^2 y perímetro 20.514 µm **(Hidalgo *et al.*, 2002)**.

b) Fisiología y Metabolismo de los Espermatozoides

Los espermatozoides se producen en cantidad proporcional al peso del testículo, aproximadamente 13.5 millones por gramo de testículo al día **(Tabernero, 2006)**. El movimiento de la cola es el responsable de la propulsión de los espermatozoides en los líquidos, resultando de la contracción y relajación de las fibrillas del núcleo axial; y las mitocondrias son los orgánulos responsables de aportar la energía necesaria para la locomoción **(Evans y Maxwell, 1990)**. Cuando los espermatozoides abandonan el testículo son virtualmente inmóviles, incapaces de fertilizar óvulos y aún contienen gránulos citoplasmáticos alrededor de la pieza intermedia. Su composición y metabolismo son completamente diferentes de los espermatozoides eyaculados **(Cole, 1984)**. Un espermatozoide puede recorrer el epidídimo de extremo a extremo en aproximadamente 14 a 20 días. La mayor parte de los espermatozoides se almacena en la cola del epidídimo, donde pueden vivir por un tiempo indefinido **(Frandson, 1992)**. Cuando llegue el momento, el espermatozoide utiliza a las enzimas hialuronidasa y acrosina, impregnando al ovulo para remover las células granulosas alrededor de este **(Sato *et al.*, 1992)**. Además, la supervivencia de los espermatozoides luego del eyaculado, depende de la zona del aparato reproductor femenino de la hembra, donde estos se localicen **(Urroz, 2000)**. A pesar de que el espermatozoide carece de muchos organelos, las mitocondrias contienen los sistemas enzimáticos que efectúan las reacciones bioquímicas como el ciclo de Krebs, el transporte de los electrones y la fosforilación oxidativa, produciendo la energía necesaria en forma de ATP para la movilización de los

espermatozoides **(Frandson, 1992; Hafez, 1989)**. Los sustratos utilizados son: glucosa, fructuosa, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido propiónico, acido butírico ácido oxalacético y otros **(Kolb, 1979; Hafez, 1989)**. El carácter móvil de los espermatozoides proporciona un medio del que puede evaluarse su estado fisiológico, teniendo en base, que el metabolismo de los espermatozoides del macho cabrío puede metabolizar rápidamente la glucosa o la fructosa hasta acido láctico en condiciones anaeróbicas. Los espermatozoides de todas las especies pueden oxidar estos azucares también, hasta bióxido de carbono en condiciones aeróbicas. La movilidad de los espermatozoides está correlacionada con el contenido intracelular de AMP-cíclico, y esta importante coenzima se pierde rápidamente si se daña a los espermatozoides **(Cole, 1984; Hafez, 1989)**. En otras palabras, el metabolismo típico de los espermatozoides comprende la glicólisis y la respiración. El semen del ganado utiliza glucosa, fructosa y manosa en condiciones aeróbicas, pero en las condiciones anaeróbicas usa glucosa y manosa antes que a la fructosa, resultando alta la capacidad del espermatozoide para degradar fructosa en el macho cabrío **(Sato *et al.*, 1992)**. El patrón metabólico de los espermatozoides testiculares difiere del correspondiente a las células epididimarias y eyaculadas; incluyéndose una mayor glicólisis anaeróbica para los espermatozoides del epidídimo. Por lo tanto, se considera que la motilidad y la actividad metabólica del esperma son estimuladas a medida que las secreciones de glándulas accesorias se agregan a las contribuciones de testículos y epidídimos durante la eyaculación. **(Mc Donald, 1981**; **Salisbury, 1978)**. Finalmente, al culminar una eyaculación se presentan espermatozoides

no eyaculados en el canal espermático. Se han propuesto dos teorías del destino de estos espermatozoides: una es; la creencia que son destruidos y reabsorbidos en el tracto masculino; y la otra sugiere que pasan a la uretra, siendo expulsados con la orina **(Cole, 1984)**. Demostrándose por lo menos, que en estos sementales el esperma puede reabsorberse en los canales, o pueden ser digeridos o fagocitados en el epidídimo **(Salisbury, 1978)**.

2.2.2. Características Físico-Químicas del Semen

2.2.2.1. Color

El color del semen caprino varía del blanco cremoso al amarillento. La presencia de riboflavinas en el plasma seminal del macho cabrío, está sujeta a variaciones raciales e individuales **(Mendoza, 1989; Evans y Maxwell, 1990)**.

2.2.2.2. Volumen

La cantidad de semen por eyaculado varía según el método de recolección seminal y otros factores. Empero, el volumen promedio aproximado en vagina artificial es de 1.0 a 1.5 centímetros cúbicos **(Tabernero, 2006; Ortiz, 2004)**.

2.2.2.3. Concentración de Células Espermáticas

La concentración media estimada en el ganado caprino es de 2,500 a 3,000 millones de espermatozoides/mililitros; pero su amplitud mayor puede llegar a los 6,000 millones **(Evans y Maxwell, 1990; Tabernero, 2006; Morón, 2004)**.

En el Cuadro I se comparan las características del semen de varias especies de animales:

CUADRO I. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE DIFERENTES ESPECIES.

Característica	Carnero	Macho Cabrío	Toro	Verraco	Caballo
Volumen (ml)	1.0-1.5	0.5-1.5	4.0-8.0	150-250	50-120
Concentración (millones espz./ml)	2,000-6,000	1,500-5,000	1,500-2,500	150-300	150-300
Total de Espermatozoides (millones espz.)	2,000-9,000	750-7,500	6,000-20,000	22,500-75,000	7,500-36,000
Porcentaje Espermatozoides por eyaculado (por volumen)	30	25	14	7	2
Porcentaje de Motilidad	75	80	70	60	70
Porcentaje de Morfología Normales	90	90	80	60	70
Eyaculaciones por Semana	20	20	4	3	3
Células Vivas por Inseminación (millones espz.)	120	60	10	1,200	100

FUENTE: Evans y Maxwell, 1990. Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras.
Cole, 1984. Reproducción de los Animales Domésticos.

2.2.2.4. Densidad y Viscosidad

La densidad del esperma depende de distintos factores, entre los cuales está la cantidad de copulas, afirmándose que al aumentar el número de coitos disminuye la densidad del esperma. La densidad del semen caprino se encuentra entre dos a cinco millones de unidades por mm^3 **(Kolb, 1979)**. La viscosidad del semen difiere dependiendo de la concentración del esperma y la composición de plasma seminal. La viscosidad del semen de macho cabrío es alta (de varios centipoise) comparada con otros animales, pero parecida a la del

carnero cuantitativamente **(Sato *et al.*, 1992)**. Este parámetro está fuertemente correlacionado con la concentración de células espermáticas, pero no con la capacidad de las células para sobrevivir al almacenamiento **(Salisbury, 1978)**.

2.2.2.5. pH

El pH del plasma seminal se mantiene muy próximo a siete por un completo sistema amortiguador. Algunos estudios han encontrado pH de 6.7 $\pm$ 0.1 en machos de raza Dwarf del oeste de África, sometidos a diferentes frecuencias de colección seminal **(Oyeyemi, 2000)**. Mientras que en otros, se han determinado concentraciones de 7.16 (reportando leve alcalinidad) en machos jóvenes y 6.97 en machos adultos de la raza Murciano-Granadina **(Rocas *et al.*, 1991)**.

2.2.2.6. Solutos

El plasma seminal está compuesto por gran cantidad de solutos (además de los espermatozoides) suspendidos en el plasma seminal. El plasma seminal de los machos cabrío contiene prostaglandinas por valores mayores a 40 µg/ml, una concentración alta para un líquido corporal **(Evans y Maxwell, 1990)**. Según las investigaciones de **Mann (1964)**, el semen de macho cabrío posee sustancias en proporciones parecidas, pero no iguales, al del carnero. En contraste, presenta algunas diferencias, encontrándose una menor concentración de glicerilfosforilcolina de 1,400 a 1,600 mg/100 ml, en comparación al del carnero, y la ausencia de la ergotioneína. Además, se ha identificado la presencia de fosfolípidos por valores de 29 mg/ 100 ml de semen en carneros, siendo este

valor hasta el doble según la raza en los machos cabríos **(Mc Donald, 1981)**. Conocido es la alta concentración de fosfolipasa A, en comparación con otras especies, que colabora a la formación de productos tóxicos para los espermatozoides en ciertos medios dilutores **(Evans y Maxwell, 1990)**. Adicional, se halló en animales adultos de la raza Murciano-Granadina, valores promedios de fructosa de 930 mg/ 100 ml, y de ácido cítrico, 340 mg/ 100 ml **(Rocas *et al.*, 1991)**. Los niveles de solutos dependen del lugar del aparato reproductor de donde se obtengan. Al respecto **Salisbury (1978)**, encontró diversas concentraciones de iones inorgánicos en diferentes secciones de los órganos reproductivos del macho cabrío (Cuadro II).

CUADRO II. CONCENTRACIONES DE Na, K Y Ca EN LOS LÍQUIDOS DE VARIAS LOCALIZACIONES DE LAS VÍAS REPRODUCTORAS DE OCHO MACHOS CABRÍOS (MG/100 ML).

Localización	Machos Cabríos		
	Sodio (Na)	Potasio (K)	Calcio (Ca)
Testículos	168	331	7
Cabeza del Epidídimo	302	152	9
Cola del Epidídimo	128	148	5
Ampolla	112	120	6
Vesícula Seminal	200	238	12

FUENTE: Salisbury, 1978. Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los Bóvidos.

2.2.3. Factores Correlacionados a la Vitalidad Espermática

La producción de espermatozoides es continua hasta la muerte del macho **(Tabernero, 2006)**. Aunque, está puede variar con la raza, la edad, el individuo, la alimentación y los factores ambientales como época del año, fotoperiodo,

temperatura y humedad relativa **(Daza, 2004)**. Además, de la influencia de enfermedades sistemáticas y prácticas de manejo, que lo manifiestan no solo en su capacidad copulatoria sino en la congelabilidad de los eyaculados **(Galina, 1995; Pérez, 1992)**.

En las regiones tropicales y subtropicales, frecuentemente se ha señalado que la nutrición es el factor que controla la reproducción anual de los caprinos **(Delgadillo, 2005)**. Una sobrealimentación favorece el engrasamiento de los machos que producen semen de peor calidad, pues el porcentaje de espermatozoides muertos aumenta y disminuye la motilidad de los vivos. Asimismo, la alimentación escasa (sub-alimentación), en cantidad y calidad, provoca una disminución de espermatozoides por eyaculado y peor calidad del semen **(Tabernero, 2006)**. En efecto, la carencia de energía, proteína y nutrientes esenciales provocan trastornos funcionales tanto prehipofisiario como gonadales; la avitaminosis A o las carencias de ciertos oligoelementos (fósforo, calcio, yodo, zinc, manganeso y cobalto) juegan un papel importante sobre este aspecto **(Kolb, 1979)**. En cambio para **Cabrera *et al.* (1998)**, la edad de los machos es el factor de mayor influencia en la producción seminal, ya que estas dos variables están muy correlacionadas, afirmando que los animales jóvenes presenta una menor cantidad y calidad seminal como regla general **(Rocas *et al.*, 1991)**. Así se muestra en un ensayo, diferencias en la calidad seminal de machos de la raza Murciano-Granadina entre la edad de ocho y 14 meses **(Mateo, 1990)**.

En cuanto a la época o estación del año, **Dorado *et al.* (2003)** encontraron en machos de la raza Florida, que la concentración y el número de espermatozoides totales por eyaculado disminuyen en otoño y verano, y se incrementan en invierno y primavera. Pero, los valores medio de morfología espermática fueron mejores en otoño (82.0%), que en primavera y verano (71.0 y 70.0%). En altas latitudes (mayor que 35° latitud Norte y Sur), la mayoría de las razas muestran una marcada estacionalidad reproductiva; en las latitudes subtropicales (25 a 35° latitud), hay diferencias raciales con respecto la duración y la época del año en que ocurra la actividad sexual; mientras que en las latitudes tropicales, los machos no presentan variaciones estacionales. **(Delgadillo, 2005)**. Igualmente, la influencia del fotoperiodo sobre la estacionalidad del macho varía con la latitud **(Daza, 2004)**. A latitudes altas, el fotoperiodo influye en condiciones ambientales en donde los días cortos estimula la actividad sexual, mientras que los días largos la inhiben (modulando la melatonina) **(Delgadillo, 2005)**. Por otra parte, el estrés calórico y las temperaturas elevadas (>34°C) impiden la fabricación normal de espermatozoides, siendo más marcado en las razas transferidas a los climas calientes y húmedos **(Tabernero, 2006; Delgadillo, 2005)**. De igual forma, la exposición al frío intenso (-5.0 °C) causa atrofia de las glándulas sexuales accesorias **(Mc Donald, 1981).**

Otro aspecto, es el comportamiento o relación social entre machos y hembras. Por ejemplo: en los machos durante la recolección de semen, es mejor en

aquellos mantenidos en corrales individuales que en los alojados en grupos unisexuales **(Delgadillo, 2005).** También la frecuencia de colecta seminal afecta, señalándose que la calidad del semen decrece cuando el semental es usado excesivamente; asimismo el poco uso reduce la calidad y la fertilidad **(Koeslag, 1982)**. Un estudio sobre los efectos de eyaculaciones sucesivas en un espermiograma, estableció que hubo diferencias de machos con una colecta diaria semanalmente (7.20% de morfoanomalías totales) a machos con dos recogidas a intervalos de cinco horas diarias durante 21 días (78.20% de morfoanomalías totales) **(Oyeyemi, 2000)**. Además, la actividad muscular o el ejercicio mejoran la espermatogénesis, por lo que es necesario para el buen control de la salud, ya que previene la obesidad **(Sato *et al*., 1992)**.

2.2.4. Valoración y Contrastación Seminal

A pesar de que es obvio, que la única medida válida de la viabilidad del semen está en la observación de la fertilidad de las hembras inseminadas **(Cole, 1984)**; se debe evaluar el semen para determinar la utilidad del semental o la de un eyaculado en particular. También se emplea la evaluación para anticipar el valor de un semental como pie de cría, bajo condiciones de pastoreo, monta controlada o inseminación artificial **(Sorensen, 1982)**. La evaluación del semen se hace observando los parámetros: macroscópicos (volumen, color) y microscópicos (motilidad, concentración espermática, porcentaje de vivos/muertos, formas normales y otros) **(Mellisho, 2006)**.

2.2.4.1. Análisis Macroscópico

a) Volumen

El volumen de eyaculado se puede medir directamente en el tubo de recogida, si esta calibrado con un tubo de centrífuga o tubo colector; esto solo es significativo si se usó la vagina artificial **(Galina, 1995)**. Cuando la recogida se hace con vaginal artificial el promedio del volumen es de 1.0 milímetro, lo cual depende de la edad y condición del animal, frecuencia de recogida y destreza del operario. El volumen de cada eyaculado disminuye con la frecuencia de las recogidas dentro del mismo día o a lo largo de varias fechas. Cuando el semen se obtiene por electroeyaculación, el volumen depende mucho de la destreza del operario así como también de la respuesta del semental. **(Evans y Maxwell, 1990)**.

b) Aspecto Físico

El color del semen es el primer factor que se valora y se debe hacer en el mismo tubo colector, inmediatamente obtenido. Su consistencia da una apariencia cremosa, lechosa, opalescente o acuosa, que se ha utilizado principalmente como indicador de concentración espermática **(Morón, 2004)**. El semen de macho cabrío varía de color entre blanco grisáceo o blanco amarillento, este color puede variar de unos eyaculados a otros. La presencia de sangre dará al semen una coloración rosácea y puede ser debido a lesiones del pene durante la recogida. Las coloraciones gris o parda son indicadores de contaminación o alguna clase de infección en el sistema reproductor **(Evans y Maxwell, 1990)**. Si

hay presencia de orina, existirá un olor característico, además de una decoloración amarillenta. En el caso de animales enfermos, algunos suelen presentar glóbulos blancos o pus en el eyaculado **(Sorensen, 1982)**.

2.2.4.2. Análisis Microscópico

La valoración de la calidad del esperma se basa, sobre todo, en el examen microscópico de los espermatozoides, que nos permite apreciar su número y morfología **(Kolb, 1979)**.

a) Motilidad

La motilidad se valora mediante la característica onda de movimiento del semen o según la proporción de la motilidad progresiva de los espermatozoides en una muestra **(Evans y Maxwell, 1990)**, expresada como el porcentaje de células móviles o vivas **(Sorensen, 1982)**. Inicialmente, esta prueba ha sido determinada de forma subjetiva a través del microscopio. Sin embargo, en la Era Moderna, se utilizan medios de mayor grado tecnológico para el análisis del semen como el sistemas C.A.S.A (Computer-Assisted Sperm Analysis System), que resulta más preciso y por lo general su valor está por debajo del análisis manual. Además, son capaces de determinar parámetros de velocidad y angularidad, que colaboran con el mejor establecimiento del grado de calidad de movimiento **(Kozdrowski *et al.*, 2007; Theau-Clement *et al.*, 1996)**.

- **Motilidad Masal**

La motilidad masal valora la formación y progresión de ondas producidas por el desplazamiento de los espermatozoides; establecido como criterio adecuado de valoración bajo condiciones de campo. Las ondas de movimiento solo se pueden observar en las especies que poseen una alta concentración espermática en el semen, como es el caso de los ovinos y caprinos **(Evans y Maxwell, 1990)**. Para evaluarlo se coloca una pequeña gota sobre un portaobjeto atemperado a 36 - 37°C, sobre una platina térmica de microscopio, y se le observa a 40x y 100x. La intensidad del movimiento permite hacer una apreciación subjetiva de acuerdo con una escala de cero a cinco, considerándose los puntos intermedios **(Gómez, 2006; Galina, 1995)**. Las calificadas como cuatro o cinco son las utilizadas para los programas de inseminación artificial **(Gibbsons, 1993)**. El movimiento en masa depende de tres factores: la concentración, el porcentaje de células con movimiento progresivo y la velocidad de movimiento de los espermatozoides. Cuando uno de estos parámetros se encuentra disminuido, las ondas rápidas en remolinos esperadas son severamente deprimidas o eliminadas. Por ejemplo, un semen con una consistencia acuosa puede tener un 80 por ciento de motilidad progresiva individual, pero no habrá ondas de movimiento; mientras, que un semen altamente concentrado con sólo 50 por ciento de motilidad espermática, mostrará algunas ondas de movimiento **(Pezzone, 2008)**.

- **Motilidad Individual Progresiva**

En cuanto a la motilidad individual, se utiliza un aumento mayor del microscopio (100x ó 400x). Esta prueba es importante, porque está muy correlacionada con la capacidad fecundante del espermatozoide. Este método se utiliza para muestras de semen que se han diluido o que se han conservado y por ello, pueden tener una motilidad reducida **(Evans y Maxwell, 1990)**. La evaluación toma en cuenta la rapidez y lo rectilíneo del movimiento de los espermatozoides **(Delgadillo, 2005)**. Una buena muestra debe tener 70 por ciento de espermatozoides con este tipo de movimiento en semen fresco **(Galina, 1995)**. Según el Departamento de Medicina del Rodeo y Teriogenología de la Universidad de Saskatchewan, Canadá; los valores correspondientes para semen descongelado deben ser como mínimo 25 por ciento a la cero hora y 15 por ciento a las dos horas de incubación **(Gómez, 2006)**. Los movimientos de los espermatozoides que deben ser tomados en cuenta son: progresivo rectilíneo, ondulatorio, rotatorio e inmovilidad absoluta. Mediante métodos de observación fotoeléctrica al paso de los espermatozoides, se ha determinado que existen propiedades que caracterizan al movimiento espermático normal, y estos son: la órbita de movimiento es una curva ligera, cuando tiene un movimiento de rotación sobre su eje longitudinal y la ondulación de la cola es de tipo tridimensional. La valoración de la motilidad individual en los diferentes métodos es sumamente subjetiva. Para determinarla se cuentan 10 a 20 espermatozoides por campo microscópico y se anota el tipo de movimiento. Se deben contar varios campos microscópicos y calcular un promedio **(Pezzone, 2008)**.

b) Vigor

El vigor es evaluado al mismo tiempo que la motilidad individual, teniendo en cuenta la velocidad con la que estos espermatozoides atraviesan el campo. **(Gómez, 2006)**. En condiciones normales, la velocidad de movimiento hacia delante de un espermatozoide, suspendido en plasma seminal, es de cinco a 15 milímetros por minuto (promedio siete milímetros/minutos) **(Evans y Maxwell, 1990)**. La escala que se utiliza es también de cero a cinco y se considera un semen congelado aceptable, si al descongelarlo se obtienen valores mínimos de tres, a la hora cero, y dos a las dos horas post-descongelación **(Gómez, 2006)**.

c) Concentración de Células Espermáticas

La concentración espermática viene definida como el número de espermatozoides por unidad de volumen (expresado normalmente en millones por ml) de eyaculado **(Cortés, 2003)**. Se utiliza también para calcular el número total de espermatozoides por eyaculado **(Sorensen, 1982)**. Esta variable, puede ser valorada por ensayos basados en la consistencia o apariencia del semen, por el uso de un hemocitómetro (cámara de Newbawer), espectrofotómetro o fotocolorímetro, espermatocitómetro o espermatocrito, o contador electrónico de partículas **(Galina, 1995; Ortiz, 2004)**. La técnica más empleada es la espectrofotometría y se obtiene este parámetro mediante una tabla de conversión, asignando por el valor de transmitancia. Los diferentes métodos varían en su rapidez y seguridad; sin precisar una correlación de la metódica, aunque debe ser rápida para las condiciones de campo **(Evans y Maxwell,**

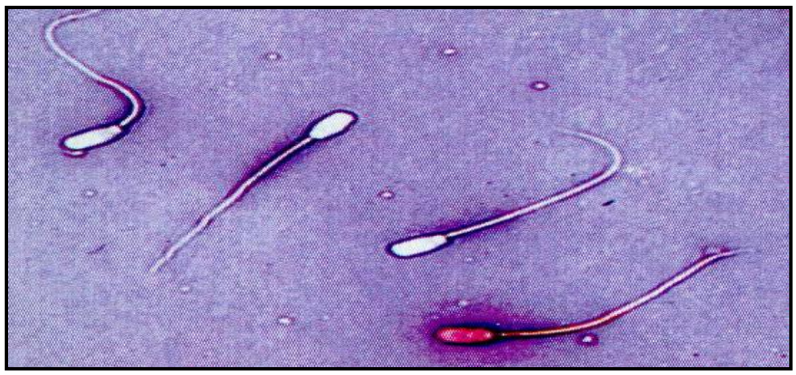
1990). En la cámara de Newbawer se utilizada una muestra de semen diluido, con algún solvente salino u otro **(Delgadillo, 2005)**, siendo apropiado su uso cuando el número de muestras que se van a evaluar no es muy grande **(Sorensen, 1982)**. Para ello, se carga la cámara con la solución de la muestra y se deja reposar de cinco a 10 minutos para que sedimenten los espermatozoides. La cuenta se hace con el microscopio a 400x y se realiza en cinco cuadros grandes (80 cuadros pequeños) del área central de la cámara **(Cruz, 2004-a)**. Utilizando luego, una fórmula corregida con la proporción de dilución, con la que se obtiene la concentración espermática **(Cueto, 2000)**. Sin embargo, el espectrofotómetro graduado a 550 nanómetros, permite determinar rápidamente y con precisión la concentración de los eyaculados. Para ello, es necesario obtener una curva estándar utilizando de 20 a 25 eyaculados con concentraciones en espermatozoides previamente determinados con el hemocitómetro **(Delgadillo, 2005)**.

d) Proporción de Vivos y Muertos

Se descubrió que los espermatozoides vivos resisten a los colorante supravitales, mientras que los muertos los absorben **(Sorensen, 1982)**. Por tal motivo, se utilizan colorantes a base de eosina y nigrosina para la determinación del porcentaje de espermatozoides vivos/muertos. En esta, se requiere realizar un frotis mediante cubre y porta objeto, observando luego en el microscopio (400x) **(Zarazaga, 2008; Mellisho, 2006)**. Para determinar este parámetro es necesario contar al menos 200 espermatozoides, contando los transparentes o

blancos como vivos y los teñidos o rosas como muertos **(Cruz, 2004-a)**. También se pueden utilizar otras tinciones como: Eosina-verde resistente FCF. Los porcentajes de células calculados por este método son ligeramente inferiores a los determinados por el método visual, lo que indica que algunas células mueren y se colorean durante el proceso **(Sorensen, 1982)**. Las tinciones que requieren varios pasos, incluyendo lavados, son más perjudiciales para los espermatozoides y más inexactas dado que pueden lavar algunos elementos del semen y cambiar el resultado final **(Pezzone, 2008)**. En la Figura 7 se puede apreciar la diferencia en la tinción de los espermatozoides vivos y muertos.

FIGURA 7. ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS MEDIANTE TINCIÓN EOSINA Y NIGROSINA.



FUENTE: Morón, 2004. Evaluación Reproductiva del Macho.

e) Morfoanomalías en Células Espermáticas

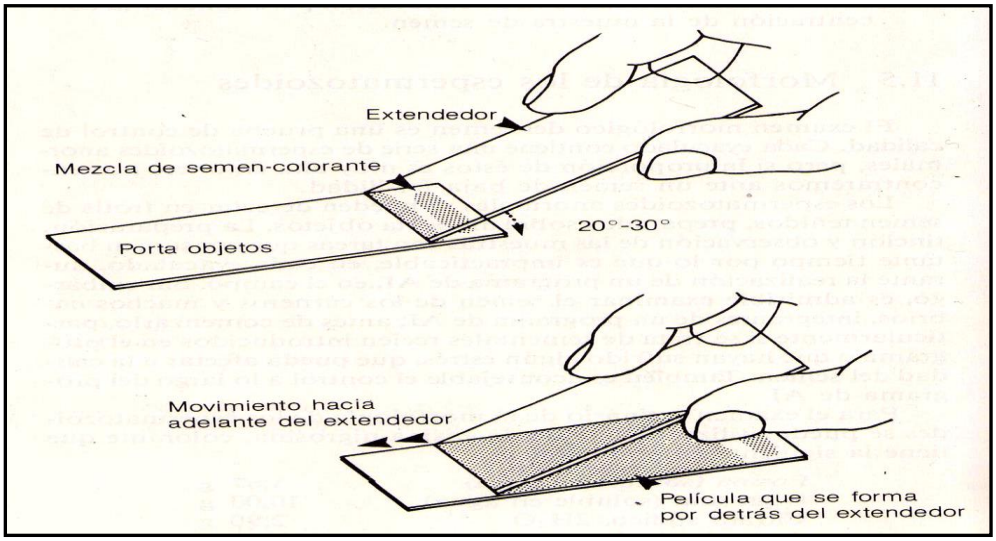
En el análisis de morfoanomalías o morfología espermática (formas normales), el objetivo es determinar aquellos animales no aptos para la reproducción, a fin de eliminarlos **(Cortés, 2003)**. Un eyaculado de macho cabrío se considera normal cuando el porcentaje de formas anormales es inferior al 15 por ciento

(Evans y Maxwell, 1990; Gómez, 2006). Por lo cual, es un buen indicador de las lesiones o fisiopatologías del aparato reproductor masculino **(Smith y Sherman, 1994)**.

Estas anormalidades espermáticas pueden observarse simultánea o separadamente en la cabeza, cuello, pieza intermedia y parte principal de la cola de los espermatozoides **(Pezzone, 2008)**. Para establecerla, el semen se mezcla con colorantes y se realiza un frotis preparado sobre un portaobjeto (Figura 8); existiendo gran cantidad de tinciones, como son: eosina-nigrosina, Karras, rojo de Bengala-Azul, Victoria, Wells, Williams, Giemsa, tinta china, Fuchina Fenicada, violeta de metilo, anilina y muchas otras **(Galina, 1995)**. Para luego, realizar un conteo de por lo menos 150 células en diferentes campos de la preparación **(Delgadillo, 2005)**. La observación es más fácil a gran aumento (450x o más); aunque, el microscopio de contraste de fases es mucho más satisfactorio **(Sorensen, 1982)**. No obstante, el método que permite valorar de forma más precisa, objetiva y repetible la forma y dimensiones de la cabeza del espermatozoide es el análisis automático de la morfología espermática (ASMA) **(Hidalgo *et al.*, 2002)**. Las anormalidades de los espermatozoides se deben a espermatogénesis o espermiogénesis defectuosas producidas por la herencia, enfermedades y efectos ambientales adversos. También pueden producirse por técnicas inadecuadas de manipulación del semen**.** Desgraciadamente, no es siempre fácil distinguir entre las ocasionadas durante la espermatogénesis y las causadas por técnicas inadecuadas de manipulación del semen. Se precisa para

tal diferenciación: experiencia en la manipulación del semen, en las técnicas de tinción y en el examen del esperma **(Salisbury, 1978)**.

FIGURA 8. TÉCNICA PARA LA PREPARACIÓN DE FROTIS DE SEMEN TEÑIDO.



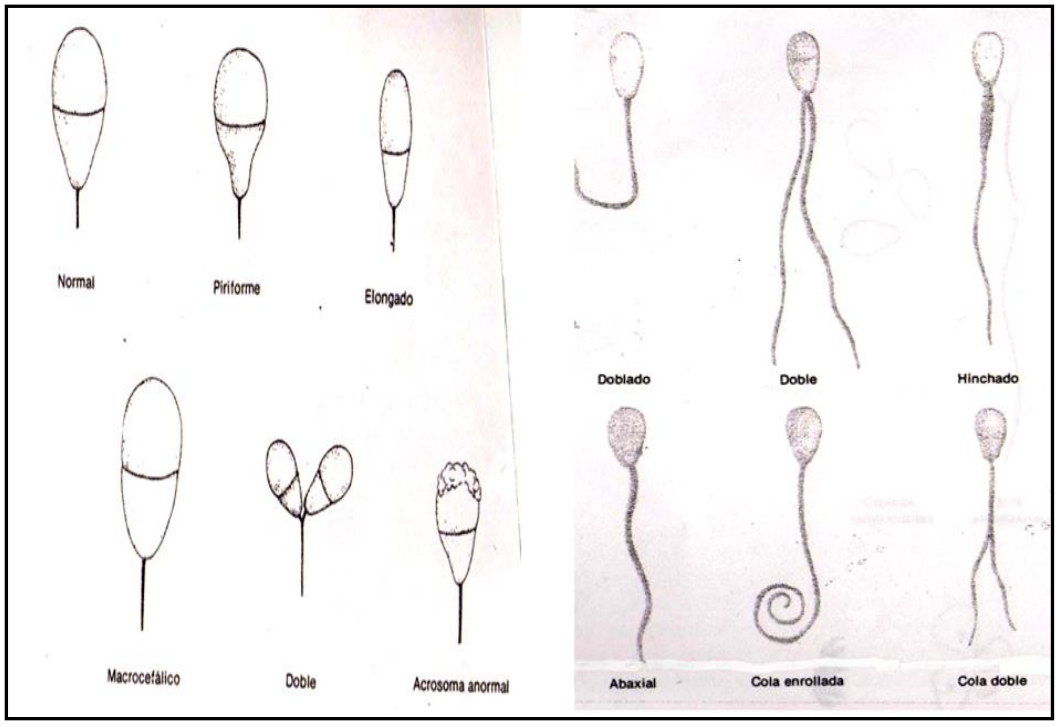
FUENTE: Evans y Maxwell, 1990. Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras.

- **Morfoanomalías Primarias y Secundarias**

Es la clasificación más utilizada en la bibliografía, pero no por ella la más exacta **(Gómez, 2006)**. Con anterioridad, varios investigadores señalaron la importancia de las anormalidades primarias de las células espermáticas, que parecen ser consecuencia de una alteración de la espermatogénesis **(Salisbury, 1978)**. Estas son irregularidades en la cabeza como: cabezas piriformes, redondas, alargadas o estrechas, microcefálicos, macrocefálicos, entre otras. En el sistema intermedio se presentan doblado, dobles o mellizos, hinchado y abaxial; y la cola enrollada, rizada o doble. El enrollamiento es la anormalidad más común de la cola y del espermatozoide entero **(Sorensen, 1982)**. Las anormalidades

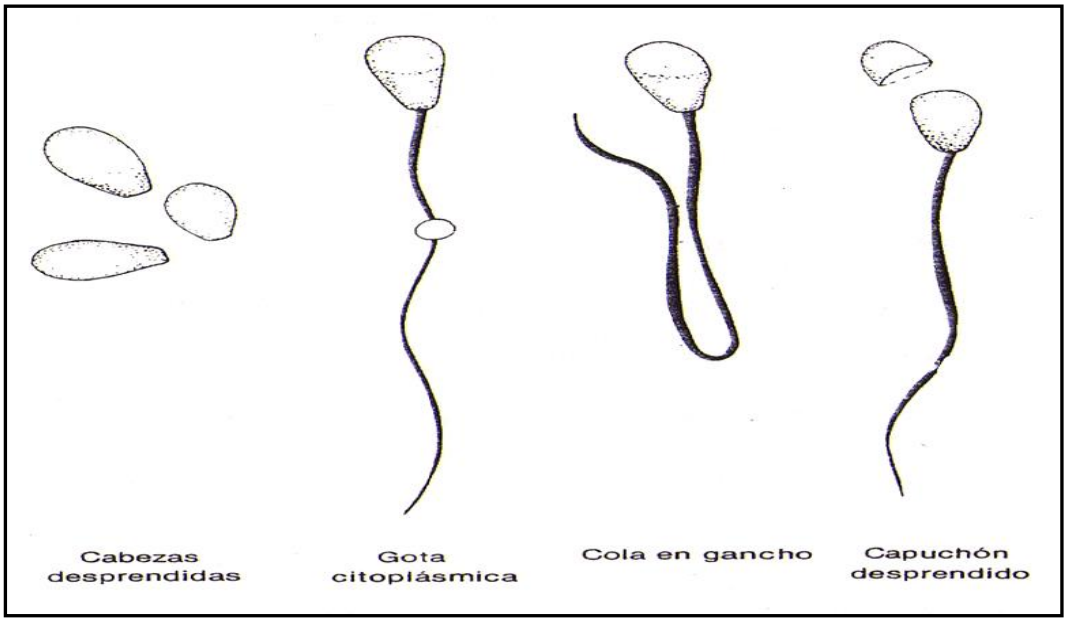
secundarias son las que ocurren dentro del epidídimo o en la espermiogénesis **(Pezzone, 2008)**. Conviene hacer hincapié en que estas anormalidades son de índole degradativa: cabeza desprendidas, gota citoplasmática en el cuello o la cola, cola desprendida de la cabeza. Por lo general, el desprendimiento de las cabezas ocurre durante la manipulación de la muestra **(Sorensen, 1982)**. Existen algunas diferencias entre autores sobre la procedencia de los defectos en los espermatozoides según el sitio de la afectación (testículo y otros órganos reproductivos). Tal es el caso de la gota proximal, considerada para algunos, como primaria y para otros, como secundaria. Por tal motivo, es un error creer que los defectos primarios son más graves que los secundarios, ya que pueden alterarse ambos sistemas simultáneamente **(Pezzone, 2008)**.

FIGURA 9. MORFOANOMALÍAS PRIMARIAS.



FUENTE: Sorensen, 1982. Producción Animal, Principios y Prácticas.

FIGURA 10. MORFOANOMALÍAS SECUNDARIAS.



FUENTE: Sorensen, 1982. Producción Animal, Principios y Prácticas.

- **Morfoanomalías Mayores o Menores**

Más recientemente, Blom ha sugerido una nueva clasificación de defectos, denominándolos morfoanomalías mayores y menores de los espermatozoides **(Gómez, 2006)**. Los defectos mayores están relacionados con alteraciones de la fertilidad o con un estado anormal de los testículos-epidídimos, combinadas ambas, para una alteración total. Mientras, los menores parecen ser menos importantes y no se encuentran juntos; interesarían únicamente cuando un defecto menor sobrepasa el 10 ó 15 por ciento **(Salisbury, 1978)**. Sin embargo, ahora se sabe que algunas alteraciones consideradas como menores son obviamente defectos estructurales y la fertilización o el desarrollo embrionario serían imposibles. Algunos ejemplos de esto son: micro y macrocéfalos y pieza media distal doblada **(Pezzone, 2008)**.

- **Otras Células**

En el plasma seminal, con poca frecuencia se encuentran otras células afectadas o foráneas, lo que indica alguna alteración en el aparato reproductivo. Estas son: formaciones semejantes a medusas, células epiteliales, leucocitos, eritrocitos y células espermiogénicas en vías de desarrollo **(Sorensen, 1982)**.

f) Integridad Acrosomal

Este análisis se refiere al mantenimiento de la estructura acrosomal y es de suma importancia, ya que tiene un nivel de correlación muy significativo entre el porcentaje de espermatozoides móviles y la fertilidad. Por lo cual, se considera la valoración del porcentaje de acrosomas intactos, como el mejor método de predecir de forma rápida la capacidad fertilizante del semen **(Mateo, 1990)**. La proporción de espermatozoides de macho cabrío con acrosomas lesionados varía con el método de congelación y con el volumen en relación a la temperatura y método de descongelación, pero no debe exceder del 70 por ciento en semen fresco **(Evans y Maxwell, 1990)** y para descongelado, valores mínimos de 60 por ciento a la cero hora y 40 por ciento a las dos horas **(Gómez, 2006)**. En la determinación del estado del acrosoma se han usado desde hace mucho tiempo diferentes tinciones; entre éstas tenemos: la tinción de eosina/verde rápido, Giemsa y la de eosina/nigrosina, las dobles y triples tinciones y además, tinciones comerciales como el Spermac® **(Hidalgo, 2005)**. La valoración del estado acrosomal se puede realizar mediante microscopia óptica de campo claro en muestras previamente teñidas con Giemsa;

microscopia de contraste de fases por inclusión de las muestras en una solución de glutaraldehído al dos por ciento en BL-1 y microscopia electrónica. Otras técnicas aprovechan la afinidad de ciertas lecitinas o anticuerpos para fijarse al acrosoma y determinar su estado **(Way, 1995; Sorensen, 1982)**.

g) Endósmosis o Prueba de Permeabilidad de Membrana

La integridad y actividad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide es de gran importancia, ya que la valoración de la funcionalidad de la membrana puede ser un indicador de la capacidad de fecundación del espermatozoide **(Cruz, 2004-a)**. Un grupo de pruebas de funcionalidad espermática que han centrado gran interés por su simplicidad y valor predictivo son las de resistencia osmótica **(Hidalgo, 2005)**.

La prueba de permeabilidad de membrana (endósmosis, Hipo-osmotic-swelling test ó HOS test) está basada en las propiedades físicas y bioquímicas de la membrana plasmática. La inclusión de células espermáticas en una solución hipoosmótica provoca el paso del agua a través de la membrana desde el medio extracelular hacia el interior del espermatozoide hasta alcanzar su equilibrio osmótico, observándose cambios morfológicos a nivel de la cola **(Eckert, 1989)**. De esta forma, la membrana plasmática se rompe y el flagelo se endereza bruscamente, pudiendo variar su morfología posteriormente de recta a ligeramente curvada o totalmente enrollada **(Cortés, 1993)**. Mientras, que las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentan

FIGURA 11. PRUEBA DE ENDÓSMOSIS, IZQUIERDA, ESPERMATOZOIDE NEGATIVO AL TEST. DERECHA, ESPERMATOZOIDE POSITIVO AL TEST (1000X).

FUENTE: Hidalgo, 2005. Análisis del Semen Bovino.

cambios de enrollamiento en la forma del flagelo **(Hidalgo, 2005)**. En la Figura 11 se observan los resultados de esta prueba. La prueba de permeabilidad de membrana esta correlacionado positivamente con la fertilización de ovocitos *in vitro* en semen fresco, test de hámster, unión a anticuerpos GB24 y tinciones vitales **(Hauser *et al.*, 1992)**. Se observan cambios en el porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva tras exponer a las células espermáticas a procesos de refrigeración, congelación y capacitación **(Fuse, 1991)**.

2.2.4.3. Análisis Bioquímico

Dentro de las pruebas, también se hacen estudios en base a procesos bioquímicos ocurridos en la célula **(Cruz, 2004-c)**. En este aspecto, se conocen entre otras pruebas: la actividad glucolítica, índice de fructólisis, producción de

ácido láctico, sodio, potasio, proteínas totales, ácido cítrico, el coeficiente respiratorio, poder deshidrogenante y acidez **(Cruz, 2004-a; Cole, 1984)**.

a) Índice de Fructólisis

La velocidad de degradación de la fructosa depende de la concentración de los espermatozoides y de la temperatura. El índice de fructólisis representa la cantidad de fructosa (en miligramos) descompuesta por 1,000 millones de espermatozoides en una hora a 37 °C. El grado de fructólisis puede medirse bien mediante la cantidad de fructosa desaparecida o bien mediante el ácido láctico producido **(Kolb, 1979)**.

b) Producción de Ácido Láctico, Ácido Cítrico y Otros

El consumo de oxígeno, la producción de dióxido de carbono o la oxidación pirúvica se puedan medir directamente o calcular indirectamente. La capacidad de amortiguador, la conductividad eléctrica y la resistencia al choque por frío son otras medidas de la vitalidad de los espermatozoides que se pueden realizar mediante análisis bioquímico **(Cole, 1984)**. Otras pruebas importantes, son el cálculo de la concentración de sodio y potasio en el plasma y la producción de ácido láctico y ácido cítrico para enfrentar el shock térmico **(Salisbury, 1978)**. Igualmente, la proteína total presente en el plasma seminal es indicador de alteraciones patológicas del aparato reproductor masculino, estando relacionada estrechamente con la congelabilidad del semen **(Borque, 1989)**. En adición, tenemos el índice de hialuronidasa, primordial en el estudio del daño acrosomal,

debido a que con los daños producidos a los espermatozoides pueden acarrearse pérdidas del contenido acrosómico (enzimas). Por tal razón, el análisis de la liberación de esta enzima en el plasma seminal proporcionar una indicación precoz de los daños sufridos a los espermatozoides durante la recogida, elaboración o almacenamiento **(Cole, 1984)**.

2.2.4.4. Análisis Biológico

Las pruebas biológicas son el resultado final de un programa de inseminación, a excepción de las pruebas de capacidad de fertilización. Algunas de estas son: el porcentaje de preñez y la fecundación in vitro **(Cruz, 2004-c)**. Una técnica muy particular es la fertilización heterospérmica, en la cual, mediante la inseminación con una mezcla de eyaculados de dos procedencias distintas, es posible comparar la capacidad de fertilización de ambas muestras sobre la base de su rendimiento competitivo en el mismo sistema reproductor femenino. Para poder valorar a los machos, se ha recurrido a inseminaciones heterospérmica con razas de colores distintos, con animales de diferentes grupos sanguíneos o con espermatozoides marcados químicamente **(Cole, 1984)**. Por otro lado, la fecundación *in vitro* (FIV), ya sean homólogos o heterólogos, se ha empleado en los últimos años para determinar las posibilidades fecundantes de los reproductores. Así, una prueba heteróloga, denominada prueba de penetración espermática en ovocitos de hámster (SPA), puede estimar el potencial fecundante de un eyaculado, en base a su capacidad para penetrar ovocitos de hámster libres de zona pelúcida. Con los sistemas homólogos se puede

conseguir una mayor aproximación a los resultados de fertilidad, ya que las condiciones de estudio se acercan más a lo que sucede *in vivo* **(Cruz, 2004-a)**.

2.3. Selección y Preparación de Machos para Colecta Seminal

La fase inicial de un programa de mejoramiento reproductivo es la selección de los reproductores en base a su valor individual, estado sanitario y aptitud dentro de la explotación (lechera o cárnica) **(Tabernero, 2006)**.

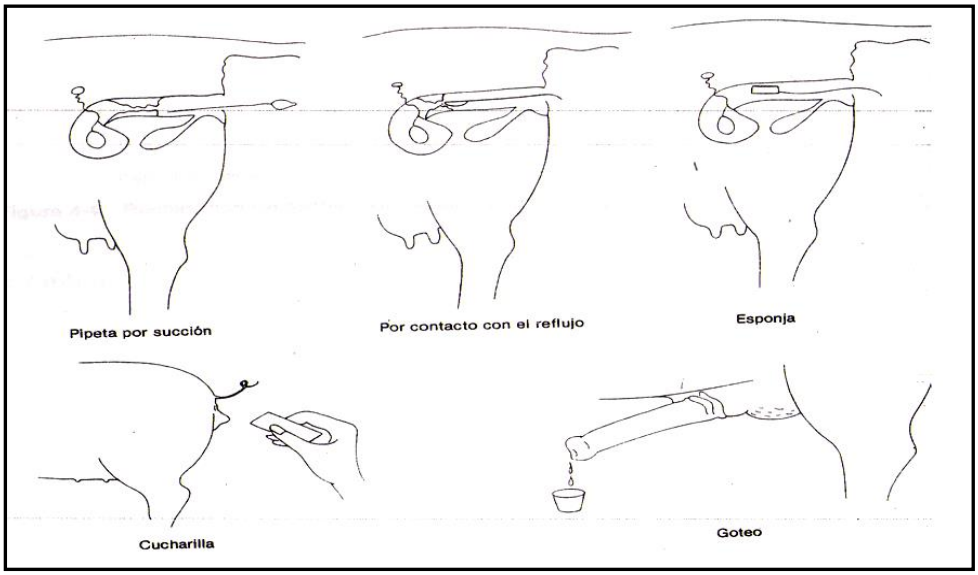
2.3.1. Métodos de Recolección Seminal

La recolección del semen se puede realizar empleando diversas metodologías y depende del propósito final de la recolección; siendo las más empleadas en pequeños rumiantes: recuperación post-coital, electroeyaculación y vagina artificial **(Evans y Maxwell, 1990; Sorensen, 1982)**.

2.3.1.1. Recuperación Pos-coital

La recuperación post-coital (Figura 12) se efectúa después de la copula normal, mediante técnicas como: recuperación por succión con pipeta, el cuchareo, la esponja, por reflujo recogido en un vaso, por contacto con escurrimiento, el condón y el dispositivo vaginal. En la actualidad, estas técnicas son muy poco utilizadas para programas de mejoramiento, pero sirven para obtener muestras para análisis seminal. Sin embargo, la recuperación con pipeta y la esponja, aún son utilizados para obtener semen para criopreservar, a pesar de que el semen se contamina con líquidos vaginales de la hembra **(Sorensen, 1982)**.

FIGURA 12. MÉTODOS DE RECUPERACIÓN POST-COITAL.



FUENTE: Sorensen, 1982. Producción Animal, Principios y Prácticas.

2.3.1.2. Electroeyaculación

La electroeyaculación consiste en la obtención de semen por medio de descargas eléctricas aplicadas a las glándulas sexuales accesorias y órganos reproductivos, las cuales están regidas por el plexo hipogástrico. La emisión del semen se logra al estimular los nervios simpáticos lumbares **(Mayén, 1989)**. Esta debe usarse cuando se precise recoger semen de un macho que no es posible entrenarlo a la vagina artificial, por lesión y enfermedad o para evaluar la fertilidad de un gran número de machos **(Evans y Maxwell, 1990; Cole, 1984)**. En el caprino, este dispositivo rectal es de 2.0 a 2.5 centímetros de diámetro y 15 centímetros de largo, en forma de bala con electrodos (Figura 13). Para la colección del semen, el macho se debe colocar en decúbito lateral, sobre una mesa o en el suelo. La sonda se humedece o se lubrica con vaselina y se inserta en el recto a una profundidad de 15 - 20 centímetros, procurando no lesionar la

mucosa. Aplicándose luego, cortos estímulos de voltaje (cuatro a ocho segundos) a intervalos de 15 a 20 segundos. Después de unos cuantos estímulos fluye la secreción de las glándulas accesorias y luego el semen. **(Morón, 2004; Evans y Maxwell, 1990)**. Como efectos colaterales indeseables de la electroeyaculación cabe citar posible lesión del los músculos de la región lumbar por mal manejo. Además del costo del equipo, no es posible evaluar el libido del animal; se obtiene un mayor volumen de semen, pero con baja concentración espermática; no siempre hay erección; el semen se contamina fácilmente con orina y se observa una mayor concentración de sodio y potasio en el plasma seminal, siendo más susceptibles al choque frío **(Mayén, 1989; Cole, 1984; Sorensen, 1982)**.

FIGURA 13. ELECTROEYACULADOR DE MACHOS CABRÍOS.

FUENTE: CENCRA, 2009. Fotos de la Investigación.

2.3.1.3. Vagina Artificial

La recolección por vagina artificial es el método más usado en ganado caprino, debido a su rapidez y limpieza, permitiendo la obtención de varios eyaculados

consecutivos **(Cortés, 2003; Cole, 1984)**. La vagina artificial es una imitación de la vagina de la cabra que proporciona el estímulo térmico (temperatura) y mecánico (presión) para la erección del pene y la eyaculación **(Evans y Maxwell, 1990)**. La cual, está compuesta por un tubo rígido de hule de aproximadamente 20 centímetros de longitud por cuatro a cinco centímetros de diámetro, con una válvula exterior; por el lumen del tubo se introduce una manga de látex de 30 centímetros, el cual se dobla sobre los extremos del tubo, creando así un espacio de aire. En uno de los extremos del tubo se coloca un cono de látex con un colector. Por la válvula del tubo de hule se introduce agua caliente a una temperatura de 40 a 45 °C **(Mayén, 1989)**. La longitud de la vagina, la temperatura y la presión tienen gran importancia y deben determinarse experimentalmente **(Sorensen, 1982)**. En la Figura 14 se muestra este dispositivo así como parte de la operación para la recogida del eyaculado.

En la recogida, el operario, en posición de agachado, coloca la vagina artificial en el flanco derecho a la hembra, sujetando la vagina con la mano derecha, de tal forma que el extremo abierto quede mirando hacia el macho y abajo, con un ángulo de unos 45°. Los operarios utilizan la mano izquierda para sujetar la vaina y dirigir el pene a la extremidad abierta de la vagina artificial **(Evans y Maxwell, 1990)**. Cuando el pene entra en contacto con la superficie caliente de la vagina artificial, el semental da el característico “golpe de riñón” y eyacula dentro del extremo superior del tubo recolector **(Quittet, 1986)**. Para que ocurra la eyaculación hay que asegurarse que la vagina tenga una temperatura entre

FIGURA 14. VAGINA ARTIFICIAL Y RECOLECCIÓN SEMINAL MEDIANTE ESTE MÉTODO.

FUENTE: CENCRA, 2009. Fotos de la Investigación.

39 y 43 °C. En programas de selección es imprescindible asignar una vagina artificial a cada macho con el fin de no mezclar eyaculados. **(Gibbsons, 1993; Mellisho, 2006)**. Por otro lado, ocurren ocasionalmente eventos indeseables, como la eyaculación retardada y la masturbación en los machos **(Evans y Maxell, 1990)**. Además, se pierde esperma en el recorrido dentro de la vagina artificial **(Cole, 1984)**.

La frecuencia con que se puede colectar el semen depende de la edad, de la condición y del temperamento del animal **(Evans y Maxwell, 1990)**. El régimen sexual a que se someten los sementales incide sobre la calidad seminal de los eyaculados obtenidos **(Cortés, 2003)**, siendo el ritmo de recogida más frecuentemente empleado, según la literatura, de un eyaculado en una o dos sesiones **(Corteel, 1976; Mann, 1981)**. Se ha demostrado que los machos con baja frecuencia de recogida producen eyaculados con tendencia a la aglutinación **(Cortés, 2003)**. En los machos Alpino y Sannen, el semen puede ser recolectado tres veces a la semana con uno o días de descanso. Un incremento de tres a siete veces por semana permite obtener tres veces más de espermatozoides. Sin embargo, es necesario adecuar el ritmo de recolección a cada raza **(Delgadillo, 2005)**.

2.3.2. Factores relacionados a la Selección y Preparación del Semental Caprino

La preparación del macho para la monta debe comenzar dos meses antes, debido a que en ese mismo tiempo se da la fabricación de los espermatozoides **(Tabernero, 2006)**. Los machos pueden mostrar esterilidad transitoria como consecuencia de condiciones estresantes. Estas condiciones son los efectos de diversos factores, que por lo común, son los mismos utilizados para la selección de sementales caprinos **(Evans y Maxwell, 1990)**. Uno de ellos, la nutrición; se evalúa por la condición corporal y la evaluación de las dietas, en la cual, los machos en periodo de cubrición deben alimentarse de tal modo que cubran sus

necesidades nutricionales, por lo cual, es muy importante evaluar la administración de vitaminas AD_3E y minerales que influyen en la reproducción **(Tabernero, 2006)**.

Además, se debe realizar una selección genética, estimando el valor de un semental por su propia producción y de las descendencias que haya tenido, comparándolas con sus contemporáneos **(Evans y Maxwell, 1990)**.

La observación del comportamiento sexual del macho cabrío, libido y fertilidad, es otro factor determinante en la elección de los sementales, ya que un macho con buena fertilidad pero baja actividad sexual presentará problemas en la recogida de semen con vagina artificial **(Cortés, 2003)**. Diferentes pruebas se usan para conocer el libido de los sementales; entre ellas tenemos los métodos de: (a) El cálculo del porcentaje de veces en que la cópula y la eyaculación ocurrieron cuando el macho estuvo expuesto a un estímulo adecuado; (b) la comparación entre el número de cópulas completas e incompletas en un período dado, (c) y la observación del tiempo que transcurre desde que el macho es sometido a un estímulo adecuado; conocida como tiempo de reacción, y esta prueba se realiza en cinco minutos **(Galina, 1995)**. En la Figura 15 se muestra un macho sometido a una prueba de libido y comportamiento sexual. Adicionalmente, se utilizan otras pruebas de capacidad de servicio como: prueba de Kilgour, un macho con cuatro hembras en celo durante 20 ó 40 minutos (en dos días consecutivos); prueba de Blockey, cuatro machos con cuatro hembras

FIGURA 15. PRUEBAS DE LIBIDO Y COMPORTAMIENTO SEXUAL.

FUENTE: Tabernero, 2006. Explotación de Ganado Caprino.

que no estén en celo y en sujeción, durante 40 minutos; y prueba de Laborde, un macho frente a dos hembras que no estén en celo y en sujeción durante 40 minutos. Estas pruebas utilizan como variables: número de servicios, número de montas, tiempo de reacción a primer servicio, tiempo de reacción a primera monta y número de montas por servicio **(Cruz, A. 2004-b)**.

Otra forma es la medición de la circunferencia escrotal, como una medida indirecta de la capacidad de producción de semen de un macho, pues el tamaño testicular obtenido de esta forma está altamente correlacionado de manera positiva con la producción total de espermatozoides **(Galina, 1995; Mateo, 1990)**. Además, la circunferencia escrotal es heredable, machos con tamaño testicular grande, tienen hijos con esta misma propiedad; incluso las hijas

maduran más rápido, porque está asociado el tamaño testicular con la madurez sexual **(Morón, 2004)**. En cuanto a la evaluación seminal, se seleccionan aquellos machos que obtienen al menos 80 por ciento de éxito para eyacular en la vagina artificial, un volumen del eyaculado mayor de 0.2 mililitros, con una concentración superior a un billón de espermatozoides en al menos 80 por ciento de las solicitudes para eyacular. Se descartan a los machos con semen descongelado, que presenten porcentajes de motilidad menores al 30 por ciento y calidad de movimiento menor de tres **(Delgadillo, 2005; Pérez, 1996; Kolb, 1979)**. En cuanto al estado de salud, se deben descartar sementales con posibles anormalidades en prepucio, pene y en el proceso uretral y a los que presente defectos, tales como: criptorquidismo, hipoplasia testicular, espermiostasis, o varicoceles **(Evans y Maxwell, 1990)**.

2.3.3. Entrenamiento de los Machos Cabríos para la Recolección Seminal

Los machos seleccionados después de haber sido sometido a las pruebas de preselección (especialmente la de capacidad fecundante) deben ser entrenados para eyacular dentro de la vagina artificial **(Koeslag, 1982)**, comenzando dos a tres semanas antes del inicio del programa de inseminación. Este entrenamiento consiste en desarrollar y reforzar los reflejos condicionados del semental para servir a una hembra, en un recinto cerrado y en presencia de una persona. Para condicionar el reflejo eyaculatorio del macho, se utiliza una cabra en celo, ovariohisterectomizada (tratamientos hormonales) e inmovilizada mediante un potro de sujeción. La visión y el olfato son muy importantes en el estímulo

sexual, por lo que es importante que en el entrenamiento de los machos; estos puedan ver a la hembra e incluso que vean como la montan los otros **(Evans y Maxwell, 1990)**. Durante este proceso se debe utilizar un ritmo de recogida en los machos de una o dos veces al día durante la temporada de cubrición, en la fase final del entrenamiento **(Wilkinson, 1989)**. El tiempo que lleva la obtención de un buen entrenamiento depende de la destreza personal y de la edad, experiencia sexual y temperamento del semental **(Gibbsons, 1993)**. Por lo cual, el entrenamiento de machos cabríos debe iniciarse a edades tempranas. Algunos autores en su experiencia indican, que el mayor porcentaje de machos que adquieren la habilidad para proporcionar semen mediante el uso de la vagina artificial, se obtiene cuando el animal comienza a ser entrenado con cuatro meses de edad, en razas Murciana, Malagueña, Verata y Guadarrama. Ya que en esta fase los animales se habitúan con mayor facilidad a la presencia humana, obteniéndose el 95 por ciento de chivos con producción de eyaculados de forma rutinaria, en cinco meses de entrenamiento **(Vázquez, 1998)**. Una vez entrenados a eyacular en la vagina artificial, los machos no necesitan hembras en estro; además, los machos reaprenden rápidamente cuando son requeridos en el futuro para recolectar semen **(Evans y Maxwell, 1990)**. Un reproductor puede actuar activamente como donador de semen hasta los siete u ocho años de edad, cuando deberá ser sustituido por presentar una disminución de su potencial reproductivo **(Nunes, 2001)**.

2.4. Dilución y Diluyentes para la Criopreservación de los Espermatozoides

Existe una gran variedad de diluyentes y métodos empleados en la conservación del semen de macho cabrío.

2.4.1. Principios de la Dilución

La dilución del semen se realiza por razones técnicas (aumentar volumen) y biológicas (sobrevivencia de los espermatozoides). En el razonamiento técnico, hay que tener en cuenta, que en la monta natural el macho cabrío deposita miles de millones de espermatozoides en la vagina de la hembra. Sin embargo, de ese gran número solamente unos 100 a 140 millones atraviesan el cérvix. El límite inferior, generalmente aceptado como resultante de un buen índice de fertilización es de 100 millones de espermatozoides por dosis inseminada. Si se utilizara semen sin diluir, este volumen contendría un número de espermatozoides superior al límite de seguridad, lo que resultaría en un método poco económico. Así, el problema de reducir el número de espermatozoides a la dosis requerida, manteniendo un volumen adecuado, se soluciona mediante la dilución del semen. Además, al diluir se proporcionan a los espermatozoides nutrientes, sistema amortiguador y un ambiente isotónico, que lo protegen del shock frío, manteniendo así su vitalidad **(Evans y Maxwell, 1990)**.

2.4.2. Diluyentes para Semen

Los medios diluyentes o crioprotectores son utilizados como una forma de proteger a los espermatozoides durante los procesos de congelación, debido a formaciones de cristales de hielo intracelular que afectan la estructura físico-química de la célula causando daños principalmente a la membrana, acrosoma y su metabolismo. Estos varían según el uso del semen: en fresco, refrigerado y congelado **(Alberti, 2004; Cole, 1984; Galina, 1995)**.

2.4.2.1. Composición General

Un diluyente satisfactorio debe tener una presión osmótica isotónica con los espermatozoides, suministrar un equilibrio adecuado de minerales esenciales, proporcionar una fuente de energía para el metabolismo del esperma, proteger a las células espermáticas contra el shock por el frío, proporcionarles capacidad amortiguadora contra los productos metabólicos, y librar o proteger el esperma de los organismos bacterianos o infecciosos. Además, los diluyentes deben contener agentes crioprotectores para proteger a los espermatozoides durante el enfriamiento y la congelación, y aditivos o enzimas que mejoren la calidad del semen **(Cole, 1984; Galina, 1995)**. En otras palabras, para que un medio diluyente sea completo y eficiente, este debe estar compuesto de: sustancias iónicas o no iónicas que mantengan la osmolaridad; lipoproteínas o un material de peso molecular alto que prevenga los choques; un agente crioprotector intracelular; una fuente de energía como glucosa o fructosa y otros aditivos como enzimas y antibióticos **(Alberti, 2004; Cruz, 2004-c)**.

2.4.2.2. Clasificación de los Crioprotectores y Diluyentes

Los crioprotectores y diluyentes pueden ser clasificados en no penetrantes o penetrantes; de refrigeración o de congelación y sintéticos o naturales **(Alberti, 2004; Cortés, 2003; Evans y Maxwell, 1990)**.

a) Crioprotectores Penetrantes y No-Penetrantes

Los crioprotectores no penetrantes son aquellos que al ser incorporados en el medio de dilución recubren la membrana plasmática de los espermatozoides protegiéndola sin penetrarla. Destacan por su utilización los azúcares, las proteínas de la leche descremada y yema de huevo; hasta incluso la glicina **(Pérez, 1996)**. Mientras que los crioprotectores penetrantes son aquellos capaces de penetrar en la célula de forma uniforme evitando el estrés osmótico, produciendo deshidratación celular por la sustitución del agua intracelular, amortiguando el incremento de la concentración de solutos del medio extracelular e impidiendo la formación de cristales de hielo en el interior. Destacan por su utilización el glicerol, dimetil-sulfóxido (DMSO), propilen-glicol, etilen-glicol, metanol y etanol **(Alberti, 2004; Evans y Maxwell, 1990)**.

b) Diluyentes para Semen Refrigerado

Los diluyentes de refrigeración son soluciones acuosas amortiguadoras a las que se le añade una fuente de energía más un crioprotector no penetrante. **(Alberti, 2004)**. El primer diluyente para semen líquido o refrigerado que tuvo éxito fue denominado “Illini Variable Temperature” (IVT). Este se basó en la

observación del paso de burbujas de dióxido de carbono gaseoso a través de un diluyente de yema de huevo y citrato, el cual redujo marcadamente el metabolismo y la motilidad de los espermatozoides **(Cole, 1984)**. El diluyente para semen refrigerado debe preparase poco antes de la recolección del semen, se lo enfría a 4.0 °C y puede usarse durante dos o tres días **(Galina, 1995)**. El diluyente para semen líquido consta de todos los materiales necesarios; como amortiguador se puede utilizar: solución de citrato de sodio al 2.9 por ciento, fosfato de sodio, TES, TRIS y otros **(Sorensen, 1982)**. Sin embargo, se hace una descripción por separado, del origen del crioprotector extracelular:

- **Compuesto de Origen Animal**

La leche de vaca puede emplearse tanto entera, descremada, ultrapasteurizada o en polvo para reconstituir, siendo esta última la más universal. Se ha determinado que la proteína de la leche (caseína) es el agente responsable de la protección contra el choque del frío **(Cole, 1984)**. Cuando se usa la yema de huevo, los huevos deben ser frescos, no transcurriendo más de cuatro días desde la puesta hasta el momento de su utilización. La concentración de yema de huevo utilizada en la conservación de semen caprino es menor que en otras especies, debido a las propiedades antes indicadas de la fosfolipasa A, que en presencia de calcio es capaz de hidrolizar las lecitinas de la yema de huevo en ácidos grasos libres y lisolecitinas. Esta última, es tóxica para el espermatozoide **(Mateo, 1990; Evans y Maxwell, 1990)**. No obstante, para algunos autores, los mejores resultados obtenidos en cuanto a diluyente de refrigeración son con el

dilutor yema de huevo, debido a la composición de la yema, la que contiene fosfolípidos, lecitinas, lipoproteínas y cefalinas, sustancias a las cuales parece deberse la mayor acción protectora comparada con el dilutor leche de vaca **(Palomino *et al.*, 2001; Cole, 1984)**. En los ultimos tiempos, se ha descubierto una fracción proteica del plasma seminal (BUIII) también procedente de las glándulas bulboretreales que interacciona con la leche utilizada en los diluyentes, produciendo reacciones desfavorables **(Pérez, 1996)**.

- **Compuesto de Origen Vegetal**

Otro método alternativo es el agua de coco como diluyente **(Nunes, 1993)**. Pues este, por ser pobre en fosfolípidos, se presenta como un diluyente favorable, facilitando un excelente comportamiento del semen caprino, tanto *in vitro* como *in vivo*. La tecnología del semen caprino enfriado y diluido en agua de coco demostró ser eficiente en el proceso de difusión genético de reproductores de la raza Saanen. El agua de coco madura está compuesta de aminoácidos, azúcares, vitaminas y minerales; presentando en la fase de maduración inicial, osmolaridad entorno de 500 miliosmoles y pH 4.5. También se ha aislado del agua de coco, el ácido 3-Indol-Acético (del grupo de las auxinas), la cual ha demostrado actividad sobre el metabolismo del espermatozoide, por lo que se han incorporado a diluyentes convencionales. Asimismo, se utilizó la leche de coco, pero presenta en su constitución una razonable cantidad de fosfolípidos que dificulta su empleo en el semen caprino. Además, se ha observado un incremento en el número de hembras, en relación al número de machos nacidos

de cabras inseminadas con semen caprino diluido en agua de coco **(Nunes, 2001)**. En efecto, se han hecho comparaciones de diluyentes en semen de ovino Blackbelly, con diluyentes de leche en combinaciones diferentes de ácido cítrico con las mismas proporciones en agua de coco. Encontrándose resultados muy buenos en la proporción 20:60 ácido cítrico y agua de coco a los 90 días, siendo iguales al de 10:70 de ácido cítrico con leche **(Gutiérrez *et al.*, 2006)**.

c) Diluyentes para Semen Congelado

En contraste al diluyente de refrigeración, el diluyente de congelación se le agrega además un crioprotector penetrante o anticongelante **(Sorensen, 1982)**. Los diluyentes de congelación se precisan en los crioprotectores penetrantes, encontrando en la literatura que la adición del glicerol en función de la concentración espermática, muestra los mejores resultados post-descongelación **(Cortés, 2003)**. Esto supone muchas combinaciones utilizadas con semen de ganado caprino: glucosa-leche-glicerol, tris-glucosa-yema-glicerol, glucosa-yema-leche-glicerol, glucosa-citrato-yema-glicerol y tris-fructosa-acidocítrico-yema-glicerol-lactosa **(Pérez, 1996)**. La cantidad de glicerol necesaria para proteger a los espermatozoides varía con el método de congelación y la composición y tonicidad del diluyente. La mayor parte de los investigadores han encontrado que los diluyentes hipertónicos son buenos para congelar semen caprino **(Evans y Maxwell, 1990)**. Como ejemplo, un ensayo con diluyentes de diversa tonicidad, determinó que el porcentaje de motilidad espermática fue más alto (22.3 contra 21.2%) en el diluyente hipertónico **(Martínez, 1994)**. El glicerol

es un alcohol trihídrico con un peso molecular de 92, es solo levemente tóxico para las células, y la permeabilidad a través de la membrana citoplasmática es alta. Es un sustrato en el camino de la glicólisis en el espermatozoide, y es muy soluble en agua y alcohol. La molécula de glicerol puede actuar como un solvente para electrólitos y compuestos orgánicos, por tal razón, cambia la congelación y descongelación de las células suspendidas **(Sato *et al.*, 1992)**. Otros crioprotectores, tales como el etileno y el glicolpropileno, el dimetil sulfóxido, han sido utilizados con niveles elevados de azúcares no penetrantes como la lactosa, la rafinosa, la arabinosa y la fructosa, mostrando buenos resultados que ayudan a disminuir la cantidad de glicerol necesaria para la criopreservación, y por ende, algún efecto tóxico **(Cole, 1984)**.

d) Diluyentes Naturales y Sintéticos/Comerciales

En condiciones de campo el diluyente del semen más fácilmente asequible es la leche de vaca, que se puede usar tanto entera como descremada o en polvo para reconstituir; debido a que la leche homogenizada tiene suficientes agentes amortiguadores por sí mismo **(Cole, 1984)**. En algunos lugares también se utiliza leche ultrapasteurizada, que tiene la propiedad de conservar mejor. Además, si se utiliza leche completa, descremada o en polvo se debe calentar a 92-95 °C, en baño de agua, para inactivar los factores tóxicos de su fracción proteica **(Evans y Maxwell, 1990)**. Asimismo, se puede utilizar el agua de coco directamente, pero con resultados muy variables **(Gutiérrez *et al.*, 2006)**.

Los diluyentes sintéticos son todos aquellos que resultan de la combinación y adición de los compuestos necesarios para completar un diluyente eficiente, el cual es producido principalmente en laboratorios**.** Una forma comercial de diluyente es el Dubelcco PBS, al cual se debe adicionar penicilina y sulfato de estreptomicina **(Evans y Maxwell, 1990)**. En la actualidad, se tienen diluyentes comerciales para semen específico de rumiantes menores para refrigeración, tales como Ovipro®. En el caso de diluyentes comerciales para congelación se tienen mayor variedad y se encuentran algunos que precisan la adición de huevo (Triladyl®, Biladyl®, AVEX (IMV), One-Step™, Tow-Step™) o con lecitina de soya (Bioxcell®) o con surfactante vegetales (AndroMed®) **(Minitüb, 2007. Continental Plastic Corp., 2008; Cruz, 2004-d).**

2.4.3. Métodos de Dilución

La dilución aconsejada en semen caprino varía enormemente. La bibliografía no parece aconsejar diluciones superiores a 1:5 de los eyaculados destinados a la elaboración de dosis seminales incluidas en programas comerciales de inseminación artificial **(Cortés, 2003)**. Antes de proceder a la dilución del semen de macho cabrío se debe determinar la concentración de espermatozoides activos en la muestra y el número de dosis de inseminado que se precisen, estableciendo así, el grado de dilución. Esta dilución, se hace inmediatamente después de la recolecta del semen; tanto el semen como el diluyente se colocan en baño maría a 30 ºC para que al momento de la dilución tengan la misma temperatura. Luego, se pipetea una cantidad adecuada de diluyente,

adicionándola lentamente al recipiente donde se encuentre el semen. Siempre se debe adicionar el diluyente al semen, nunca al contrario ya que se pueden alterar los espermatozoides. Después de agregar el diluyente se agita todo convenientemente y se examina luego en el microscopio. Cabe mencionar que la dilución puede ser en uno o dos pasos **(Evans y Maxwell, 1990)**.

2.4.3.1. Dilución Directa

Para hacer la dilución en un solo paso, el semen se diluye a la dilución final de pre-congelación a 30 °C con diluyente que contenga glicerol. Este método ofrece ventajas sobre el otro; por ello, se prefiere éste por su simplicidad y menor manejo del semen antes de la congelación **(Evans y Maxwell, 1990)**.

2.4.3.2. Dilución por Pasos

Cuando se adopte esta técnica, el semen se diluye (a 30 °C) inmediatamente de recogido, hasta la mitad de la dilución final con un diluyente que no contenga glicerol, y después de enfriado durante 1.5 – 2.0 horas a cinco grados centígrados, se hace la dilución definitiva con diluyente provisto de glicerol. **(Evans y Maxwell, 1990).**

Otra forma de dilución a paso, incluye el proceso de lavado seminal, generalmente por centrifugación; donde se separa el plasma seminal para luego ser eliminado **(Wilkinson, 1989; Pérez, 1996)**, reduciéndose sustancialmente el efecto tóxico de la lisolecitina. De igual forma, el efecto de una fracción proteica

(BUIII) procedente de las glándulas bulboretreales (Cuadro III). Aunque este método de lavado, presenta el inconveniente de producir una cierta pérdida del número total de espermatozoides **(Mateo, 1990; Cueto, 2000)**. Además, de una serie de desventajas inherentes al someter el eyaculado a este proceso, con efectos claramente negativos para la viabilidad espermática y sobre todo la pérdida del 10 por ciento de células espermáticas por cada centrifugación. En este aspecto, los ensayos en los cuales se aplicó únicamente diluyentes formados por compuestos amínicos, no demostraron diferencias estadísticamente significativas; en donde los valores medios en experiencias con semen centrifugado, proporcionan cifras más bajas que cuando el semen no ha sido sometido a ningún lavado previo **(Vázquez, 1998)**. Se afirma entonces, que el número de revoluciones por minuto, el tiempo, las revoluciones totales, como el campo centrífugo (CCR) varían de acuerdo al solvente, al diluyente y a las condiciones ambientales donde se realiza el proceso **(Urrego *et al.*, 2008)**. Al respecto, se conoce la utilización de la solución fisiológica Krebs-Ringer-Glucosa, como solvente para centrifugar, a una velocidad de 600 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos; realizándose dos lavados y la posterior dilución con un diluyente a base de leche descremada **(Delgadillo, 2005)**. De igual forma, utilizando esta solución fisiología, se lava en una proporción de 1:10 y una centrifugación de 816 x G (gravedades, expresado en CCR) por 15 minutos y una segunda dilución, por 16 minutos **(Chandler *et al.*, 1988)**. Otros centrifugan dos veces a 2,500 rpm durante 8 minutos con solución de citrato de sodio al 2.9 por ciento **(De la Vega *et al.*, 2007)**.

CUADRO III. EFECTO DE LA ELIMINACIÓN DEL PLASMA SEMINAL SOBRE LA CALIDAD POST- CONGELACIÓN DEL SEMEN CAPRINO.

TIPO DE DILUYENTE	% Células móviles		% Acrosomas intactos	
	Sin lavar	Lavado	Sin lavar	Lavado
Leche descremada	42.1 ± 6.1	61.4 ± 2.1	40.0 ± 5.6	63.3 ± 3.02
Lactosa yema de huevo	20.7 ± 8.2	59.3 ± 2.0	42.8 ± 7.1	56.4 ± 3.30
Tris-yema de huevo	50.4 4.7	53.1 ± 5.3	66.1 ± 5.1	59.3 ± 4.61

FUENTE: Mateo, 1990. Avances en Reproducción Caprina.

Mientras, que con el mismo solvente, se puede centrifugar por 10 minutos a 2,000 rpm, con la posterior eliminación del sobrenadante **(Cueto, 2000)**. La utilización de medios TCF (tris-acidocítrico-fructosa), se ha utilizado como solvente para centrifugar espermatozoides a 700 x G por un tiempo de 10, 30 y 45 minutos. **(Urrego *et al.*, 2008)**. Finalmente, en el agua de coco, se realiza una dilución 1:9, efectuándose la centrifugación del material durante 20 minutos, a una velocidad de 550 rpm, ya que velocidades altas pueden afectar la morfología espermática **(Nunes, 2001)**.

2.5. Criopreservación del Semen Congelado Caprino

A pesar, que ya se había concebido la idea de que los espermatozoides sobrevivieran a la congelación, la idea en sí de almacenar semen congelado no fue aceptada hasta el descubrimiento casual de que el glicerol protege a las células de los daños que produce la congelación **(Cole, 1984)**.

2.5.1. Antecedentes Técnicos de la Congelación de Semen

Hay que destacar y mencionar una serie de eventos sobresalientes sobre la criopreservación seminal de forma cronológica, donde se indica que **Van Leeuwenhoeck** en 1677 observa que “los animalitos del semen” resisten el congelamiento y vuelven a moverse al descongelarlos; **Davenport (1897)** ve que el semen humano sobrevive al congelamiento; luego **Jahnel** en 1938 congela testículos de conejos sifilíticos y al descongelarlos observa espermatozoides con movimiento. Después; **Polge, Smith** y **Parkes (1949)** utilizan la glicerina, como crioprotector al congelar el semen de toro. **Polge** y **Rowson** para 1952 publican el nacimiento del primer becerro vivo nacido de inseminación con semen congelado en ampollas. Pasada una década (1964), **Nagase** y sus colaboradores en Japón desarrollaron la técnica de congelación de semen en pellets, método innovador y alternativo a la ampolla y pajuela **(Galina, 1995)**. Con respecto a la aplicaciones de técnicas reproductivas en el caprino, se hace necesario indicar que cuando se utilizaba la inseminación cervical de semen congelado-descongelado, la fertilidad se veía reducida ampliamente, problema que se logró soslayar por: la utilización de semen que contenga una alta concentración de espermatozoides móviles y aumentando la profundidad de la inseminación en el cérvix **(Evans y Maxwell, 1990)**.

2.5.2. Equipo para Congelar y Manejo apropiado de Materiales

El equipo y materiales utilizados para la criopreservación de semen dependen en parte del tipo de envase y la técnica de congelación y descongelación. Sin

embargo, en todas se utilizan pinzas, diluyentes, agua destilada y nitrógeno líquido. También se debe y puede utilizar: ampollas, pajuelas o pellets; gradillas para sostener pajuelas o pedazo de hielo seco para hacer pellets, vasos químicos, equipo de rotulación, pipetas, probetas, balanza digital, centrifugadora, nevara o refrigerador y sobre todo contenedores como tanques o termos de nitrógeno con sus respectivos globos, canastillas o cestillos; siendo importante mantener los niveles adecuado de nitrógeno líquido. Todo el equipo de vidrio y el que este regularmente en contacto con el semen, debe ser lavado con agua, de preferencia agua destilada. La esterilización del equipo es esencial y generalmente se hace por calor **(Hafez, 1989; Evans y Maxwell, 1990)**.

2.5.3. Técnicas de Congelación de Semen

El procedimiento total de la conservación de semen, se divide en una serie de etapas: etiquetado, llenado, sellado, estabilización o equilibración, y congelación. **(Sorensen, 1982)**. El semen congelado se presenta mundialmente en tres formas distintas y son utilizadas según la región o país. Esas formas son: a) ampolletas o ampollas de vidrio; b) pastillas o pellets; c) pajuelas, pailletés o straws **(Allende *et al.*, 1977; Cole, 1984)**. Una presentación de semen congelado debe ser de fácil elaboración, que aísle el semen del medio externo y que resulte barato. La ampolleta y la pajuela llenan la mayoría de estas características; sin embargo, necesitan de mucho espacio. Con el pellets se obtiene una buena recuperación de espermatozoides al descongelar y buena fertilidad, pero no es fácil identificarlo y es susceptible de contaminarse.

Previo a la dilución, se efectúa el etiquetado o identificación y luego, el llenado según el envase **(Galina, 1995)**. En el sellado, los que lo requieren, se utiliza un polvo de alcohol de polivinilo (PVA) y/o con calor **(Sorensen, 1982)**. El enfriamiento del semen se puede hacer en frigorífico, en termos o cualquier recipiente aislado que contenga hielo (o agua fría). El ritmo de enfriamiento debe regularse por el tamaño del recipiente y la cantidad de agua que rodea a los contenedores de semen. El enfriamiento del semen a 15.0 ó 5.0 °C, debe ser gradual, evitando un descenso rápido desde 18.0 a 5.0 °C, ya que en este margen de temperatura los espermatozoides son especialmente sensibles al shock por frío. La motilidad de los espermatozoides se puede mantener varios días a 5.0°C; estableciendo en 48 horas, el periodo máximo de conservación para caprinos **(Evans y Maxwell, 1990)**. La refrigeración y congelación del esperma suelen producir la muerte del espermatozoide, pero el glicerol del diluyente contrarresta estos eventos **(Kolb, 1979)**. El período de estabilización puede variar de dos a seis horas. Los periodos cortos son mejores que los prolongados **(Sorensen, 1982)**. Sin embargo, en estudios recientes se demostró que el tiempo de enfriamiento tiene un efecto significativo en el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, cuyas medias revelaron que el tiempo de refrigeración de cuatro y tres horas evidencio la mayor sobrevivencia, comparándolos con tiempos de una y dos horas **(Mela, 2006)**.

Cuando el semen se congela y conserva a temperaturas muy bajas (-196 ºC) se amplía considerablemente la utilización de los sementales. El semen de macho

cabrío se puede congelar lentamente (método convencional) o muy rápido con vapores de nitrógeno líquido o en bloques de hielo seco. La supervivencia de los espermatozoides del semen es mejor tras la congelación rápida que después de la lenta, con lo que está sistemática no es muy utilizada **(Evans y Maxwell, 1990)**. La capacidad de congelación del esperma es variable; disminuyendo con esta técnica, la capacidad fecundante de 22 a un 60 por ciento **(Mayén, 1989)**. Otra técnica de congelación, es el uso de un ultra-congelador de -150°C para congelar y conservar semen apropiadamente, encontrándose que la retirada frecuente de muestras del congelador y la apertura prolongada de éste no causo un aumento crítico de la temperatura de las muestras almacenadas. Por lo que, la viabilidad del semen congelado conservado a -150 o a -196°C fue similar después de dos días y dos meses de crioconservación **(Medrano *et al.*, 2004)**.

2.5.3.1. Congelación en Pellets y Ampollas

Las pastillas denominadas pellets en inglés, han sido muy usadas en diversas partes de Europa, el cercano Oriente y América del Sur **(Allende *et al.*, 1977)**. La congelación por el método de los bloques o pellets, tiene la ventaja de ser muy simple, fácil de manejar, económico y buena recuperación de las características de los espermatozoides después de congelar. Sin embargo, los pellets pueden contaminarse fácilmente durante la congelación y conservación; y son más difíciles de identificar que las pajuelas; no obstante, este problema puede superarse usando determinados colorantes para colorear el diluyente del semen y/o colocando los bloques en bolsas de diferente color y etiquetados.

(Evans y Maxwell, 1990; Cole, 1984). Se diluye en un solo paso a 30 °C con un diluyente apropiado. El semen diluido se debe enfriar a cinco grados centígrados en 1.5 - 2.0 horas, para luego congelar el semen. Para el método de pellets, se precisa un bloque de hielo seco. Utilizando un aparto apropiado de acero inoxidable y esterilizado por alcohol, se hacen agujeros de tamaño conveniente en la superficie del bloque. Alternativamente, se puede utilizar una bandeja de plástico, provista de agujeros en su superficie y enfriada ente -79 y -14 °C, por inmersión de nitrógeno líquido **(Cueto, 2000; Evans y Maxwell, 1990)**. Una gota de 0.1 a 0.2 mililitros se pone directamente en el hielo seco en pequeñas cavidades. Después de tres a cuatro minutos, las pastillas son sumergidas en el nitrógeno líquido, aunque otros consideran un tiempo de 10 a 15 minutos; para luego ser almacenadas en tubos para su posterior utilización **(Delgadillo, 2005; Galina, 1995).** El proceso incluye la sacudida de los pellets del bloque y el traspaso a tubos de metal. Estos recipientes, luego de ser llenados con pellets, son lastrados con latón para evitar que floten en el congelador y transferidos a las canastillas que se conserva dentro de un refrigerador de nitrógeno líquido **(Sorensen, 1982)**.

Las ampollas de vidrio es la forma más utilizada en E.U.A. Ofrece un envase seguro e inviolable de 0.5 a 1.0 milímetro de contenido **(Allende *et al.*, 1977)**. Este método de envasado permite el etiquetado, llenado y sellado de recipientes aptos para una sola inseminación de forma automatizada **(Cole, 1984)**. Las ampolletas se llenan mediante una jeringa, dotado de un tubo de plástico, el cual

se inserta a través del cuello abierto para llenar la porción inferior. Se sellan a flama, siendo imprescindible mantener la ampolleta en posición vertical. Posteriormente, se colocan en varillas metálicas (portampollas). Al pasar los años, se desarrollo un método de congelamiento de ampollas por rotación, que permite un procesamiento uniforme, más rápido y una mortalidad ligeramente menor de las células espermáticas **(Sorensen, 1982)**.

2.5.3.2. Congelación en Pajuelas

Las pajuelas o pajillas ofrecen ventajas propias, como el envase inviolable y el tamaño reducido. Adicional a esto, la noticia sobre la mayor vitalidad de los espermatozoides y las más elevadas tasas de concepción con el uso de estos, han acarreados rápidos aumento en la utilización de esta técnica de envasado **(Allende *et al.*, 1977; Cole, 1984)**. Su presentación o capacidad de volumen es de 0.25 a 0.50 milímetros, cuya concentración espermática debe ser de 100-200 millones de espermatozoides móviles por pajuela o 250-600 millones de espermatozoides por mililitro para garantizar buenos índices de fertilidad de semen diluido **(Zarazaga, 2008; Wilkinson, 1989)**. Las pajuelas pueden ser de coloración variables y además, llevan estampado un código de identificación **(Evans y Maxwell, 1990)**. El llenado se hace succionando por vacío el semen a su interior, pipeteando las dosis seminales a través del tapón triple (algodón-alcohol polivinílico-algodón) y sumergiendo el extremo sin tapón en el semen; de tal modo, que se les toma del extremo con tapón, para no trasmitir el calor de la mano al semen **(Gibbsons, 1993)**. Después, se sellan mediante pequeños

tapones de plástico, polvo de polivinílico o sellados herméticamente por calor **(Sorensen, 1982)**. Es importante indicar que cuando se vayan a congelar las pajuelas se debe dejar un pequeño espacio de aire en ellas para evitar que se rompa al congelarlas. Las pajuelas se diluyen a la dilución final de pre-congelación a 30 ºC y luego se enfría a cinco grados centígrados durante 1.5 – 2.0 horas en refrigerador o nevera, pudiendo variar el procedimiento según el método de dilución y el diluyente **(Evans y Maxwell, 1990; Delgadillo, 2005)**. Pasado esta fase, se ubican horizontalmente en un marco o gradilla metálico y se exponen a vapores de nitrogeno líquido durante cinco a ocho minutos. Para tal fin, se colocan en una caja de telgopor con nitrogeno líquido en su interior **(Cueto, 2000; Pérez, 1996)**. Comercialmente se disponen de máquinas criocongeladoras con las que podemos obtener una mayor homogeneidad en la calidad de las pajuelas; las más utilizadas son el Bio-Cool® (FTS Systems Inc.) y el Freeze Control® (Freeze Control USA) **(Cruz, 2004-d)**. Con el semen congelado, se introducen en nitrógeno líquido (-196 °C), y luego en globos y canastillas de tamaño apropiado para dejarlas en el contenedor de nitrógeno líquido **(Evans y Maxwell, 1990)**.

2.5.4. Proceso de Criopreservación a -196 °C

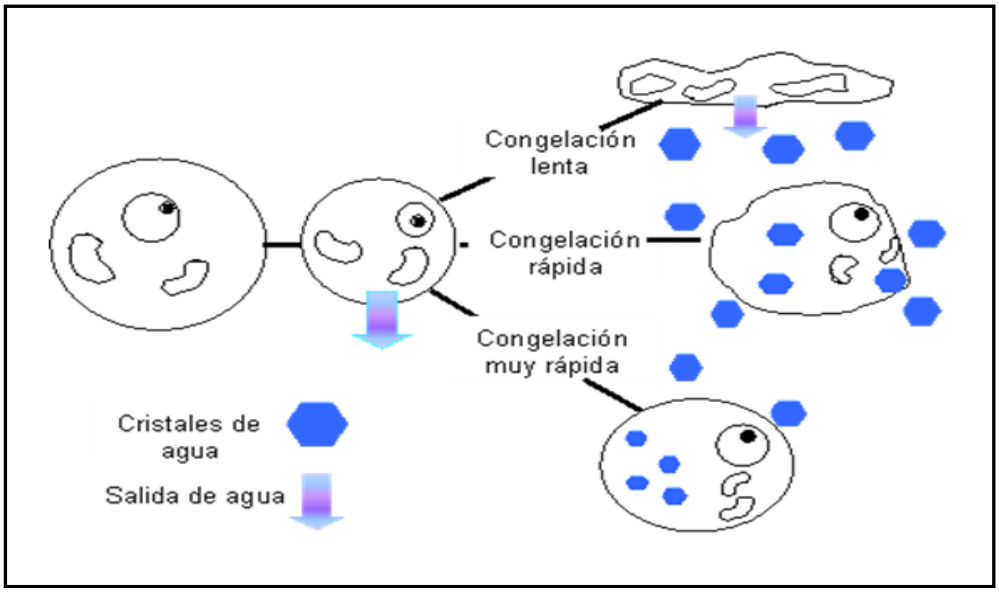
La reducción de la temperatura debe seguir una curva determinada. Está será tan lenta coma para no causar daños en la membrana y lo suficientemente rápida para evitar daños osmóticos durante el congelamiento. El paso de la fase de cristalización a líquida, entre -10 y -70 °C, debe transcurrir rápidamente

(Galina, 1995). De igual forma, la temperatura crítica de congelación oscila entre los -100 ºC y -150 ºC, dado que entre dichas temperaturas se produce la formación de cristales de hielo y el efecto solución (incremento de la concentración de solutos, cambios en el pH, precipitación de solutos, aumento de la deshidratación y descenso del volumen del fluido) **(Cortés, 2003)**.

2.5.4.1. Procesos Físicos de la Célula durante la Congelación

El proceso de congelación incluye etapas tales como la supercongelación, nucleación, crecimiento de los cristales de hielo y la cristalización en el punto eutócico **(Sato *et al.*, 1992)**. Cuando ocurre una congelación ultra-rápida, el crecimiento de los cristales es completamente contenido y la vitrificación ocurre en la solución. En primer instancia, ocurre la supercongelación, en donde la congelación moderada decrece la temperatura de la solución a el punto de congelación o por debajo de este, mientras mantiene el estado líquido y sin congelación **(Palma, 2001)**. Sí el líquido supercongelado, entra en contacto con un pedazo de hielo o con un pedazo de metal congelado, puede destruir el estado de supercongelación; a esto se le llama semillero de hielo. La formación de los núcleos de los cristales de hielo puede formarse por dos procesos. Un proceso envuelve la nucleación de agua pura y ocurre a bajas temperaturas. En cambio, en el otro proceso, un núcleo es formado alrededor de la sustancia y esto ocurre a altas temperaturas **(Sato *et al.*, 1992)**. En la Figura 16 se representa esquemáticamente los procesos físicos durante la congelación.

FIGURA 16. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS FENÓMENOS FÍSICOS EN LA CÉLULA ESPERMÁTICA DURANTE LA CONGELACIÓN.



FUENTE: Palma, 2001. Biotecnología de la Reproducción.

El crecimiento de los cristales de hielo ocurre después de la nucleación. Cuando el crecimiento comienza la temperatura de la solución sube abruptamente al punto de congelación por el calor latente en la solución, razón por lo cual ellos crecen. La duración del periodo de meseta difiere conforme la velocidad de congelación, pues la congelación rápida produce un corto periodo de meseta. La tasa de crecimiento es máxima aproximadamente a los -20 °C, a la cual se detiene. No obstante, cuando la solución es rápidamente congelada, la tasa de crecimiento de los cristales de hielo es notablemente inhibida y un gran número de pequeños cristales es formado **(Palma, 2001)**.

Finalmente, la cristalización en el punto eutócico, se refiere cuando una solución congelada incrementa su contenido de hielo mientras la fase líquida decrece

hasta que la solución se concentre. La solución entonces se separa entre cristales de hielo y cristales como solutos en la solución; y como este está comenzando a congelarse, la fase líquida desaparece a una cierta temperatura. Esta temperatura es llamada el punto eutócico de la solución. De este modo, en el punto eutócico la solución salina, el agua líquida y las sales solidas pueden existir al mismo tiempo en la solución. El punto eutócico difiere considerablemente de acuerdo al soluto: - 4.0 °C para una solución de glucosa, -46.5 °C para la solución de glicerina y -132.0 °C para la solución DMSO **(Sato *et al.*, 1992)**.

2.5.5. Proceso de Descongelación del Semen Criopreservado

La descongelación del semen es un punto muy crítico. Los métodos son variados, sin embargo, el ritmo de descongelación debe ser similar al de congelación para evitar al máximo shock térmico que ocasiona daños a las células espermáticas y la más rápida recuperación de los espermatozoides **(Cruz, 2004-d; Galina, 1995)**. El semen de macho cabrío se debe descongelar a una temperatura no inferior a 37 °C. El ritmo de descongelación se incrementa con las temperaturas superiores. La descongelación a temperaturas superiores a 37 °C puede mejorar la recuperación de los espermatozoides viables, pero existe el peligro de la exposición del semen a temperaturas por encima del nivel crítico, que pueden ser fatales para las propias células. Por tanto, lo más seguro es hacer la descongelación de semen a temperatura no superior a 37 °C por un período de tiempo corto **(Evans y Maxwell, 1990; Delgadillo, 2005)**. Es de

suma importancia, la evaluación seminal de un 10 por ciento de la dosis congelada. Se observa la motiliad masal, repitiendo la observacion una o dos veces. Asimismo, se realizan observaciones para estimar el porcentaje de espermatozoides vivos y la motilidad individual progresiva. Para registrar el eyaculado congelado como aceptable, debe tener como mínimo 30 por ciento en vivos y en motilidad individual **(Cueto, 2000)**.

2.5.5.1. Descongelación según Tipo de Envase

La temperatura y tiempo de descongelación varía dependiendo del tipo de envase elegido, no existiendo uniformidad de criterios entre los diferentes autores para un mismo envase. Si bien se ha demostrado que las descongelación a altas temperaturas durante escasos segundos muestran mejores resultados, hay que tener cuidado de no matar a los espermatozoides **(Salamon y Maxwell, 1995)**. Después de la congelación – descongelación, sigue un análisis de control del semen, el cual se hace a través de pruebas para determinar motilidad y viabilidad de espermatozoides, integridad del acrosoma y fertilización *in vitro* **(Evans y Maxwell, 1990; Gibbsons, 1993)**.

Los pellets de semen de macho cabrío se descongelan fácilmente en un tubo seco. Colocándolos, no más de dos o cuatro (depende del tamaño), en tubos de ensayos limpios y secos mantenidos en baño de agua a 37 °C. El descongelar en un tubo mayor número de pellets, puede ocasionar un descenso de la recuperación de la motilidad de los espermatozoides. Con el fin de asegurar una

descongelación uniforme de los pellets, los tubos se deben agitar dentro del baño hasta la total fusión del semen. Otra alternativa es utilizar soluciones descongelantes para pellets. La solución descongelante aumenta el ritmo de descongelación y puede proporcionar algún grado de protección a los espermatozoides que no se encuentran letalmente alterados por el proceso de la congelación. Sin embargo, las soluciones descongelantes tienen la desventaja práctica de diluir el semen descongelado, por lo que se debe concentrar por centrifugación, por esta razón, no suelen utilizarse. **(Evans y Maxwell, 1990)**. Mientras, que las ampollas se descongelan con frecuencia en agua tibia a 40 °C, ya que las temperaturas intermedias dan peores resultados **(Cole, 1984)**. El semen de macho cabrío congelado en pajuelas se descongela sumergiendo estas en agua a una temperatura de 37 °C durante un tiempo de 25 a 30 segundos, aunque algunos consideran un tiempo mayor de cinco minutos. **(Cruz, 2004-d)**. En la contrastación seminal, se descartan aquellos eyaculados con menor del 30 por ciento de motilidad y una calidad de movimiento menor de tres a los cinco minutos y menor de 1.5 a los 120 minutos. **(Pérez, 1996)**

2.5.5.2. Daños Celulares durante la Descongelación

El problema de la criopreservación no es la habilidad del espermatozoide para mantenerse viable a –196 °C sino sortear el daño que ocurre durante la congelación y descongelación al pasar por una zona de temperatura crítica. La velocidad de enfriamiento en la congelación y descongelación de la célula espermática, es fundamental en la magnitud de los daños ocasionados **(Cruz,**

2004-d). No existen medios técnicos para medir el grado y proporción de las lesiones que se les puede inferir a los espermatozoides, a causa de los procesos de congelación y descongelación por separado, ya que solo pueden ser notados posterior a la descongelación. Esto ha llevado a muchos autores a indicar erróneamente que los daños al espermatozoide se deben propiamente a la descongelación **(Evans y Maxwell, 1990)**. Los daños se dan por congelación intracelular, donde las células mueren o pierden su función después de la destrucción de la estructura interna debido a la cristalización del agua intracelular; y por contracción de las células por deshidratación. Igualmente por la congelación extracelular, en la cual se da el incremento en la concentración de solutos, acompañados por un incremento en la presión osmótica y cambios en el pH, todo esto ocurre dentro del rango de temperatura de puntos eutócicos del cloruro de sodio y del cloruro de potasio **(Sato *et al*., 1992)**. Como también, los daños mecánicos por el movimiento, el crecimiento de los cristales de hielos (recristalización) y los gases retenidos en los cristales de hielo en forma de burbujas que contribuyen negativamente. No obstante, los daños pueden prevenirse disminuyendo el tamaño de los cristales de hielo y aumentando el número de los pequeños cristales **(Palma, 2001)**. De esta forma, la congelación y descongelación puede causar cambios morfológicos en el espermatozoide. Estos cambios pueden ser clasificados dentro de tres fases de acuerdo al grado del daño acrosomal, las cuales son: (a) hinchados o agrandados, (b) parcialmente separado y (c) totalmente separado. Seguido pues, del escape de lípidos de los espermatozoides y el pasaje de compuestos inorgánicos;

provocando este escape de polímeros, la disminución de la supervivencia, motilidad y el metabolismo de los espermatozoides **(Sato *et al.*, 1992)**.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización de la Investigación

La investigación se efectuó en las instalaciones del Centro Nacional Caprino de Reproducción Asistida (CENCRA) del Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA) ubicada en el distrito de Santiago, provincia de Veraguas.

3.2. Duración de la Investigación

Para la preparación de los animales, el equipo y la recolecta de datos se requirió un período aproximado de 105 días.

3.3. Materiales

En este trabajo investigativo, se utilizó los siguientes materiales:

3.3.1. Animales Experimentales / Machos Cabríos

De un total de 12 machos cabríos de las razas Saanen, Toguenburg y Alpina Francés (cuatro por cada raza), se preseleccionó y seleccionaron cuatro machos (dos Toguenburg y dos Alpino Francés), utilizando como criterio las evaluaciones andrológicas y microbiológicas del semen de estos animales. El régimen nutricional y alimenticio de estos animales se basó en forraje seco (heno de swazi), pasto verde, leguminosas arbustivas y concentrados. La edad a la toma de datos de estos animales oscila entre 13 a 17 meses.

FIGURA 17. ANIMALES EXPERIMENTALES / MACHOS CABRÍOS.

(a) Macho #1= 8519 Alpino (16 meses) (b) Macho #2 = 8510 Toggenburg (17 meses)

(c) Macho #3= 5245 Alpino (15 meses) (d) Macho #4 = 8510 Toggenburg (13 meses)

FUENTE: CENCRA, 2009. Fotos de la Investigación.

3.3.2. Cabras o Hembras Caprinas

Para el entrenamiento se utilizó seis cabras en estro, la cual fueron inducidas mediante tratamiento hormonal con esponjas vaginales.

3.3.3. Diluyentes

Se utilizó como diluyentes comerciales, unos de adición de yema de huevo (ONE-STEP™) y otro con surfactantes vegetales (AndroMed®).

Composición de Diluyente con Agregado de Yema de Huevo: un buffer que contiene TRIS, ácido cítrico, azúcar, glicerina, agua purísima y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina).

Composición de Diluyente con Surfactante Vegetales: contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, amortiguadores, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina).

3.3.4. Material para la Recolecta del Semen

- Colectores de cristal graduados en 0.1 ml (10 ml).
- Estufa de incubación o Plancha eléctrica de calentamiento (+37 ºC).
- Cono de látex.
- Tubos cónicos intermediarios entre vagina artificial y tubo colector.
- Vagina artificial de ovino-caprino.

3.3.5. Material para la Conservación del Semen

- Pajuelas de 0.25 ml y Pinzas con muesca para pajuelas.
- Gradilla para sostener pajuelas y Equipo de vapores de nitrógeno (hielera).

- Vasos químicos y Termómetros.
- Yema de Huevo y Agua Destilada.
- Probeta, Balanza Digital, Centrifugadora y Nevera.
- Cronómetro o Reloj con cronómetro.
- Nitrógeno líquido y Tanque o termo de Nitrógeno

3.3.6. Material para Obtener Parámetros de Calidad Seminal

- Reactivo Eosina / Nigrosina y Aceite de Inmersión.
- Espectrofotómetro y Microscopio óptico/luz.
- Cubre y porta objeto.

3.4. Métodos

3.4.1. Metodología Experimental

Para obtener los datos del experimento se debió seguir una serie de pasos:

3.4.1.1. Evaluación Andrológica

El proyecto comenzó con un examen o evaluación andrológica para cada animal (individual), el cual consiste en un examen del aparato reproductor (circunferencia escrotal), estado de salud, condición corporal, examen seminal, capacidad de servicio, entre otros.

3.4.1.2. Entrenamiento y Preparación de Sementales

Después de una evaluación general de los animales, se determinó las hembras vacías, teniendo en cuenta que a los 30 días se puede observar el embrión y pequeñas cavidades llenas de líquidos, con una seguridad del 100 por ciento **(Acosta, 2007)**. Luego, se sometió un grupo de hembras a un tratamiento hormonal a base de progestágenos, para la inducción de celos, introduciendo una esponja (Chronogest®) impregnada de acetato de fluorogestona (FGA). Estas hembras sirvieron también para los días propios de la recolección seminal. Se entrenaron mediante un procedimiento descrito por **Evans y Maxwell (1990)**, en la cual, los machos fueron llevados al área de colecta durante cinco a 10 días para acostumbrarlos. Se introdujeron al recinto una o dos hembra en estro y se dejó que los machos las cubran. También se estimulo a otros machos, mediante su visualización de la monta de machos más activos. Esto se realizó hasta que se acostumbrarán al recolector y a la recogida por vagina artificial.

3.4.1.3. Recolecta y Evaluación Seminal

El protocolo de Toma de Datos consistió en que los machos preseleccionados, se les recolecto un total de tres eyaculados, a una intensidad de uno a dos veces/semana. Al semen recolectado por eyaculado, se le hizo pruebas de concentración espermática, motilidad masal e individual progresiva, presencia de espermatozoides anormales, entre otras.

Para el cálculo de la concentración espermática se utilizo una curva de concentración de semen por espectrofotómetro a 540 nm, establecida en un

trabajo experimental en el CENCRA, en la cual se correlacionó los datos obtenidos de una cámara de Newbawer y la transmitancia de las muestras en el espectrofotómetro, con una dilución de 1:400, la cual se le adicionó solución de citrato de sodio al 2.85 por ciento **(Sosa, 2009)**. Para aceptar el semen de un eyaculado, deben cumplir las siguientes condiciones:

CUADRO IV. CRITERIOS DE SELECCIÓN POR EVALUACIÓN SEMINAL.

Volumen del Eyaculado	$\geq$ 0.90 ml
Motilidad Masal	$\geq$ 4.0
Motilidad Individual	$\geq$ 75%
Concentración Espermática	$\geq$ 3,000 x 10^6 espz/ml
Formas Espermática Anormales	$\leq$ 15%

De los machos que se acostumbraron a la recolecta por vagina artificial, se realizó una segunda selección con respecto a la evaluación seminal y se eligió a los cuatro machos del ensayo.

3.4.1.4. Tratamientos

Después de garantizar la viabilidad del semen recolectado, se dividió en tres partes iguales o en tres muestras seminales que contenían igual volumen inicial (mínimo 0.30 ml/tratamiento). La concentración espermática estimada después del proceso de dilución se calculó en 150 millones de espermatozoides móviles/pajuela o 600 millones de espermatozoides móviles/ml (en pajuela de 0.25 ml). En esta investigación se efectuaron tres tratamientos. En el tratamiento uno (T1) se aplicó un diluyente comercial con componentes de origen animal o diluyente A con agregado de dos por ciento de yema de huevo sin previa

centrifugación. El tratamiento dos (T2) se sometió a un lavado de los espermatozoides por dilución (1:9) y centrifugación (514 x G en CCR) durante 13 minutos a una temperatura de 20 °C, en medio Tris-AcidoCítrico-Fructosa (TCF) sin yema de huevo; tras la separación de su sobrenadante se adiciona diluyente A, más adición de yema de huevo al 12 por ciento. En el tratamiento tres (T3) se efectuará una dilución a base de un compuesto con surfactantes vegetales o diluyente comercial B.

CUADRO V. COMPOSICIÓN DE DILUYENTE POR TRATAMIENTO.

Tratamiento	Preparación de Diluyente
T1	El diluyente se prepara con: 98% de diluyente A + agua destilada y 2% de yema de huevo. Se mezclan primero agua destilada y diluyente A; luego a la mezcla resultante se le añade el huevo.
T2	El diluyente se prepara con: 88% de diluyente A + agua destilada y 12% de yema de huevo. Se mezclan primero agua destilada y diluyente A; luego a la mezcla resultante se le añade el huevo.
T3	El diluyente se prepara con: 20% de diluyente B y 80% de agua destilada.

3.4.1.5. Congelación, Descongelación y Análisis en Laboratorio

Antes de efectuar la dilución, tanto el semen como el diluyente se pusieron en baños maría a 30 ºC. Después, se procedió al llenado de las pajuelas, previa identificación o rotulación de estas. Luego se colocaron sobre una gradilla, y en una nevera que redujo la temperatura a 5.0°C, a una velocidad de - 0.53 ºC/minutos (aproximadamente una hora), para entonces dejar en “Equilibración” por un periodo de 2.5 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró las pajuelas de la nevera y fueron llevadas a un equipo para los vapores de nitrógeno (hielera de

hielo seco), en donde la altura entre el nitrógeno y las pajillas fue de cuatro centímetros en un tiempo de 15 minutos. Por último, se tiraron en el nitrógeno líquido y después colocadas en los globos y canastillas, para luego ser llevadas al tanque de nitrógeno para su crioconservación (- 196 ºC). En cada tratamiento, se tomaron datos a las 0, 48 y 96 horas post-congelación para observar la calidad seminal por efecto del tiempo. Las replicas fueron representadas por las evaluación de las tres colectas seminales/tiempo post-congelación dentro de cada tratamiento y semental. Además, se incubó cada muestra por dos horas, resultando el muestreo a la cero y dos horas post-descongelación.

El procedimiento para la descongelación fue la retirada de las pajuelas del tanque de nitrógeno en las horas predefinidas, su inserción en el baño maría a 37 ºC durante 30 segundos, para su posterior observación en el microscopio.

Para la motilidad masal, la metodología fue: registrar tres datos en el campo de 50x, en tres áreas diferentes y tres más en el campo de 100x. Luego, se calculó un promedio (media aritmética) en base a seis datos y se utilizó el promedio como dato final representativo de la muestra seminal. Para su evaluación se utilizó una escala subjetiva del 0.0 al 5.0. En el cuadro VI se presenta la descripción del puntaje utilizado

En la motilidad individual progresiva se registró los datos en el campo de 400x, en la cual se contó todos los espermatozoides que se veían en la televisión, los

cuales pasaban con movimiento lineal progresivo en un tiempo de 15 segundos; después los que mostraban movimiento circular, ondulatorio, rotatorio o sobre sí mismo y por último los que no presentaban movimiento. Esto se realizo por lo menos en tres diferentes áreas y se calculó luego un promedio para determinar una aproximación subjetiva.

CUADRO VI. PUNTAJE SUBJETIVO PARA MOTILIDAD MASAL.

Valor	Descripción
0.0	Ningún espermatozoide presenta movimiento.
0.5	La mayoría de los espermatozoides no presentan movimientos, pero se observa muy pocos con movimientos sobre sí mismos y con movimiento inespecífico.
1.0	Algunos espermatozoides se mueven en su sitio o en algún área. Hay mayor cantidad de espermatozoides que muestran signos de vida aunque con poco movimiento.
1.5	Algunos espermatozoides se mueven en sus sitios o en algún área, pero la mayoría lo hace en movimientos circulares o lineales a intervalos largos.
2.0	Hay espermatozoides móviles pero no alcanzan a formarse ondas (menos de 50 % de espermatozoides móviles con movimientos lineales débiles o progresivo).
2.5	Hay espermatozoides móviles pero solo alcanzan a formar ondas muy lentas de forma intermitente o a intervalos largos (menos de 50 % de espermatozoides móviles con movimientos lineales débiles o progresivo.
3.0	Hay formación de ondas o remolinos muy lentos pero constantes (50 a 70 % de espermatozoides móviles).
3.5	Hay formación de ondas o remolinos muy lentos, pero con espacio de tiempo un poco más rápido, suelen seguir una dirección de onda con breves instantes de remolinos (50 a 70 % de espermatozoides móviles).
4.0	Las ondas o remolinos se forman rápidamente (70 a 90 % de espermatozoides móviles).
4.5	Las ondas o remolinos se forman rápidamente, suelen seguir una dirección de ondas muy breves con largos instantes de remolinos (70 a 90 % de espermatozoides móviles).
5.0	La velocidad de formación de las ondas o remolinos es extremadamente alta. Casi no se observan ondas, ya que la mayoría del tiempo, se forman remolinos muy rápidos (más del 90 % de espermatozoides móviles).

FUENTE: Gómez, 2006. Protocolo para la Evaluación de Semen en Rumiantes.
Pezzone, 2008. Examen de la Calidad del Semen para su Uso en Inseminación Artificial.

Para el registro de espermatozoides vivos, se efectuó un frotis correctamente con tinción eosina / nigrosina, se dejo secar y se agrego una gota de aceite de inmersión. Se contaron los espermatozoides blancos (vivos) y rosas (muertos) en un campo de 400x. Se contaron por lo menos dos frotis (de 100 a 300 células espermáticas) y luego se calculó el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.

Igualmente en las Morfoanomalías Totales se utilizó el mismo procedimiento que para calcular el porcentaje de vivos y muertos. Solamente que se contó de la siguiente forma: Morfoanomalías Primarias (MP), Morfoanomalías Secundarías (MS) y Espermatozoides Normales (N). Después de terminar el conteo se sumo el total de Morfoanomalías = MP + MS, y se calcula su porcentaje. Con respecto a la Proporción de Morfoanomalías Primarias/Secundarias, también se utilizó el Porcentaje de Morfoanomalías Primarias (MP), Morfoanomalías Secundarías (MS) y Morfoanomalías Totales (MT) por muestra. Sin embargo, se calculó la proporción porcentual en base a un 100 por ciento de MT de la muestra. Se registro como MP/MS, sin ninguna cifra decimal significativa.

Hay que señalar que se utilizó como referencias para las Morfoanomalías, una tabla sobre la clasificación de las Morfoanomalías primarias y secundarias, proporcionadas por el Dr. **De Armas (2007)** del material didáctico del curso de Biotecnología Animal (Cuadro VII).

CUADRO VII. CLASIFICACIÓN DE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA.

Clasificación de Morfoanomalías	
Morfoanomalías Primarias	• Subdesarrollo • Formas dobles • Defecto acrosomal (e.g. acrosoma abultado) • Cabeza estrecha • Defecto de cráter • Defecto de forma de pera • Contorno anormal • Cabeza anormal pequeña • Cabeza anormal suelta (libre) • Pieza media anormal • Gota citoplasmática proximal • Cola fuertemente doblada o enrollada • Colas adicionales • Específicas, raras o congénitas • Deformaciones especificas de cabeza • Deshilachado del segmento medio • Modificaciones de la cabeza • Modificaciones en el segmento medio y cola • Malformaciones dobles • Inespecíficas (frecuente luego de acción de una noxa)
Morfoanomalías Secundarias	• Cabeza normal pequeña • Cabeza gigante y ancho corto • Membrana acrosomal separada, doblada, suelta • Gota citoplasmática distal • Cola simple torcida • Cola terminalmente enrollada • Cabeza desprendida • Capuchones cefálicos desprendidos • Colas retorcidas
Otras Células	• Células epiteliales • Eritrocitos • Formación de medusa • Células espermáticas precursoras • Células redondas • Células sanguíneas blancas o glóbulos blancos

FUENTE: De Armas, 2007. Biotecnología en la Reproducción.

3.4.2. Parámetros a Evaluar y Diseño Experimental

Se pretende evaluar:

- Porcentaje de Espermatozoides Vivos

- Motilidad Masal
- Motilidad Individual Progresiva
- Morfoanomalías Totales de los Espermatozoides
- Proporción de Morfoanomalías Primarias y Secundarias

Estos parámetros fueron relacionados al efecto de los diluyentes, al de los machos y al efecto del tiempo post-congelación. Se utilizó un Diseño de Bloques Completamente al Azar con Arreglo de Parcelas Divididas para esta investigación; con el siguiente Modelo Lineal Aditivo:

$$Y_{ijkl} = \mu + M_k + \alpha_i + \varepsilon_{ik} + B_j + (\alpha*B)_{ij} + \delta_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijkl} = Parámetros de Calidad Seminal

μ = Media de la Población.

M_k = Efecto fijo del k-ésimo bloque o macho cabrío (k=4)

α_i = Efecto fijo del i-ésimo factor A o diluyente (i=3, tratamiento)

ε_{ik} = Error "a" o de la interacción del diluyente con el macho: $(\alpha*M)_{ik}$

B_j = Efecto fijo del j-ésimo factor B o tiempo post-congelación (j=3)

$(\alpha B)_{ij}$ = Efecto de la interacción del diluyente con el tiempo post-congelación

E_{ijkl} = Residuo o Error aleatorio debido a cada observación NID ~ $(0,S^2)$

El proceso de la información se analizó a través del Análisis de Varianza (ANDEVA) y Comparación de Medias por Tukey, para indicar si hubo diferencias estadísticamente significativas. Ambas se realizaron utilizando el paquete estadístico SAS. En la siguiente sección, se muestran los datos de selección y los promedios de calidad seminal por macho cabrío (en base a las tres colectas). Además, dos ANDEVA y las comparaciones de medias que corresponden a los dos tiempos post-descongelación. Como también, los resúmenes de los análisis de medias por Tukey y el cambio porcentual entre los dos tiempos post-descongelación.

IV. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan cuadros de resultados y los análisis con su posterior discusión. En estos se describen la evaluación de la fuente de variación principal (diluyente) y las otras (macho cabrío y tiempo post-congelación) en los dos tiempos post-descongelación. Con esta evaluación se establece el valor de los diluyentes utilizados en esta investigación, según los cinco parámetros de calidad seminal analizados.

CUADRO VIII. RESUMEN DE SELECCIÓN POR EVALUACIÓN ANDROLÓGICA Y SEMINAL.

Nº Macho Cabrío	Raza	Estado de Salud	Circunferencia Escrotal (cm)	Aptitud a la Monta	Evaluación Seminal General	Selección Final
5245	Alp.	Bueno	25.4	Excelente	Muy Buena	Seleccionado
6318	Alp.	Bueno	24.5	Buena	------	No disponible
8519	Alp.	Bueno	25.8	Excelente	Muy Buena	Seleccionado
8095	Saa.	Bueno	32.7	Excelente	Muy Buena	No disponible
8620	Saa.	Lesión	28.7	Regular	Buena	No apto
6176	Togg.	Bueno	25.3	Buena	Buena	Seleccionado
8520	Togg.	Bueno	30.1	Buena	------	No disponible
8529	Togg.	Bueno	30.5	Buena	-------	No disponible
8510	Togg.	Bueno	29.6	Excelente	Buena	Seleccionado
8606	Saa.	Regular	26.3	Mala	Regular	No apto

De los machos existentes en el CENCRA presentados en el Cuadro VIII, fueron seleccionados cuatro. En la primera parte, los criterios utilizados fueron el estado de salud, la circunferencia escrotal y la aptitud a la monta; siendo esta última la más importante para la recolecta con vagina artificial. La mayoría de los machos presentaron una buena condición de salud, pero solo el 20.0% de los machos poseían circunferencia escrotal por encima de 30.0 centímetros (Toggenburg). En la segunda parte (evaluación seminal), los machos alpinos además de presentar excelente aptitud a la monta, registraron muy buena evaluación seminal, por lo cual se escogieron dos. Sin embargo, los machos Saanen disponibles no fueron aptos, ya que presentaban problemas de salud y mala aptitud a la monta por vagina artificial. Por lo tanto, los otros dos machos fueron de la raza Toggenburg, los cuales presentaron valores buenos para su selección. En adición, otros machos no pudieron ser utilizados porque se encontraban en programas de cubrición en fincas por monta directa, al momento del inicio de la toma de datos.

Por otra parte, si se observa las variables de calidad seminal de las colectas efectuadas para la investigación en los cuatro machos seleccionados (cuadro IX), encontramos que los dos machos de la raza Alpino Francés presentaron valores positivos en semen fresco (pre-dilución), en comparación a los dos sementales Toggenburg. De estos últimos, el macho #8510 presentó una tendencia a menores valores en motilidad masal e individual progresiva, porcentaje de vivos, morfoanomalías totales y morfoanomalías primarias.

CUADRO IX. PROMEDIOS DE PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL POR MACHO CABRÍO.

PARAMETRO	# MACHO CABRÍO			
	#8519	**#8510**	**#5245**	**#6176**
Volumen	1.23 ml	1.30 ml	1.02 ml	1.17 ml
Motilidad Masal	4.61	4.11	4.50	4.47
Motilidad Individual	86.90%	76.95%	85.46%	85.78%
Concentra. Espermática (espz/ml) (%Transm.)	4679×10^6 (70-69%)	4084×10^6 (75-74%)	4750×10^6 (69-68%)	4443×10^6 (72-71%)
Vivos/Muertos	87.3/12.7	79.7/20.3	88.1/11.9	86.7/13.3
Morfoanomalías Totales	7.42%	12.75%	10.82%	12.34%
Morfoanomalías Primarias	4.45% (76%)	8.94% (70%)	5.14% (48%)	5.25% (43%)
Morfoanomalías Secundarias	2.97% (24%)	3.81% (30%)	5.68% (52%)	7.09% (57%)

CUADRO X. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA MOTILIDAD MASAL 0-HORAS POST- DESCONGELACIÓN.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F_c
Macho	3	0.7871	0.2624	47.44**
Diluyente	2	2.6868	1.3434	242.90**
Error "a"	6	0.0332	0.0055	
Tiempo PostCong.	2	0.3845	0.1922	15.69**
D x T	4	0.0226	0.0057	0.46^{ns}
Residuo	90	1.1027	0.0122	
TOTAL	107	5.0168		

C.V. = 5.92%
Error "a" = Proviene de la interacción diluyente x macho y se usa para estos dos.
Tiempo PostCong. = Tiempo Post-Congelación.
D x T = Diluyente x Tiempo.
*** * = Diferencia significativa al 1 %.**
ns = No significativo a ningún nivel.

CUADRO XI. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA MOTILIDAD MASAL 2-HORAS POST- DESCONGELACIÓN.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F_c
Macho	3	1.1734	0.3911	43.37**
Diluyente	2	2.2228	1.1111	123.23**
Error "a"	6	0.0541	0.0090	
Tiempo PostCong.	2	0.8956	0.4478	13.84**
D x T	4	0.0623	0.0156	0.48^{ns}
Residuo	90	2.9129	0.0324	
TOTAL	107	7.3210		

C.V. = 14.66%
Error "a" = Proviene de la interacción diluyente x macho y se usa para estos dos.
Tiempo PostCong. = Tiempo Post-Congelación.
D x T = Diluyente x Tiempo.
*** * = Diferencia significativa al 1 %.**
ns = No significativo a ningún nivel.

En el análisis de varianza mostrado en el Cuadro X para motilidad masal, se estableció con el análisis diferencias altamente significativas (P < 0.01), tanto para los diluyentes como para el efecto bloque o macho cabrío y el segundo factor o tiempo post-congelación a la cero hora post-descongelación. Con respecto al coeficiente de variación (C.V.), se obtuvo un valor excelente (menor del 10%), registrando una magnitud de 5.92%. Esta situación vuelve a repetirse con una ANDEVA a las dos horas post-descongelación presentada en el Cuadro XI, en donde también hubo diferencias altamente significativas (P < 0.01), pero con un coeficiente de variación mayor, con un valor de 14.66%.

CUADRO XII. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA MOTILIDAD INDIVIDUAL PROGRESIVA. 0-HORAS POST- DESCONGELACIÓN.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F_c
Macho	3	294.5163	98.1721	101.66**
Diluyente	2	2305.8206	1152.9103	1193.85**
Error "a"	6	5.7943	0.9657	
Tiempo PostCong.	2	51.3506	25.6753	3.59*
D x T	4	17.3272	4.3318	0.61^{ns}
Residuo	90	643.6978	7.1522	
TOTAL	107	3318.5067		

C.V. = 6.47%
Error "a" = Proviene de la interacción diluyente x macho y se usa para estos dos.
Tiempo PostCong. = Tiempo Post-Congelación.
D x T = Diluyente x Tiempo.
*** * = Diferencia significativa al 1 %.**
*** = Diferencia significativa al 5 %.**
ns = No significativo a ningún nivel.

CUADRO XIII. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA MOTILIDAD INDIVIDUAL PROGRESIVA. 2-HORAS POST- DESCONGELACIÓN.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F_c
Macho	3	321.7463	107.2488	96.16**
Diluyente	2	1298.9872	649.4936	582.33**
Error "a"	6	6.6920	1.1153	
Tiempo PostCong.	2	87.1800	43,5900	6.22*
D x T	4	12.2861	3.0715	0.44^{ns}
Residuo	90	630.2850	7.0032	
TOTAL	107	2357.1768		

C.V. = 9.91%
Error "a" = Proviene de la interacción diluyente x macho y se usa para estos dos.
Tiempo PostCong. = Tiempo Post-Congelación.
D x T = Diluyente x Tiempo.
*** * = Diferencia significativa al 1 %.**
*** = Diferencia significativa al 5 %.**
ns = No significativo a ningún nivel.

Para el parámetro de motilidad individual progresiva a la cero hora post-descongelación (Cuadro XII), se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) solamente en las fuentes de variación diluyente y macho cabrío, ya que en el tiempo post-congelación la diferencia fue simplemente significativa ($P < 0.05$). El coeficiente de variación fue levemente más alto (6.47%), que el encontrado en motilidad masal a este tiempo pos-descongelación. De igual forma, a las dos horas post-descongelación (Cuadro XIII), las diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de motilidad individual progresiva, tienen el mismo patrón que a la cero hora post-descongelación con un aumento del coeficiente de variación, que llega a los 9.91%.

CUADRO XIV. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA ESPERMATOZOIDES VIVOS. 0-HORAS POST- DESCONGELACIÓN.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F_c
Macho	3	186.5168	62.1722	16.03**
Diluyente	2	1960.1150	980.0575	252.71**
Error "a"	6	23.2694	3.8782	
Tiempo PostCong.	2	78.9772	39.4886	2.96^{ns}
D x T	4	2.1611	0.5403	0.04^{ns}
Residuo	90	1199.3572	13.3262	
TOTAL	107	3450.3968		

C.V. = 7.66%
Error "a" = Proviene de la interacción diluyente x macho y se usa para estos dos.
Tiempo PostCong. = Tiempo Post-Congelación.
D x T = Diluyente x Tiempo.
*** * = Diferencia significativa al 1 %.**
ns = No significativo a ningún nivel.

CUADRO XV. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA ESPERMATOZOIDES VIVOS. 2-HORAS POST- DESCONGELACIÓN.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F_c
Macho	3	265.0556	88.3519	37.73**
Diluyente	2	1503.8135	751.9068	321.06**
Error "a"	6	14.0517	2.3419	
Tiempo PostCong.	2	165.2013	82.6006	8.64**
D x T	4	23.3159	5.8290	0.61^{ns}
Residuo	90	860.9161	9.5657	
TOTAL	107	2832.3541		

C.V. = 9.32%
Error "a" = Proviene de la interacción diluyente x macho y se usa para estos dos.
Tiempo PostCong. = Tiempo Post-Congelación.
D x T = Diluyente x Tiempo.
*** * = Diferencia significativa al 1 %.**
ns = No significativo a ningún nivel.

En cuanto al porcentaje de espermatozoides vivos a la cero hora post-descongelación, la ANDEVA presentada en el Cuadro XIV, señala nuevamente diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) en las fuentes de variación diluyente y macho cabrío. Empero, para tiempo post-congelación, el análisis indica que no hubo diferencias significativas a ningún nivel. Por otro lado, una descripción particular del análisis a las dos horas post-congelación (Cuadro XV), demuestra que si se halló diferencias altamente significativa ($P < 0.01$) en esta fuente de variación. Evento no ocurrido en los dos parámetros anteriores (motilidad masal y motilidad individual progresiva). El Cuadro XV, también indica para este tiempo post-descongelación, altas diferencias por el orden de $P < 0.01$, para diluyentes como para macho cabrío.

CUADRO XVI. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA MORFOANOMALÍAS TOTALES. 0-HORAS POST- DESCONGELACIÓN.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F_c
Macho	3	494.5378	164.8459	14.24**
Diluyente	2	582.6524	291.3262	25.17**
Error "a"	6	69.4528	11.5755	
Tiempo PostCong.	2	24.3557	12.1779	1.88^{ns}
D x T	4	23.0026	5.7506	0.89^{ns}
Residuo	90	583.0461	6.4783	
TOTAL	107	1777.0474		

C.V. = 13.34%
Error "a" = Proviene de la interacción diluyente x macho y se usa para estos dos.
Tiempo PostCong. = Tiempo Post-Congelación.
D x T = Diluyente x Tiempo.
*** * = Diferencia significativa al 1 %.**
ns = No significativo a ningún nivel.

CUADRO XVII. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA MORFOANOMALÍAS TOTALES. 2-HORAS POST- DESCONGELACIÓN.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F_c
Macho	3	709.8107	236.6036	33.16**
Diluyente	2	516.3800	258.1900	36.18**
Error "a"	6	42.8126	7.1354	
Tiempo PostCong.	2	3.6617	1.8308	0.20^{ns}
D x T	4	36.2167	9.0542	1.00^{ns}
Residuo	90	811.6950	9.0188	
TOTAL	107	2120.5767		

C.V. = 14.06%
Error "a" = Proviene de la interacción diluyente x macho y se usa para estos dos.
Tiempo PostCong. = Tiempo Post-Congelación.
D x T = Diluyente x Tiempo.
*** * = Diferencia significativa al 1 %.**
ns = No significativo a ningún nivel.

En el porcentaje de morfoanomalías totales presentados en los Cuadros XVI y XVII, se encontraron valores de 13.34% y 14.06% para coeficiente de variación en cero y dos horas post-descongelación respectivamente, lo cual señala mayor variación en los datos recolectados para esta variable con respecto a las variables analizadas anteriormente. Además, se concluye de ambos cuadros (XVI y XVII), que no se encontró diferencias a ningún nivel para el tiempo post-congelación, no obstante para las fuentes diluyente y macho cabrío, si se estableció diferencias altamente significativas ($P < 0.01$). Indicando, que ninguno de los tiempos, a los cuales se descongelo en la investigación, varió significativamente, por lo cual esta fuente de variación no afecta ni influye en el número de morfoanomalías que podemos encontrar en el semen congelado.

CUADRO XVIII. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PROPORCIÓN DE MORFOANOMALÍAS PRIMARIAS / SECUNDARIAS. 0-HORAS POST- DESCONGELACIÓN.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F_c
Macho	3	2088.3333	696.1111	8.19*
Diluyente	2	3103.1852	1551.5926	18.25**
Error "a"	6	510.0000	85.0000	
Tiempo PostCong.	2	1921.1852	960.5926	5.42**
D x T	4	274.8704	68.7176	0.39^{ns}
Residuo	90	15939.5000	177.1056	
TOTAL	107	23837.0741		

C.V. = 25.64% - 27.67%
Error "a" = Proviene de la interacción diluyente x macho y se usa para estos dos.
Tiempo PostCong. = Tiempo Post-Congelación.
D x T = Diluyente x Tiempo.
*** * = Diferencia significativa al 1 %.**
*** = Diferencia significativa al 5 %.**
ns = No significativo a ningún nivel.

CUADRO XIX. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PROPORCIÓN DE MORFOANOMALÍAS PRIMARIAS / SECUNDARIAS. 2-HORAS POST- DESCONGELACIÓN.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F_c
Macho	3	1723.7407	574.5802	6.20*
Diluyente	2	3134.4630	1567.2315	16.92**
Error "a"	6	555.7593	92.6265	
Tiempo PostCong.	2	997.8518	498.9259	2.97^{ns}
D x T	4	88.7593	22.1898	0.13^{ns}
Residuo	90	15102.5000	167.8056	
TOTAL	107	21603.0741		

C.V. = 24.96% - 26.94%
Error "a" = Proviene de la interacción diluyente x macho y se usa para estos dos.
Tiempo PostCong. = Tiempo Post-Congelación.
D x T = Diluyente x Tiempo.
*** * = Diferencia significativa al 1 %.**
*** = Diferencia significativa al 5 %.**
ns = No significativo a ningún nivel.

Este es el parámetro que presenta diversos grados de significancia en las respuestas obtenidas a través de las ANDEVAS. Primero, tengo que señalar que los parámetros de morfoanomalías primarias y morfoanomalías secundarias analizados, ya sea, por el primero o por el segundo, resultaban en iguales valores en los cuadros de las ADEVAS. Pero las magnitudes de los coeficientes de variación eran distintas según el procesamiento de los datos del parámetro (depende si se utilizó a las morfoanomalías primarias o secundarias). En efecto, en el Cuadro XVIII, se presenta valores de 25.64% C.V. para morfoanomalías primarias y 27.67% C.V. para morfoanomalías secundarias. Mientras en el cuadro XIX, los valores fueron de 24.96% y 26.94% respectivamente. Hay que resaltar que a las dos horas post-descongelación el porcentaje de coeficiente de variación fue menor.

Por otra parte, se presentan los resultados en el Cuadro XVIII para cero hora post-descongelación, en la cual se determinó diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) en diluyente y en tiempo post-congelación, como diferencias significativas ($P < 0.05$) en macho cabrío. En contraste con el Cuadro XVIII, podemos visualizar en el Cuadro XIX, que no se hallo diferencia significativa a ningún nivel para la fuente de variación tiempo post-congelación, pero si se encontró, al igual que a la cero hora post-congelación, diferencias significativas ($P < 0.05$) para machos cabríos y altamente significativas ($P < 0.01$) para la fuente de variación diluyente.

Agrupando todos los análisis realizados por ANDEVA podemos señalar:

El efecto diluyente sobre los parámetros de calidad seminal, registró en todas las pruebas (motilidad masal, motilidad individual progresiva, porcentaje de espermatozoides vivos, morfoanomalías totales y proporción de morfoanomalías primarias / secundarias), diferencias altamente significativas ($P < 0.01$), tanto a la cero hora, como a las dos horas post-descongelación (PDC).

En cuanto al factor macho (bloque), se determinó diferencias en todas las variables dependientes, a través de la ANDEVA en ambos tiempos PDC. La mayoría fueron altamente significativa ($P < 0.01$): motilidad masal e individual progresiva, espermatozoides vivos y morfoanomalías totales, a excepción de la proporción de morfoanomalías primarias / secundarias ($P < 0.05$).

Por otra parte, el efecto Tiempo Post-Congelación influyo realmente en motilidad masal, espermatozoide vivos (solo a las dos horas PDC) y proporción de morfoanomalías primarias / secundarais (a la cero horas PDC); siendo en estas altamente significativa ($P < 0.01$). En cambio; la motilidad individual progresiva fue significativa a una $P < 0.05$; mientras, que en todas las otras variables no se encontró diferencias significativa a ningún nivel.

CUADRO XX. COMPARACIONES DE MEDIAS POR TUKEY PARA DILUYENTE.

VARIABLES DE CALIDAD SEMINAL	Diluyentes*					
	0 horas PDC			2 horas PDC		
	T#1	T#2	T#3	T#1	T#2	T#3
Motilidad Masal	1.65[b]	1.99[a]	1.97[a]	1.03[b]	1.35[a]	1.31[a]
Motilidad Individual (%)	35.2[c]	46.4[a]	42.3[b]	22.7[c]	31.1[a]	26.3[b]
Espermatozoides Vivos (%)	42.4[c]	47.8[b]	52.8[a]	28.3[c]	33.9[b]	37.4[a]
Morfoanomalías (%)	19.7[a]	21.6[a]	16.0[b]	22.4[a]	23.3[a]	18.3[b]
Morfoanomalías Primarias (%)	59[a]	46[b]	52[b]	58[a]	45[b]	52[ba]
Morfoanomalías Secundarias (%)	41[b]	54[a]	48[a]	42[b]	55[a]	48[ba]

*** = Los valores de medias aritméticas (promedios) se analizaron con una probabilidad del 5% de significancia. Aquellos valores que tiene una letra diferente dentro del mismo tiempo post-descongelación y variable de calidad seminal, indican diferencias significativas.**

En el caso de motilidad masal (MM), analizada por comparación de medias de Tukey y mostrada en el Cuadro XX, los tratamiento dos y tres registraron los valores más altos (1.99 y 1.97 respectivamente) en el análisis de comparación de medias, no presentando diferencias entre sí; sin embargo, sí las hubo con respecto al tratamiento uno (1.65). Esto señala, que existe una diferencia en la observación de ondas y remolinos en las muestras seminales de los diversos diluyentes utilizadas en el ensayo. Al respecto, **Santillana (2003)** reportó valores menores en la comparación de dos diluyentes para semen de ovinos F1 (Dorper x Pelibuey), uno a base de agua de coco y el otro, un diluyente comercial (Lab. IMV), con medias de 1.08 y de 1.64 respectivamente. A pesar de que esta prueba es buena en campo, y se puede realizar en semen caprino congelado

por la alta concentración en las pajuelas; es una prueba fuertemente dependiente de la concentración, el porcentaje de células con movimiento progresivo y la velocidad de movimiento de los espermatozoides. Por lo que la prueba es engañosa y se rectifica con la prueba de motilidad individual progresiva (MIP) **(Pezzone, 2008)**. El estudio del movimiento lineal progresivo de los espermatozoides, definió una real diferencia ($P < 0.05$) entre los tres diluyentes, mostrando un promedio de 46.4% de MIP para el diluyente con 12.0% de yema de huevo con previa centrifugación (CC), 42.3% para el diluyente de surfactante vegetales y 35.2% para el de 2.0% de yema de huevo sin centrifugación (SC); todos con gran diferencia entre sí a la cero hora post-descongelación (PDC). En los dos estudios de **Vera (2007-ab)** en donde también hubo diferencias, nuestros resultados fueron parecidos para el diluyentes con yema de huevo al 2.0%, con valores de 36.0 y 34.6%. En cambio, para los diluyentes 12.0% (CC) y surfactante vegetales fueron diferentes; el primero obtuvo en estos estudios 53.1% y 55.8%, mientras que el otro 32.9% y 30.9%. Aunque este último, contenía en su composición compuestos vegetales (lecitina de soya) pero no surfactantes. Este elemento es de importancia, demostrándose en la investigación de **Janett *et al.* (2005)**, que el AndroMed® (surfactantes vegetales) presentó en semen bovino, mejores valores para motilidad individual total con 66.7%, comparado con el Bioxcell® (lecitina de soya) con 60.9% y Triladyl® (yema de huevo) con 52.4%. Igualmente, para motilidad individual progresiva en este ensayo, el AndroMed® presento valores de 33.1%, Bioxcell® 31.0% y Triladyl® 23.5%. Asimismo **Hellemann (1997)**, en

pruebas con semen de ovino crioconservado, demostró que la adición de surfactantes (Equex STM®) a diluyentes tris y citrato de sodio (Na) mejoró su calidad; en donde el surfactante permitió recuperar cerca del 10% de MIP en el diluyente tris y 33% en el diluyente citrato de sodio. No obstante, estos últimos estudios mencionados se hicieron en otras especies diferentes al caprino y no comparados contra diluyentes con mayor porcentaje de huevo, utilizando la centrifugación. Demostrando nuestra investigación, que el surfactante vegetal no logró superar a este diluyente en cuanto a MIP, pero si al diluyente con 2.0% de yema de huevo. Además, **Martínez (1994)** solamente obtuvieron 22.3% a 21.2% usando un diluyente hipertónico e hipotónico al 2.25% y 1.64% de yema de huevo, cuyos valores están muy por debajo del valor obtenido en el diluyente uno del experimento. Con respecto a los resultados a las dos horas post-descongelación presentados en el Cuadro XX, los tres tratamientos presentaron diferencias (22.7% T1, 31.1% T2 y 26.3% T3), siendo muy diferentes a los encontrados en los estudios de **Vera (2007-ab)** (18.4% con diluyente al 2.0%; 38.6% y 42.0% con diluyente al 12.0%; y 13.1% y 14.3% con diluyente con lecitina de soya). En contraste con la MIP; el porcentaje de espermatozoides vivos (PEV) mostró que el diluyente tres presentó los mejores resultados tanto a la cero, como a las dos horas PDC (52.8% y 37.4%), seguido del diluyente dos (47.8% y 33.9%) y después el diluyente uno (42.4% y 28.3%). Esto nos indica que a pesar de que los surfactantes vegetales logran una mayor supervivencia espermática en los dos tiempos PDC, el número de espermatozoides con movimiento lineal progresivo es mayor en el diluyente con lavado seminal, que

con los surfactantes, siendo mayor la capacidad fecundante del primero en mención (diluyente al 12.0%). Además, los resultados fueron muy parecidos a los resultados de **Vera (2007-a)** (37.9% T1, 48.3% T2 y 48.3% T3 a la cero hora PDC), pero diferentes en los ensayos de **Martínez (1994)** con 46.2% y 47.7% (con respecto al diluyente con 2.0% de yema de huevo), y en la tesis de grado de **Samaniego (2006)**, en la cual los diluyentes con adición de yema de huevo (Triladyl® y Biladyl®) presentaron mejores resultados que los de surfactantes vegetales (AndroMed®), evaluados en semen bovino criopreservado.

Con el fin de conocer la presentación de espermatozoides anormales, se efectuó el estudio de morfoanomalías espermáticas totales (MT) y la proporción de los defectos primarios (MP) y secundarios (MS). En la cual, se obtuvo como resultado en los dos tiempos PDC, un mayor porcentaje de MT en el tratamiento dos (21.6% y 23.3%), el cual no difirió del tratamiento uno (19.7% y 22.4%), pero si con el tratamiento tres (16.0% y 18.3%) (Cuadro XX). Según parece, esta observación nos indica, que la mayor manipulación del semen, utilizando el diluyente al 12.0% (CC) provoca un aumento del porcentaje de morfoanomalías totales **(Salisbury, 1978; Sorensen, 1982).** Afirmación validada, al analizar la proporción de las morfoanomalías; en donde el tratamiento dos (T2) mostro un 54% y 55% de morfoanomalías secundarias (MS), siendo muy diferentes al tratamiento uno (T1) con 41% y 42%; y al tratamiento tres (T3) sin mayores cambios, con 48%. Aún, cuando la mayor magnitud de esta característica en el T2, podría afectar considerablemente el poder fecundante de los

espermatozoides protegidos con este diluyente, la diferencia con el surfactante vegetal es ligeramente despreciable cuando lo comparamos con la MIP y explica en parte, el mayor porcentaje de espermatozoides vivos en este último. Sin embargo, **Samaniego (2006)** contrasta con nuestros resultados al concluir un mayor porcentaje de morfoanomalías totales en el diluyente con surfactantes vegetales, que con los de yema de huevo. En adición al análisis, es importante analizar la naturaleza del defecto. En nuestra investigación, con respecto a las morfoanomalías primarias, se identificó en la mayoría de las muestras, mayor cantidad de colas fuertemente doblada y enrollada, gota citoplasmática proximal y cabeza anormal suelta (libre). Además, se observaron pocas morfoanomalías con defecto acrosomal (abultado), pieza media anormal, modificaciones en el segmento medio y cola, colas adicionales y microcefalia, entre otras. En cuanto a las morfoanomalías secundarias, se encontraron espermatozoides con cola simple torcida, cola terminalmente enrollada, gota citoplasmática distal y cabeza normal desprendida o guillotinada. Además, se observaron pocas morfoanomalías con capuchones cefálicos desprendidos, membrana acrosomal separada, doblada y suelta. Otra razón, por la cual se obtuvo mayor contenido de MS en el T2, posiblemente sería el daño ocasionado a la morfología y estructura espermática debido a la centrifugación. Al respecto **Urrego *et al.* (2008)**, afirma que la centrifugación de los espermatozoides bovinos durante 10, 30 ó 45 minutos a 700 x G, tiene un efecto deletéreo sobre el ADN de los espermatozoides y que la centrifugación por 45 min además de causar daño en el ADN produce pérdida de la integridad de la membrana plasmática. No

obstante, la experimentación en el T2 fue de 514 x G durante 13 minutos en la centrifugadora, descartando la posibilidad de daños a los espermatozoides. Lo que indica, que al utilizar menor cantidad de gravedades hubo beneficios, pero en detrimento de un mejor lavado, eliminación del plasma seminal y por ende de menores valores en MIP y PEV por efecto de la fosfolipasa A (no eliminada) frente al 12.0% de yema de huevo.

CUADRO XXI. COMPARACIONES DE MEDIAS POR TUKEY PARA MACHO CABRIO

VARIABLES DE CALIDAD SEMINAL	Macho Cabrío							
	0 horas PDC				2 horas PDC			
	#8519	#8510	#5245	#6176	#8519	#8510	#5245	#6176
Motilidad Masal	1.91^{ba}	1.74^{c}	1.97^{a}	1.85^{b}	1.28^{ba}	1.06^{c}	1.34^{a}	1.23^{b}
Motilidad Individual (%)	42.1^{b}	38.9^{d}	43.4^{a}	40.8^{c}	27.2^{b}	24.1^{c}	28.9^{a}	26.6^{b}
Espermatozoides Vivos (%)	48.3^{a}	45.7^{b}	49.2^{a}	47.5^{ba}	33.4^{b}	30.8^{c}	35.3^{a}	33.3^{b}
Morfoanomalías (%)	17.6^{b}	22.5^{a}	17.0^{b}	19.1^{b}	19.8^{cb}	25.2^{a}	18.4^{c}	22.1^{b}
Morfoanomalías Primarias (%)	50^{ba}	57^{a}	46^{b}	54^{a}	50^{ba}	58^{a}	47^{b}	53^{ba}
Morfoanomalías Secundarias (%)	50^{ba}	43^{b}	54^{a}	46^{b}	50^{ba}	42^{b}	53^{a}	47^{ba}

*** = Los valores de medias aritméticas (promedios) se analizaron con una probabilidad del 5% de significancia. Aquellos valores que tiene una letra diferente dentro del mismo tiempo post-descongelación y variable de calidad seminal, indican diferencias significativas.**

En la evaluación de la motilidad masal, los dos machos alpinos obtuvieron mejores valores que los otros dos (Cuadro XXI). En efecto, en la motilidad individual progresiva (cero hora PDC), las medias demostraron diferencias entre los cuatros (43.4%-M3, 42.1%-M1, 40.8%-M4, 38.9%-M2); siendo el macho

5245 (M3) el de mejor resultados, contrastando con el macho 8510 (M2) el cual demostró los peores resultado en casi todas las pruebas. Aunque, en la proporción de morfoanomalías primarias / secundarias las diferencias son despreciables, cabe señalar en los resultados presentados en el Cuadro XXI, un mayor porcentaje de MP para el macho 8510 (57%), en cambio el macho 5245 presentó mayor porcentaje (54%) en las MS. Los datos establecidos en esta investigación tienen congruencia con el estudio de **Chandler (1988)**, sobre las características del esperma caprino. Chandler estableció una prueba en cinco razas, con cinco machos por raza, ejecutando la recolección de cuatro eyaculados. En la cual la motilidad individual progresiva en semen descongelado fue mayor en la raza Alpino Francés con 38.0% y Saanen con 33.4%, en comparación a las razas La Mancha con 22.9% y Toggenburg con 17.3%. Igualmente en las morfoanomalías primarias y secundarias, las cuales expresó en proporción al total de espermatozoides. En las cuales encontró valores en las distintas razas de: 6.1% en Sannen, 17.6% en Alpina Francés, 18.8% en Nubian, 28.2% en La Mancha y 28.9% en Toggenburg; cuyos porcentajes corresponden a daños acrosomales (microcefalia, macrocefalia, piriformes y otros), clasificadas como morfoanomalías primarias. Además, determinó otras pertenecientes a las morfoanomalías secundarias en porcentajes de: 3.9% Saanen, 14.2% en Alpina Francés, 8.3% en Nubian, 18.4% La Mancha, y 18.9% en Toggenburg, cuyos valores corresponden a daños en la cola (gota citoplasmática y cola ligeramente doblada). Esto concluye en afirmar que los dos machos alpinos, por efecto individual cada uno, resistieron mejor el proceso de criopreservación.

CUADRO XXII. COMPARACIONES DE MEDIAS POR TUKEY PARA TIEMPO POST-CONGELACIÓN

VARIABLES DE CALIDAD SEMINAL	Tiempo Post-Congelación					
	0 horas PDC			2 horas PDC		
	0 Horas	48 Horas	96 Horas	0 Horas	48 Horas	96 Horas
Motilidad Masal	1.78[b]	1.91[a]	1.91[a]	1.12[c]	1.34[a]	1.23[b]
Motilidad Individual (%)	40.3	41.8	41.8	25.6[b]	27.8[a]	26.7[ba]
Espermatozoides Vivos (%)	46.5	48.2	48.3	31.4[b]	34.2[a]	34.0[a]
Morfoanomalías (%)	18.5	19.2	19.6	21.2	21.3	21.6
Morfoanomalías Primarias (%)	56[a]	54[a]	46[b]	56[a]	51[ba]	49[b]
Morfoanomalías Secundarias (%)	44[b]	46[b]	54[a]	44[b]	49[ba]	51[a]

*** = Los valores de medias aritméticas (promedios) se analizaron con una probabilidad del 5% de significancia. Aquellos valores que tiene una letra diferente dentro del mismo tiempo post-descongelación y variable de calidad seminal, indican diferencias significativas.**

El tiempo post-congelación a la cual se descongelan las pajuelas, al parecer, no tiene gran efecto en los parámetros de calidad seminal. Esto se demuestra, al evaluar por Tukey las comparaciones de medias (Cuadro XXII), las cuales señalaron diferencias a la cero hora PDC, solamente en la motilidad masal y en la proporción de MP/MS, indicando que los tiempos 48 y 96 horas (1.91 y 1.91) difieren con respecto al tiempo 0 horas (1.78), pero no entre sí. Prosiguiendo a las dos horas PDC, además de las diferencias en la MM, también se notó ese cambio en la motilidad individual y el porcentaje de espermatozoides vivos. Igualmente, podemos decir que los tiempos 48 y 96 horas en la mayoría de estos parámetros, difieren con respecto a 0 hora, pero no entre sí. En ambos tiempos PDC las morfoanomalías totales no muestran cambios entre los tiempos

post-congelación. Los resultados encontrados sugieren que la rápida congelación, seguido de la inmediata descongelación (0 horas), contribuye perjudicialmente a los espermatozoides, al no tener un tiempo para acostumbrarse a la congelación. El pasar por shock térmicos sucesivos durante un mismo día y en una misma hora, contribuye a que en las temperaturas críticas un número mayor de espermatozoides nos sean capaces de soportarlos; en contraste con descongelaciones efectuadas a mayores tiempos post-congelación **(Sato et al, 1992)**. No obstante, las diferencias parecen ser despreciable desde un enfoque biológico, pero se tendrían que realizar los análisis pertinentes, *in vivo o in vitro*. Desde el punto de vista técnico, ningún profesional que utilice la criopreservación de semen para programas de mejoramiento genético, descongela semen para inseminar inmediatamente después de haber congelado. Debido a que resulta una práctica poco eficiente y económica, ya que se conoce que los niveles de fertilidad de un hato son menores con semen congelado, pudiendo utilizar semen fresco diluido o refrigerado. Sin embargo, **Medrano *et al.* (2004)**, obtuvieron con semen congelado y conservado de machos cabríos, diferencias en la MIP a -196 °C, en la descongelación realizada a los dos días (36.8%) comparada con las efectuadas a los dos meses (42.2%).

Además, en el cuadro XXIII se resumen los cambios o diferencias porcentuales entre los dos tiempos post-descongelación (PDC). Se pudo observar que la disminución de la motilidad masal, la motilidad individual progresiva y el

porcentaje de vivos y muertos no fue en ningún caso mayor del 40% y la mayoría de estos, estuvo dentro del -30% al -39%. En las morfoanomalías totales, el incremento fue mínimo (menos del 15%), siendo consecuencia del incremento de las morfoanomalías secundarias dentro de los tratamientos, siendo estas de naturaleza degenerativa **(Pezzone, 2008)**. Al respecto, **Vera (2007-b)** en sus resultados, halló cambios mayores, mostrando los tratamientos o diluyente -46.8% T1, -24.7% T2, -53.7% T3. De igual forma, **Chandler (1988)** identificó un decremento en morfoanomalías primarias de -16.7%, mientras en las secundarias de -22.2%.

CUADRO XXIII. DIFERENCIA PORCENTUAL ENTRE EL TIEMPO POST-DESCONGELACIÓN (DE CERO A DOS HORAS).*

VARIABLES DE CALIDAD SEMINAL	Diluyentes			Macho Cabrío				Tiempos Post-Congelación		
	T#1	T#2	T#3	#8519	#8510	#5245	#6176	0 Horas	48 Horas	96 Horas
Motilidad Masal	-37.6%	-32.2%	-33.5%	-33.0%	-39.1%	-32.0%	-33.5%	-37.1%	-29.8%	-35.6%
Motilidad Individual (%)	-35.5%	-33.0%	-37.8%	-35.4%	-38.0%	-33.4%	-34.8%	-36.5%	-33.5%	-36.1%
Espermatozoides Vivos (%)	-33.3%	-29.1%	-29.2%	-30.8%	-32.6	-28.3%	-29.9%	-32.5%	-29.0%	-29.6%
Morfoanomalías Totales (%)	+13.7%	+7.9%	+14.4%	+12.5%	+12.0%	+8.2%	+15.7%	+14.6%	+10.9%	+10.2%
Morfoanomalías Primarias (%)	-1.7%	-2.2%	0.0%	0.0%	+1.8%	+2.2%	-1.9%	0.0%	-5.6%	+6.5%
Morfoanomalías Secundarias (%)	+2.4%	+1.9%	0.0%	0.0%	-2.3%	-1.9%	+2.2%	0.0%	+6.5%	-5.6%

*** = Los valores con signo negativo (-) indican un decremento, mientras que los que tiene un signo positivo indican un incremento (+). El porcentaje de diferencia porcentual indica el cambio que ocurrió del tiempo post-descongelación cero, al tiempo de dos horas en incubación, sobre el valor original a la hora cero por 100.**

Finalmente, se reúne toda la información analizada por las comparaciones de Tukey en los cuadros XXIV y XXV, que corresponden a los tiempos cero y dos horas post-descongelación. En la cual se presentan como resumen de las tres fuentes de variación y las diferencias de las medias por cada parámetro de calidad seminal ($P < 0.05$).

Por otra parte, en las Figuras 18 y 19 se presenta a los gráficos correspondientes a la motilidad individual progresiva, a la cero y dos horas post-descongelación. Donde se observa que en la fuente de variación diluyente, hay mayor grado de diferencia porcentual entre los tratamientos. Igualmente, en las Figuras 20 y 21, se puede visualizar en los gráficos a las tres fuentes de variación pero con respecto al porcentaje de espermatozoides vivos, en la cual nuevamente el diluyente presenta mayor variación entre las diversas fuentes de variación. En las Figura 22 y 23, se refieren al porcentaje de morfoanomalías totales a la cero y dos horas post-descongelación. A pesar, que no hay gran diferencias entre las horas post-descongelación y las fuentes de variación; aunque, se puede notar una tendencia de mayor variabilidad del factor diluyente y macho cabrío. Además, el tiempo post-congelación presentó las menores diferencias entre los tres tiempos, para este parámetro.

CUADRO XXIV. RESUMEN DE COMPARACIONES DE MEDIAS POR TUKEY EN LAS FUENTES DE VARIACIÓN: DILUYENTE, MACHO CABRÍO Y TIEMPO POST-CONGELACIÓN, A LA 0-HORA POST-DESCONGELACIÓN.

VARIABLES DE CALIDAD SEMINAL	Tiempo - 0 horas post-descongelación*									
	Diluyentes			Macho Cabrío				Tiempos Post-Congelación		
	T#1	T#2	T#3	#8519	#8510	#5245	#6176	0 Horas	48 Horas	96 Horas
Motilidad Masal	1.65^{b}	1.99^{a}	1.97^{a}	1.91^{ba}	1.74^{c}	1.97^{a}	1.85^{b}	1.78^{b}	1.91^{a}	1.91^{a}
Motilidad Individual (%)	35.2^{c}	46.4^{a}	42.3^{b}	42.1^{b}	38.9^{d}	43.4^{a}	40.8^{c}	40.3	41.8	41.8
Espermatozoides Vivos (%)	42.4^{c}	47.8^{b}	52.8^{a}	48.3^{a}	45.7^{b}	49.2^{a}	47.5^{ba}	46.5	48.2	48.3
Morfoanomalías (%)	19.7^{a}	21.6^{a}	16.0^{b}	17.6^{b}	22.5^{a}	17.0^{b}	19.1^{b}	18.5	19.2	19.6
Proporción M.Primarias/ M.Secundarias (%)	59/41	46/54	52/48	50/50	57/43	46/54	54/46	56/44	54/46	46/54
Morfoanomalías Primarias (%)	59^{a}	46^{b}	52^{b}	50^{ba}	57^{a}	46^{b}	54^{a}	56^{a}	54^{a}	46^{b}
Morfoanomalías Secundarias (%)	41^{b}	54^{a}	48^{a}	50^{ba}	43^{b}	54^{a}	46^{b}	44^{b}	46^{b}	54^{a}

*** = Los valores de medias aritméticas (promedios) se analizaron con una probabilidad del 5% de significancia. Aquellos valores que tiene una letra diferente dentro de la misma fuente de variación y variable de calidad seminal, indican diferencias significativas. Los valores que no tienen letra, no indican diferencias entre sí (a excepción de la Proporción de Morfoanomalías Primarias / Secundarias).**

CUADRO XXV. RESUMEN DE COMPARACIONES DE MEDIAS POR TUKEY EN LAS FUENTES DE VARIACIÓN: DILUYENTE, MACHO CABRÍO Y TIEMPO POST-CONGELACIÓN, A LAS 2-HORAS POST-DESCONGELACIÓN.

VARIABLES DE CALIDAD SEMINAL	Tiempo - 2 horas post-descongelación*									
	Diluyentes			Macho Cabrío				Tiempos Post-Congelación		
	T#1	T#2	T#3	#8519	#8510	#5245	#6176	0 Horas	48 Horas	96 Horas
Motilidad Masal	1.03^{b}	1.35^{a}	1.31^{a}	1.28^{ba}	1.06^{c}	1.34^{a}	1.23^{b}	1.12^{c}	1.34^{a}	1.23^{b}
Motilidad Individual (%)	22.7^{c}	31.1^{a}	26.3^{b}	27.2^{b}	24.1^{c}	28.9^{a}	26.6^{b}	25.6^{b}	27.8^{a}	26.7^{ba}
Espermatozoides Vivos (%)	28.3^{c}	33.9^{b}	37.4^{a}	33.4^{b}	30.8^{c}	35.3^{a}	33.3^{b}	31.4^{b}	34.2^{a}	34.0^{a}
Morfoanomalías (%)	22.4^{a}	23.3^{a}	18.3^{b}	19.8^{cb}	25.2^{a}	18.4^{c}	22.1^{b}	21.2	21.3	21.6
Proporción M.Primarias/ M.Secundarias (%)	58/42	45/55	52/48	50/50	58/42	47/53	53/47	56/44	51/49	49/51
Morfoanomalías Primarias (%)	58^{a}	45^{b}	52^{ba}	50^{ba}	58^{a}	47^{b}	53^{ba}	56^{a}	51^{ba}	49^{b}
Morfoanomalías Secundarias (%)	42^{b}	55^{a}	48^{ba}	50^{ba}	42^{b}	53^{a}	47^{ba}	44^{b}	49^{ba}	51^{a}

*** = Los valores de medias aritméticas (promedios) se analizaron con una probabilidad del 5% de significancia. Aquellos valores que tiene una letra diferente dentro de la misma fuente de variación y variable de calidad seminal, indican diferencias significativas. Los valores que no tienen letra, no indican diferencias entre sí (a excepción de la Proporción de Morfoanomalías Primarias / Secundarias).**

FIGURA 18. GRÁFICO DE MOTILIDAD PROGRESIVA A 0-HORAS POST-DESCONGELACIÓN.

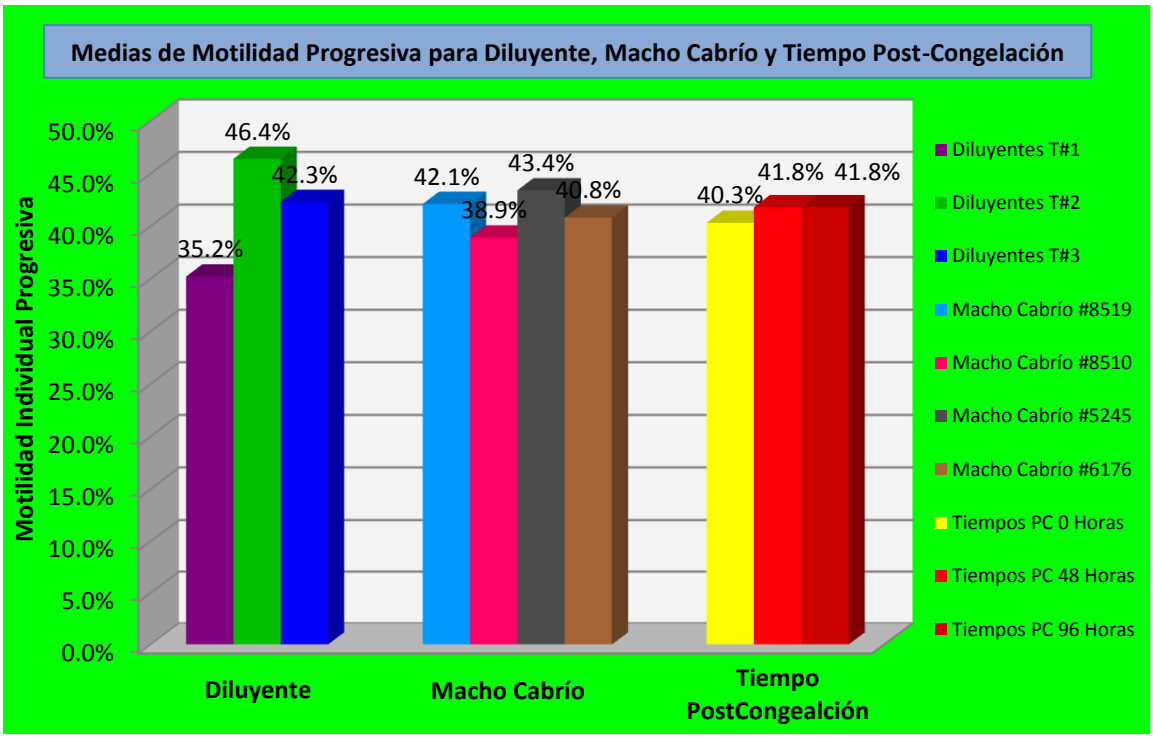


FIGURA 19. GRÁFICO DE MOTILIDAD PROGRESIVA A 2-HORAS POST-DESCONGELACIÓN.

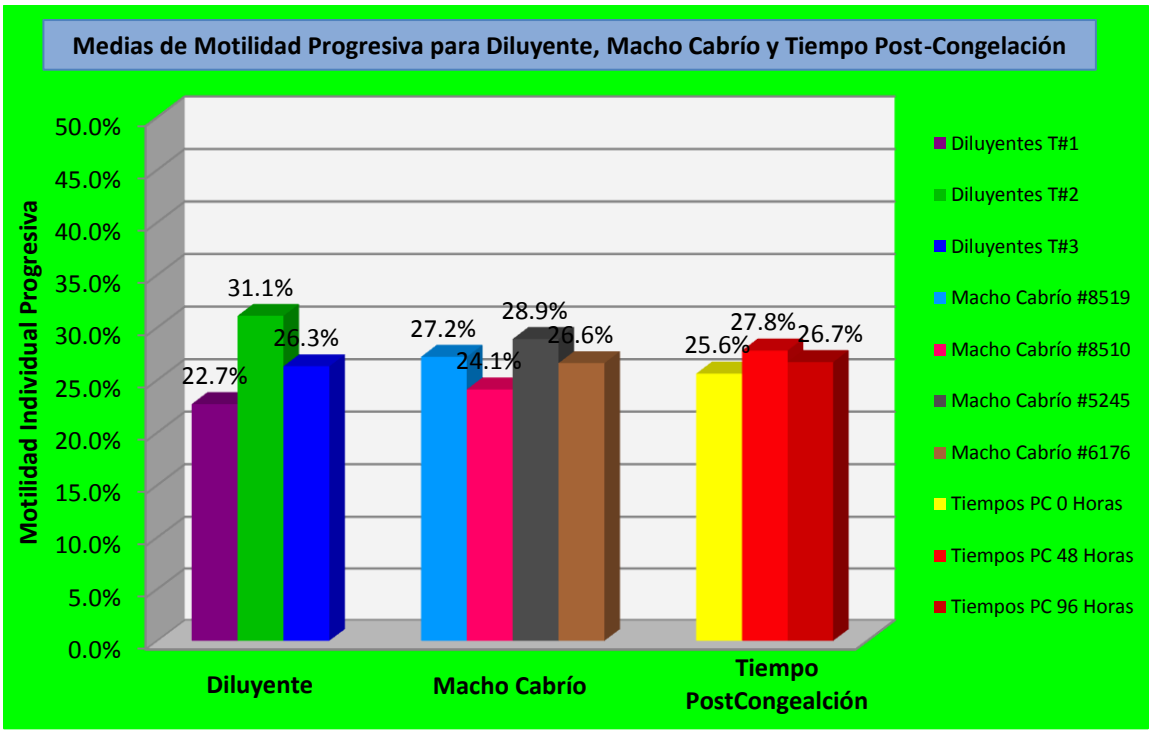


FIGURA 20. GRÁFICO DE ESPERMATOZOIDES VIVOS A 0-HORAS POST-DESCONGELACIÓN.

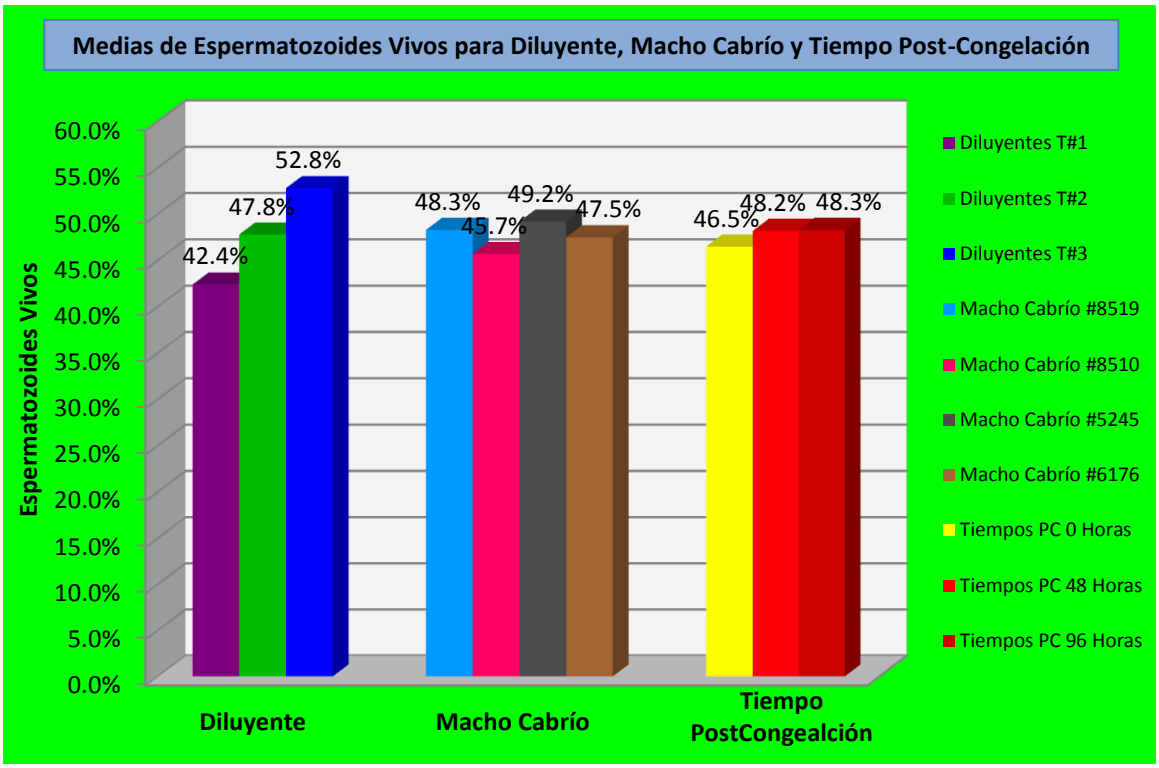


FIGURA 21. GRÁFICO DE ESPERMATOZOIDES VIVOS A 2-HORAS POST-DESCONGELACIÓN.

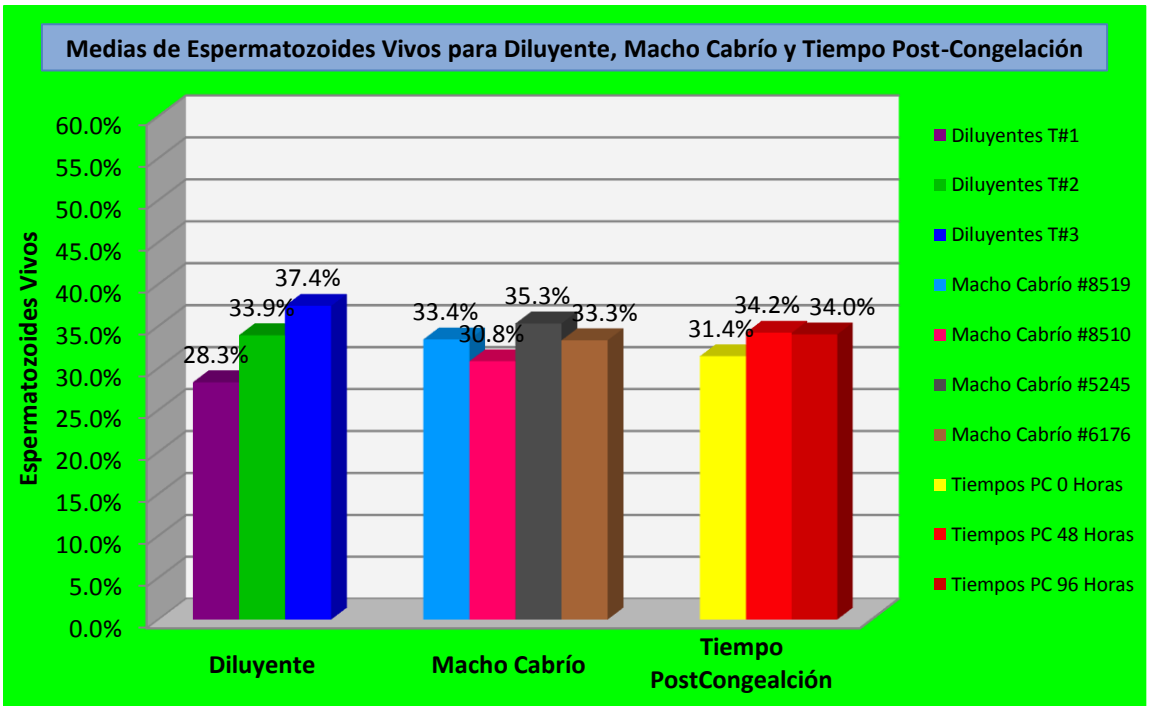


FIGURA 22. GRÁFICO DE MORFOANOMALÍAS TOTALES A 0-HORAS POST-DESCONGELACIÓN.

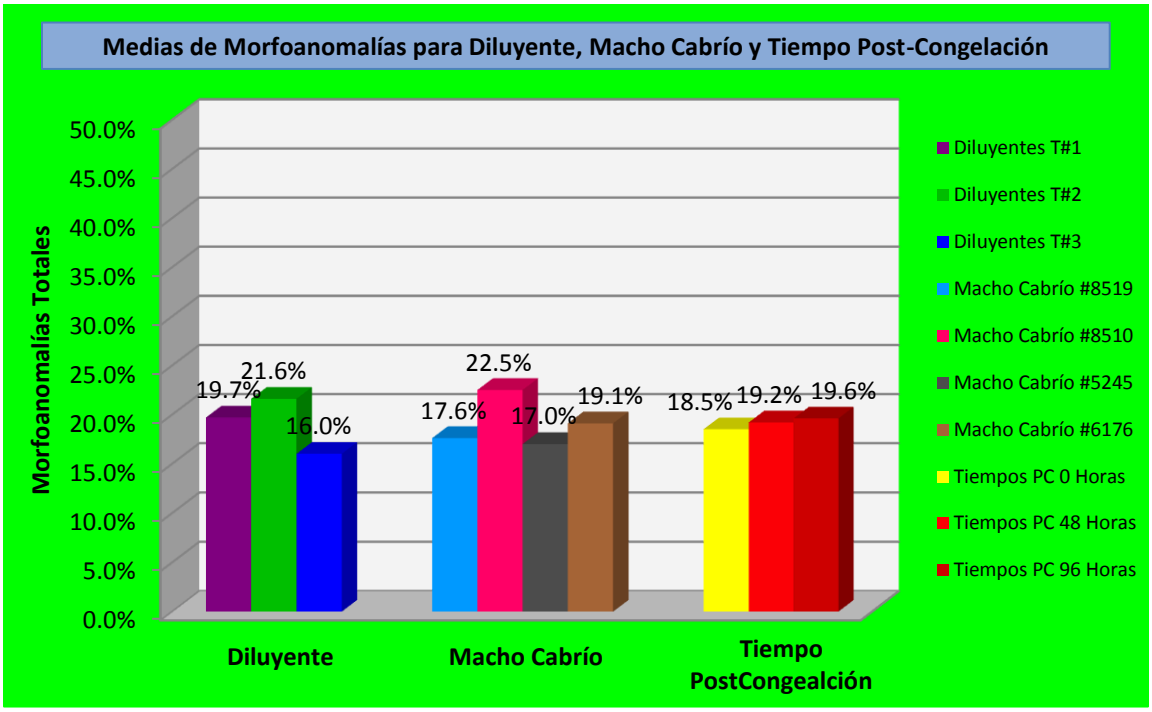
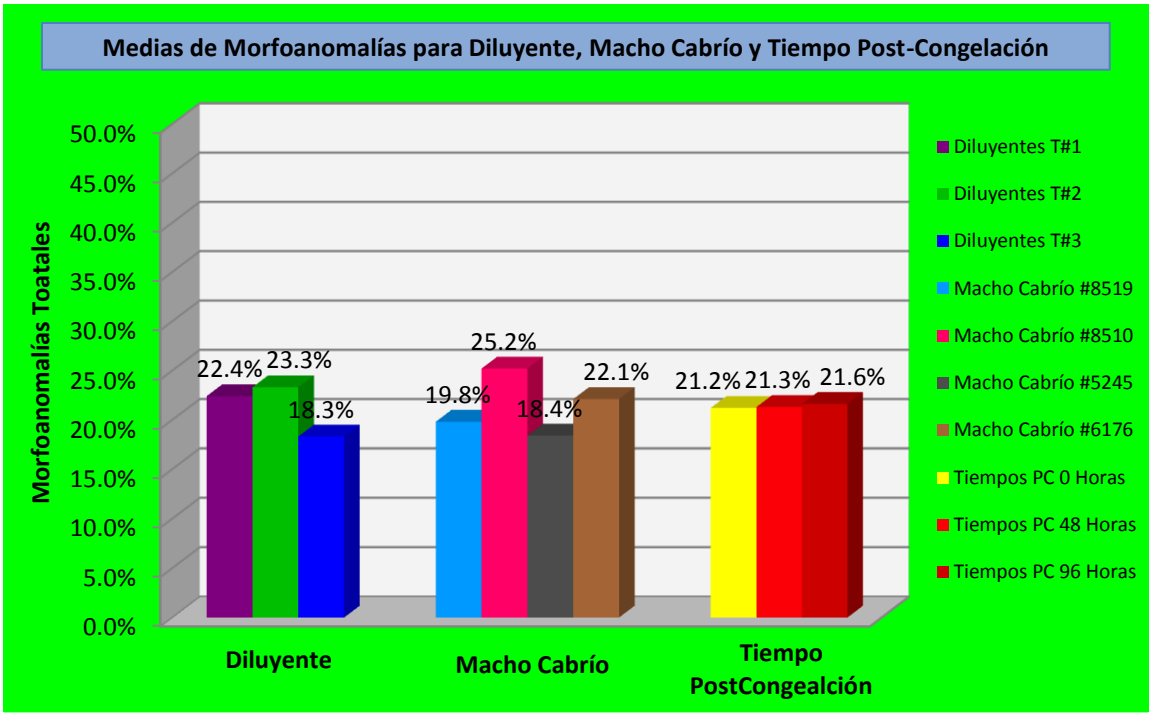


FIGURA 23. GRÁFICO DE MORFOANOMALÍAS TOTALES A 2-HORAS POST-DESCONGELACIÓN.



V. CONCLUSIONES

- El efecto del diluyente influyo, con diferencias altamente significativas, en todas las variables de calidad seminal; tanto a la cero hora, como a las dos horas post-descongelación. El diluyente con 12.0 por ciento de yema de huevo presentó los mejores resultados en motilidad individual progresiva, mientras que el diluyente con surfactante vegetales demostró resultados positivos en el porcentaje de espermatozoides vivos y morfoanomalías totales. El diluyente con 2.0 por ciento presentó los peores resultados.
- Con respecto a los cuatro machos cabríos seleccionados, todos los parámetros de calidad seminal establecidos en esta investigación, estuvieron afectados por la procedencia del semen en ambos tiempos post-descongelación. Los espermatozoides procedentes de los dos machos alpinos francés (por efecto individual cada uno) resistieron mejor el proceso de criopreservación que los procedentes de los dos machos Toggenburg.
- El Tiempo Post-Congelación solo influyo en la motilidad masal, porcentaje de espermatozoide vivos (a las dos horas post-descongelación), en la proporción de morfoanomalías primarias / secundarais (a la cero horas post-congelación) y en la motilidad individual progresiva. No obstante, en todas las otras variables no se encontró diferencias significativas a ningún nivel. Este factor no tiene gran efecto en la calidad del semen, por lo menos a las cero horas post-descongelación.

VI. RECOMENDACIONES

- Efectuar pruebas de diluyentes con adición de surfactantes, como también, con adición de yema de huevo a diferentes porcentajes (altos, medios y bajos). Utilizando técnicas de separación del plasma seminal, su conservación, y posterior adición después de la descongelación.
- Encontrar la técnica más apropiada de lavado seminal (centrifugación), en base al estudio del efecto de la velocidad y el tiempo de centrifugación, como la cantidad de gravedades o revoluciones totales, sobre la viabilidad, motilidad y metabolismo de los espermatozoides.
- El semen congelado con estos diluyentes, deben ser valorados por la integridad acrosomal y la prueba de endósmosis; los cuales son parámetros con mayor correlación a la capacidad fecundante de los espermatozoides.
- Proseguir la evaluación de los diluyentes utilizados en esta investigación, mediante el análisis biológico, con la inseminación artificial (porcentaje de preñez) y fertilizaciones *in vitro* (homólogos o heterólogos).
- A fin de determinar ajustes y relaciones con los diluyentes, utilizar mayor cantidad de colectas y machos por raza.
- Además, aumentar el tiempo de muestreo, tanto en el período post-congelación (30, 60, 90 y 365 días), como el período post-descongelación o incubación (cuatro, seis, ocho, 12 y 24 horas).

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta, J. 2007. Diagnóstico Precoz de Gestación mediante Ultrasonografía Transrectal en la Cabra (en línea). Cotorro, La Habana, Cuba. (CIMAGT). Ciencia y Tecnología Ganadera Vol. 1 No. 1-2, p. 41-47. Consultado 9 jul. 2009. Disponible en: http://bva.fao.cu/pub_doc/CIMAGT/PDF/6.pdf

Alberti, K. 2004. Congelação de Semen Bovino: Novos Enfoques em Meios Diluentes (en línea). Brasil, UNESP. Monografia del Seminários em Reprodução Animal I, Pós-graduação em Medicina Veterinária. Consultado 27 sept. 2008. Disponible en http://br.geocities. com/biotecvet /semi04/ Karina_ Alb erti.pdf

Allende, R.; Arisnabarreta, E.; Echenique, E.; Miles, P., Miquet, P., Musi, D.; Riancho, F. 1977. Manual de Inseminación Artificial. Personal Técnico de la Cooperativa Ltda. de Inseminación Artificial de Venado Tuerto (CIAVT). Buenos Aires, Argentina. Editorial Hemisferio Sur. 16-17 p.

Audesirk, T.; Audesirk, G.; Byers, B. 2003. Biología. La Vida en la Tierra. Sexta Edición. México. Pearson Educación. 724 p

Bernal D., G.; Torres R., B.; Mogollón W., E.; Salazar, P. 2007. Desarrollo de una Técnica Alternativa para la Inseminación Artificial Caprina y Comparación de los Resultados con la Técnica Empleada Tradicionalmente (en línea). Colombia, UCC. Consultado 17 sept. 2008. Disponible en http://bucaramanga.ucc.edu.co/ Biblioteca /archivos/VETERINARIA/VET%20152.pdf

Borque, C.; Vázquez, J.; Simarro M. 1989. Determinación espectrofotométrica de fructosas, ácido cítrico y proteínas totales en eyaculados de pequeños

rumiantes. Fórum Internacional sobre Reproducción Animal. Itsaslur. Bilbao (España): 141-146 p.

Cabrera, F.; González, F.; Batista, M.; Forga, J.; Calero, P.; Gracia, A. 1998. Influencia de la edad y los factores ambientales sobre la producción seminal del macho de la Agrupación Caprina Canaria (variedad Majorera) a lo largo de todo el año. XXIII Jornadas Científicas de la S.E.O.C., 525-528 p.

Chandler, J.; Painter, C.; Adkison, R.; Memon, M.; Hoyt, P. 1988. Semen Quality Characteristics of Dairy Goats (en línea). Louisiana Unites State of America. Journal of Dairy Science Vol. 71, No. 6: 1638-1646 p. Consultado 19 abr. 2009. Disponible en: http://jds.fass.org/cgi/reprint/71/6/1638.pdf

Cole, H.; Cupps, P. 1984. Reproducción de los Animales Domésticos. Tercera Edición. Zaragosa, España. Editorial Acribia, S. A.

Continental Plastic Corp. 2008. Catálogo de Productos para Bovinos y Caprinos (en línea). Diluyentes Concentrados: ONE-STEP™ y TWO-STEP™. Consultado 5 ene. 2008. Disponible en: http://www.continentalplastic.com/bovino.dwt

Contraloría General de la República de Panamá. 2005. Dirección de Estadística y Censo. Censo Agropecuario 2001. Panamá en Cifras. Situación Económica: Producción Pecuaria.

Corteel, J. M. 1976. Variations de la motilité et de la fécondance des spermatozoïdes da bouc. Ann. Zootech. 25 (4): 567-571 p.

Cortés Gallego, S. 2003. Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino (en línea). Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas.

Madrid, España, UCM. Consultado 23 sept. 2008. Disponible en http://www.ucm .es/BUCM/tesis/19972000/X/3/X3050301.pdf

Cortés, S.; Núñez, R.; Vázquez, I. 1993. Capacidad de reacción del espermatozoide de macho cabrío a la prueba de endósmosis. 5° Simposium Internacional Reproducción Animal. Luso (Portugal). Vol. II: 225-230 p.

Cruz Tamayo, A. 2004-a. Evaluación de Semen Ovino y Caprino. Curso de Inseminación Artificial en Ovejas y Cabras. Centro de Selección y Reproducción Caprina. San Luis Potosí, México. 1-12 p.

Cruz Tamayo, A. 2004-b. Evaluación Reproductiva de Sementales. Curso de Inseminación Artificial en Ovejas y Cabras. Centro de Selección y Reproducción Caprina. San Luis Potosí, México. 1-5 p.

Cruz Tamayo, A. 2004-c. Inseminación Artificial en Cabras. Curso de Inseminación Artificial en Ovejas y Cabras. Centro de Selección y Reproducción Caprina. San Luis Potosí, México. 1-12 p.

Cruz Tamayo, A. 2004-d. Preservación de Semen Ovino y Caprino. Curso de Inseminación Artificial en Ovejas y Cabras. Centro de Selección y Reproducción Caprina. San Luis Potosí, México. 1-14 p.

Cueto, M.; Gibbons, A.; Abad, M. 2000. Reproducción en Caprinos (en línea). Grupo de Reproducción. Área de Producción Animal. INTA, EEA Bariloche, Centro Regional Patagonia Norte, Argentina. Consultado 21 ago. 2009. Disponible en: http://produccionovina.com.ar/produccion _caprina/inseminacion_ transferencia _caprino/56-reproduccion.pdf

Daza Andrada, A.; Fernández Martínez, C.; Sánchez López, A. 2004. Ganado Caprino. Producción, Alimentación y Sanidad. Primera Edición. Madrid, España. Editorial Agrícola Española, S.A. 17, 52-55 p.

De Armas, R. 2007. Biotecnología en la Reproducción (diapositiva). Unidad de Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, UP. 65 diapositivas, USB memory, color.

De la Vega, A.; Jorrat, J.; Vitriu, S.; Wilde, O.; Cruz, M. 2007. Efectos de la remoción del plasma seminal sobre la viabilidad del semen caprino luego del proceso de refrigeración en diluyente a base de leche descremada (en línea). Veterinaria Argentina. Volumen XXIII. Consultado 21 ago. 2009. Disponible en: http://www.veterinariargentina.com/res/resumenes240.pdf

Delgadillo Sánchez, J. A. 2005. Inseminación Artificial en Caprinos. Primera Edición. México, D. F. Editorial Trillas, S. A.

Dorado, J.; Rodríguez, I.; Hidalgo, M.; Pérez, C. 2004. Aportaciones a la Crioconservación de Esperma de Macho Cabrío en Nitrógeno Líquido (I y II) (en línea). Madrid-Cádiz, España, UC. Consultado 19 sept. 2008. Disponible en http://www.uco.es/dptos/medicina-cirugia/reproduccion/documentos/abst15.pdf

Dorado, J.; Rodríguez, I.; Hidalgo, M.; Pérez, C.; Corral, S.; Sanz, J.; Sánchez, M. 2003. Estudio del efecto de la estación sobre la calidad del esperma del macho cabrío de raza Florida. XXVIII Jornadas Científicas de la S.E.O.C, 165-167 p.

Dubeibe M., D.; Pinzón B., L. 2006. Comparación de dos diluyentes para el congelamiento de semen caprino de la raza Santandereana (en línea). Santander, Colombia, UCC. Consultado 17 sept. 2008. Disponible en: http:// bucaramanga.ucc.edu.co/Biblioteca/archivos/VETERINARIA/vet%20144.pdf

Durán Ramírez, F. 2007. Manual de Explotación y Reproducción en Caprinos. Primera Edición. Bogotá, Colombia. Grupo Latino Editores.

Eckert, R.; Randall, D.; Augustine, G. 1989. Fisiología Animal. Editorial McGraw-Hill Interamericana: 65-100 p.

Evans, G.; Maxwell WMC. 1990. Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras. Illera, J. Zaragosa, España, Editorial Acribia, S.A.

Fabre-Nys, C. 2003. Le Comportement Sexuel des Caprins: contrôle hormonal et facteurs sociaux. Paris, Francia. INRA Prod. Anim., 13 (1): 11-23 pp.

Frandson, R. D.; Spurgeon, T. L. 1992. Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos. Quinta Edición. México, D.F. Nueva Editorial Interamericana, S. A.; Mc Graw Hill. In. 386-403, 493 p.

Fuse, H.; Kazama, T.; Katayama, T. 1991. Relationship between hypoosmotic swelling test, semen analysis and zona-free hamster ovum test. Arch. Androl. 27: 73-78 p.

Galina, C.; Saltiel, A.; Valencia, J. 1995. Reproducción de los Animales Domésticos. Cuarta Reimpresión. Balderas 95, México, D. F. Editorial Limusa.

Gibbsons, A.; Cueto, M.; Wolff, M. 1993. Inseminación Artificial en la Especie Caprina (en línea). Reproducción & Genética, INTA, EEA Bariloche, Centro Regional Patagonia Norte, Argentina. Consultado 25 sept. 2008. Disponible en http://www.inta.gov.ar/bariloche/info/documentos/animal/reproduc/Ct-235%20Manual% 20IA%20caprina.pdf

Gómez, M.; Migliorisi, A. 2006. Protocolo para la Evaluación de Semen en Rumiantes (en línea). La Plata, Argentina. Cátedra de Reproducción Animal,

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Consultado 7 abr. 2009. Disponible en http://www.fcv.unlp.edu.ar/sitios-catedras/8/material/ProtocoloEval.Semen.pdf

Gutiérrez, A.; Palacios, M.; Jiménez, C.; Ramírez, G. 2006. Agua de Coco Opuntia sp. Leche y sus Combinaciones para Criopreservar Semen Ovino (en línea). España. Universidad de Córdoba. Archivos de Zootecnia. Vol. 55, No. 209: 97-100 p. Consultado 8 jun. 2009. Disponible en: http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/495/49520911.pdf

Hafez, E., 1989. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Trad. L. Ocampo, C. García, H. Sumano. Quinta Edición. Ed. Nueva Editorial Interamericana, Mc Graw Hill.

Hauser, R.; Yavetz, H.; Paz, G.; Homonnai, Z.; Amit, A.; Lessing, J.; Preyser, M.; Yogev, L. 1992. The predictive fertilization value of the hypoosmotic swelling test (HOST) for fresh and cryopreserved sperm. J. Assisted Reprod. Genet. 9(3): 265-270 p.

Hellemann, M.; Jara, T. 1997. Efecto de un surfactante sobre la integridad de espermatozoides ovinos crioconservados (en línea) .Valdivia, Chile. Centro de Inseminación Artificial. Universidad Austral de Chile. Arch. Med.Vet. Vol.29 No.1. Consultado 9 ago. 2009 Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301-732X1997000100019&script=sci_arttext

Hidalgo, C.; Tamargo, C.; Díez, C. 2005. Análisis del Semen Bovino (en línea). Boletín informativo del SERIDA - Nº 2: 39-43 p. Consultado 24 jul. 2009. Disponible en: http://ria.asturias.es/RIA/bitstream/123456789/192/1/analisis%20semen%20bovino.pdf

Hidalgo, M.; Rodríguez, I.; Pérez, C.; Dorado, J.; Sanz, J. y Sánchez, M. 2002. Parámetros Morfométricos de la Cabeza del Espermatozoide de Macho

Cabrío (en línea). España. UCO. XXVII Jornadas Científica y VI Jornada Internacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. 1053-1058 p. Consultado 28 sept. 2009. Disponible en: http://www.uco.es organiza /departamentos/medicina-cirugia/reproduccion /documentos/abst5.pdf

Janett F., Keo S., Bollwein H., Hässig M., Thun R. 2005. Comparison of AndroMed®, Bioxcell® and Triladyl® extender for cryopreservation of bull semen (en línea). Schweiz Arch. Tierheilk. 147: 62 (Abstract, Poster). Consultado 5 ago. 2009. Disponible en: http://www.researchportal.ch/unizh/p5601.htm

Koeslag, J.; Castellano, F.; Salinas, K.; Orozco, L.; Marnolejo, A. 1982. Cabras. Primera Edición. México, D.F. Editorial Trillas, S. A. 41-42, 80p.

Kolb, E.; Gürtler, H.; Ketz, H.; Schöler, L.; Seidel H. 1979. Fisiología Veterinaria. Segunda Edición. Zaragosa, España. Editorial Acribia. Volumen II. 119-120, 744-756 p.

Kozdrowski, R.; Dubiel, A.; Bielas, W.; Dzięcioł, M. 2007. Two Protocols of Cryopreservation of Goat Semen with the Use of Computer-Assisted Semen Analysis System (en línea). Wrocław, Poland. Acta Veterinaria. BRNO, 76: 601-604 p. Consultado 16 may. 2009. Disponible en: http://vfu-www.vfu.cz/acta-vet/ archives/volume76/pdf/200776040601.pdf

Lesur, L. 2004. Manual del Ganado Caprino: una guía paso a paso. Capítulo: Reproducción. Primera Edición. México, D. F. Editorial Trillas, S.A. 26-28 p.

Mann, T. 1964. The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract. Methuen, London.

Mann, J. 1981. Spermatological Investigations in African Dwarf Goats (Capra hircus) kept in Germany. Anim. Res. Develop. 14: 86-100 p.

Martínez, J.; Lima, T.; Perón, N. 1994. Efecto de la tonicidad del diluyente, método de congelación y tamaño de la pastilla en la actividad espermática del semen congelado caprino. Revista Cubana de Reproducción Animal. Habana, Cuba. Volumen 20, No. 2. 19-23 p.

Mateo Rex, E. 1990. Avances en Reproducción Caprina (en línea). Mundo Ganadero. Madrid, España. CIT-INIA. MG Dossier. 41-50 p. Consultado 24 jun. 2009. Disponible en: http://www.mapa.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_MG/MG_1990_9_90_41_51.pdf

Mayén Mena, J. 1989. Explotación Caprina. Primera Edición. México, D. F. Editorial Trillas, S. A. 73-79 p.

Mc Donald, L. E. 1981. Reproducción y Endocrinología Veterinaria. Segunda Edición. México D. F. Nueva Editorial Interamericana, S. A.; Mc Graw Hill.

Medrano, A.; Cabrera, F.; González, F.; Batista, M.; Quesada, E.; Calero, P.; Gracia, A. 2004. ¿La conservación de semen a -150°C es una alternativa viable en caprinos? (en línea). Archivos Latinoamericanos Producción Animal. España. Vol. 12 (Supl. 1): 49-53 p. Consultado 8 may. 2009. Disponible en: https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/7072/1/la04027.pdf

Mela Gómez, M. E. 2006. Efecto del tiempo de Estabilización (refrigeración) y congelación (vapores de nitrógeno) en la calidad espermática del bovino, post-descongelación. Tesis de Licenciatura en Ingeniero Agrónomo Zootecnista. David, Chiriquí, Panamá. F.C.A. Universidad de Panamá.

Mellisho Salas, E.; Gallegos, A. 2006. Manual de Laboratorio de Reproducción Animal (en línea). Lima, Perú, UNALM. Consultado 23 sept. 2008. Disponible en http://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/reproduccion/Pract06.pdf

Mendoza, G.; White, I.; Chow, P. 1989. Studies on Chemical Components of Angora Goat Seminal Plasma. Theriogenology. 32 (3): 455-466 p.

Minitüb, 2007. Animal Reproduction Technology, Small Ruminants (en línea). Simmet, Ch., Managing Director. Deutschland. Consultado 7 jun. 2009. Disponible en: http://www.minitube.de/downloads/kataloge/small_ruminants_en.pdf

Morón Cedillo, F. 2004. Evaluación Reproductiva Del Macho (diapositivas). Facultad de Agronomía. UASLP. 31 diapositivas, USB memory, color

Nunes, J. F. 1993. "El agua de coco como dilutor del semen caprino". Revista Científica. FCV-LUZ III (3): 269-272

Nunes, J.; Pérez, D. 2001. Biotécnicas de Reproducción Caprina y Ovina. Primera Edición, Brasil. 2M Ltda.

Ortiz Chávez, F. 2004. Biotecnología Reproductiva en Ovinos y Caprinos (diapositivas). Servicios Veterinarios Integrales, Unidad Móvil de Procesamiento de Semen y Embriones, México. 40 diapositivas, USB memory, color.

Oyeyemi, M.; Akusu, M.; Ola-Davies, O. 2000. Effect of successive ejaculations on the spermiogram of West African dwarf goats (Capra hircus L.) (en línea). Nigeria. Department of Veterinary Surgery and Reproduction, University of Ibadan, Veterinarski Arhiv 70 (4), 215-221. Consultado 2 agos. 2009. Disponible en: http://www.vef.hr/vetarhiv/papers/70-4/oyeyemi.pdf

Palma, G; Brem, G. 2001. Biotecnología de la Reproducción. Primera Edición. Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Palomino T., L.; Camacho S., J.; Huanca L, W.; Falcón P., N. 2001. Conservación de Semen Caprino en los Dilutores Citrato-Yema y Leche-Descremada Yema (en línea). Rev. Inv. Vet. Perú. Vol. 12 (1). Consultado 27 sept. 2008. Disponible en http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/veterinaria /v12_n1/conser_semen.htm

Palomino, J. M.; Cervantes, M.; Rodríguez, A.; Cisneros, F.; Huanca, W. 2007. Efecto de dos dilutores y tiempos de refrigeración sobre la motilidad individual de semen refrigerado de caprinos (en línea). Perú, UNSCH y UNMSM. Consultado 19 sept. 2008. Disponible en http://www.Produccionbovina.com/ produccion_caprina/inseminacion_transferencia_caprino/22-PalominoSemen Caprino.pdf

Pérez, B. 1992. Estudios de los Parámetros de Valoración del Rendimiento Reproductivo en el Macho Cabrío de las Razas Verata y Malagueña. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid: 196 p.

Pérez, B.; Mateos, E. 1996. Congelación de Semen en Ganado Caprino (en línea). Caprino Genética. Madrid, España. Área Reproducción Animal. CIT-INIA. Mundo Ganadero. N°74. 66-69 p. Consultado 15 jun. 2009. Disponible en: http://www.mapa.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_MG/MG_1996_74_66 _69.pdf

Pezzone, N. 2008. Examen de la Calidad del Semen para su Uso en Inseminación Artificial (en Línea). LatinPedia. Santa Fe, Argentina. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral. Consultado 17 ago. 2009. Disponible en: http://www.latinpedia.net/Ciencia/animal/Examen-de-la-calidad-del-semen-para-su-uso-en-inseminacion-artificial-ad498.htm

Quittet, E. 1986. La Reproducción: en la cabra. Guía práctica para el ganadero. Edición Mundi-prensa: 171-184 p.

Ritar, J.; Salamon, S. 1982. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. Aust. J. Biol. Sci. 35 (3). 305-312 p.

Rocas, J.; Martínez, E.; Vásquez, J.; Ruíz, S.; Coy, P. 1991. Influencia de la Edad sobre los Parámetros Reproductivos de Machos Cabríos de Raza Murciano-Granadina (en línea). España. Universidad de Murcia. Archivos Zootécnicos 40: 173-179 p. Consultado 13 sep. 2009. Disponible en: http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/13_19_04_147_7.pdf

Salamon, S.; Maxwell W. 1995. Frozen Storege of Ram Semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Anim. Reprod. Sci. 37: 185-249 p.

Salisbury, G.; Van Dermark, N.; Lodge, J. 1978. Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los Bóvidos. Segunda Edición. Zaragosa, España. Editorial Acribia.

Samaniego Martínez, N. 2006. Evaluación de Tres Diluyentes para la Criopreservación de Espermatozoides de Semen Bovino. Tesis de Licenciatura en Ingeniero Agrónomo Zootecnista. Panamá. FCA, Universidad de Panamá.

Santana. B., A.; Cisneros, B. 2005. Congelación de Semen Caprino. Cerro Azul, Panamá, Centro de Investigación de Criobiología, FCNE, UP. 2,9 p.

Santillana, A.; García, A. 2003. Estudio Comparativo de Dos Diluyentes para el Procesamiento en Congelado de Semen de Pelibuey (en línea). Puebla, México. Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla. Consultado 15 jul. 2009. Disponible en: http://www.exopol.com/seoc/docs/vzq5536o.pdf

Sato, K.; Mori, J.; Hiroshi, M.; Tsuyoshi, T., Shigen, K.; Makoto, K.; Norio, S. 1992. Artificial Insemination Manual for Cattle. Association of Livestock Technology.

Sisson, S.; Grossman, J. D. 1977. Anatomía de los Animales Domésticos. Cuarta Edición. Mallorca, Barcelona, España. Salvat Editores, S. V.

Smith, M.; Sherman, D. 1994. Goat Medicine. Editorial Williams & Wilkins.

Sorensen, A. M. 1982. Producción Animal, Principios y Prácticas. Primera Edición. México, D. F., Mc Graw Hill.

Sosa Madrid, B. 2009. Procedimiento de Calibración para Espectrofotómetro. Santiago, Veraguas, Panamá. Trabajo Experimental N°3. Centro Nacional Caprino de Reproducción Asistida (CENCRA).

Tabernero M., J. 2006. Explotación de Ganado Caprino. Tercera Edición. España, Junta de Castilla y León, Consejería de Agricultura y Ganadería, Colección Mundo Rural.

Tehuitzil, M.; Rodríguez, M.; Melgarejo, B.; Rodríguez, G.; Domínguez, H. 2004. Evaluación del Comportamiento Reproductivo en Machos Caprinos de la Raza Boer (en línea). Michoacán, México. XXVIII Congreso Nacional de Buiatría. UNAM. Consultado 11 sep. 2009. Disponible en: http://ammveb.net/XXVIII% 20CNB/memorias/pequenos_rumiantes/peqrum14.doc.

Theau-Clement, M.; Lattaioli, P.; Roustan, A.; Castellini, C. 1996. Reliability and Accuracy of a Computerized Semen Image Analyses to Evaluate Various Biological Parameters in Rabbit Semen. World Rabbit Congress. Toulouse, 2: 133 p.

Urrego, R.; Ríos, A.; Olivera, M.; Camargo, O. 2008. Efecto de la Centrifugación sobre la Membrana Plasmática y el ADN de Espermatozoides Bovinos (en línea). Medellín, Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias; N° 21:19-26. Consultado 5 ago. 2009. Disponible en: http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v21n1/v21n1a03.pdf

Urroz Madrigal; C. 2000. Elementos de Anatomía y Fisiología Animal. Primera Edición. San José, Costa Rica. Editorial Universidad Estatal a Distancia.

Vázquez, I.; Cortés, S.; Borque, C. 1998. Conservación del Semen de Macho Cabrío (en línea). Madrid, España. Dpto. Reproducción Animal, I.N.I.A. Producción Ovina y Caprina. XXIII: Ponencia 2: 31-36 p. Consultado 17 jul. 2009. Disponible en: http://www.exopol.com/seoc/docs/i7rgovfe.pdf

Vera, T. 2006. Evaluación sobre la viabilidad y fertilidad de espermatozoides caprinos congelados con diluyente sin proteína animal y el agregado de plasma seminal pos-descongelado (en línea). Tesis Nivel M.Sci .Argentina, INTA. Consultado en 21 sept. 2007 Disponible en www.inta.gov.ar/balcarce/ResumenesPG/PGPA2006/ResumenTOMASVERA.doc

Vera, T., Alberio, R., Hozbor, F., Sánchez, E., Aguilar, D. y Aller, J. 2007-a. Viabilidad pos-descongelación de espermatozoides caprinos congelados con diferentes diluyentes (en línea). Balcarce, Argentina, INTA EEA. 30° Congreso Argentino de Producción Animal. Revista Argentina de Producción Animal Vol. 27 Supl. 1. Consultado 25 sept. 2007. Disponible en http://www.aapa.org.ar/congresos/2007/RfPDF/RF19.pdf

Vera, T., Alberio, R., Hozbor, F., Sánchez, E., Aguilar, D. y Aller, J. 2007-b. Efecto del agregado de plasma seminal pos-descongelación sobre la viabilidad de espermatozoides caprinos (en línea). Balcarce, Argentina, INTA EEA. 30° Congreso Argentino De Producción Animal. Revista Argentina de Producción

Animal Vol. 27 Supl. 1. Consultado 24 jul. 2009. Disponible en: http://www.aapa.org.ar/congresos/2007/RfPDF/RF20.pdf

Way, A.; Henault, M.; Killian, G. 1995. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa". Theriogenology. 42: 1301-1316 p.

Wilkinson, J.; Stark, B. 1989. Commercial Goat Production. Primera Edición. Oxford, England. Editorial Acribia, S. A. (España).

Wittke, G. 1978. Fisiología de los Animales Domésticos. Primera Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Hemisferio Sur. 141-142 p.

Wood, D. 1974. Fisiología Animal. Segunda Edición. León, España. Editorial Acribia, S. A.

Zarazaga, L. Guerrero, J. 2008. Inseminación Artificial en Caprinos. Capitulo 3: Inseminación Artificial: Recolección y Conservación del Semen (en línea). México. Revista Acontecer Ovino –Caprino. Editor: Castañeda, M. Consultado 21 sept. 2008. Disponible en http://www.edicionespecuarias.com.mx/.../ ovino_ caprino/2008/39/pohCEInseminaci%F3n%20Artificial%20en%20Caprinos.pdf

ANEXOS

FIGURA 1. DILUYENTES COMERCIALES

FIGURA 2. CENTRIFUGACIÓN Y EQUILIBRACIÓN

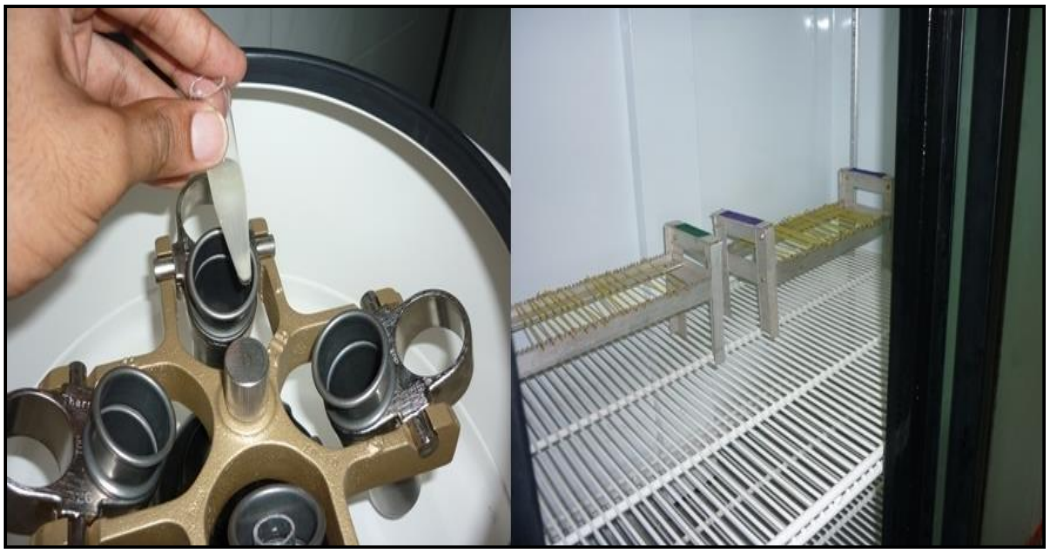


FIGURA 3. VAPORES DE NITROGENO Y DESCONGELACIÓN (BAÑO MARÍA)

FIGURA 4. MUESTREO Y TOMA DE DATOS

Curva de Concentración de Semen por Espectrofotómetro a 540 nm.

Fecha: 24/Julio/2009

Est. Ing. Bolívar Samuel Sosa Madrid

Ecuación de Regresión:

b = 19209
a = 1606
r = 0.934

Datos de las Muestras:

N°	%T	Absorción (x)	Concentración Espermática (x 10^6) (y)
1	100	0.000	1600
2	78.8	0.104	3000
3	89.5	0.048	2400
4	50.9	0.294	7320
5	60.5	0.205	5600
6	88.1	0.055	1860
7	77.5	0.111	3060
8	72.2	0.142	3360
9	92.4	0.034	2840
10	82.8	0.082	3720
11	96.1	0.017	2250
12	98.2	0.008	2400
13	89.4	0.049	3130
14	48.2	0.317	7020
15	83.8	0.077	2310
16	55.5	0.256	5650
17	32.1	0.494	12000
18	65.4	0.185	5760
19	73.7	0.133	4640
20	80.9	0.092	4140

%T	Concentración Espermática (millones/ml)
100	1606
99	1683
98	1779
97	1856
96	1952
95	2059
94	2125
93	2221
92	2298
91	2394
90	2490
89	2586
88	2682
87	2758
86	2874
85	2970
84	3066
83	3162
82	3258
81	3374
80	3469
79	3565
78	3681
77	3796
76	3892
75	4007
74	4122
73	4238
72	4353
71	4468
70	4583
69	4699
68	4833
67	4948
66	5083
65	5198
64	5332
63	5467
62	5605
61	5736
60	5870
59	6005
58	6158
57	6293
56	6447
55	6600
54	6754
53	6908
52	7061
51	7234
50	7388

COMPARACIONES DE MEDIAS POR TUKEY

Cuadro I. Motilidad Masal y Macho Cabrío (0 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Macho
A	1.9685	3
BA	1.9137	1
B	1.8541	4
C	1.7385	2

Cuadro II. Motilidad Masal y Macho Cabrío (2 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Macho
A	1.3396	3
BA	1.2782	1
B	1.2315	4
C	1.0593	2

Cuadro III. Motilidad Individual Progresiva y Macho Cabrío (0 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Macho
A	43.3889	3
B	42.0963	1
C	40.8481	4
D	38.9111	2

Cuadro IV. Motilidad Individual Progresiva y Macho Cabrío (2 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Macho
A	28.8667	3
B	27.2296	1
B	26.6148	4
C	24.0667	2

Cuadro V. Espermatozoides Vivos y Macho Cabrío (0 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Macho
A	49.2333	3
A	48.2778	1
BA	47.4778	4
B	45.6556	2

Cuadro VI. Espermatozoides Vivos y Macho Cabrío (2 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Macho
A	35.2556	3
B	33.3926	1
B	33.2778	4
C	30.8444	2

Cuadro VII. Morfoanomalías Totales y Macho Cabrío (0 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Macho
A	22.5296	2
B	19.1444	4
B	17.5889	1
B	17.0333	3

Cuadro VIII. Morfoanomalías Totales y Macho Cabrío (2 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Macho
A	25.1815	2
B	22.0667	4
CB	19.7889	1
C	18.4074	3

Cuadro IX. Morfoanomalías Primarias y Macho Cabrío (0 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Macho
A	57.296	2
A	54.370	4
BA	50.370	1
B	46.593	3

Cuadro X. Morfoanomalías Primarias y Macho Cabrío (2 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Macho
A	57.667	2
BA	53.185	4
BA	49.852	1
B	46.926	3

Cuadro XI. Morfoanomalías Secundarias y Macho Cabrío (0 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Macho
A	54.407	3
BA	49.630	1
B	45.630	4
B	42.704	2

Cuadro XII. Morfoanomalías Secundarias y Macho Cabrío (2 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Macho
A	53.074	3
BA	50.148	1
BA	46.815	4
B	42.333	2

Cuadro XIII. Motilidad Masal y Diluyente (0 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Diluyente
A	1.9881	2
A	1.9722	3
B	1.6458	1

Cuadro XIV. Motilidad Masal y Diluyente (2 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Diluyente
A	1.3497	2
A	1.3058	3
B	1.0258	1

Cuadro XV. Motilidad Individual Progresiva y Diluyente (0 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Diluyente
A	46.4333	2
B	42.2639	3
C	35.2361	1

Cuadro XVI. Motilidad Individual Progresiva y Diluyente (2 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Diluyente
A	31.1194	2
B	26.3139	3
C	22.6500	1

Cuadro XVII. Espermatozoides Vivos y Diluyente (0 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Diluyente
A	52.8194	3
B	47.7778	2
C	42.3861	1

Cuadro XVIII. Espermatozoides Vivos y Diluyente (2 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Diluyente
A	37.3917	3
B	33.8611	2
C	28.3250	1

Cuadro XIX. Morfoanomalías Totales y Diluyente (0 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Diluyente
A	21.5556	2
A	19.6972	1
B	15.9694	3

Cuadro XX. Morfoanomalías Totales y Diluyente (2 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Diluyente
A	23.3278	2
A	22.4444	1
B	18.3111	3

Cuadro XXI. Morfoanomalías Primarias y Diluyente (0 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Diluyente
A	58.667	1
B	51.500	3
B	45.556	2

Cuadro XXII. Morfoanomalías Primarias y Diluyente (2 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Diluyente
A	58.444	1
BA	52.028	3
B	45.250	2

Cuadro XXIII. Morfoanomalías Secundarias y Diluyente (0 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Diluyente
A	54.444	2
A	48.500	3
B	41.333	1

Cuadro XXIV. Morfoanomalías Secundarias y Diluyente (2 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Diluyente
A	54.750	2
BA	47.972	3
B	41.556	1

Cuadro XXV. Motilidad Masal y Tiempo PostCong. (0 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Tiempo PC
A	1.9147	3
A	1.9069	2
B	1.7844	1

Cuadro XXVI. Motilidad Masal y Tiempo PostCong. (2 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Tiempo PC
A	1.3386	2
B	1.2272	3
C	1.1156	1

Cuadro XXVII. Motilidad Individual Progresiva y Tiempo PostCong. (0 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Tiempo PC
A	41.8139	2
A	41.7833	3
A	40.3361	1

Cuadro XXVIII. Motilidad Individual Progresiva y Tiempo PostCong. (2 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Tiempo PC
A	27.8111	2
BA	26.6611	3
B	25.6111	1

Cuadro XXIX. Espermatozoides Vivos y Tiempo PostCong. (0 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Tiempo PC
A	48.3083	3
A	48.2222	2
A	46.4528	1

Cuadro XXX. Espermatozoides Vivos y Tiempo PostCong. (2 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Tiempo PC
A	34.1639	2
A	33.9667	3
B	31.4472	1

Cuadro XXXI. Morfoanomalías Totales y Tiempo PostCong. (0 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Tiempo PC
A	19.6056	3
A	19.1639	2
A	18.4528	1

Cuadro XXXII. Morfoanomalías Totales y Tiempo PostCong. (2 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Tiempo PC
A	21.6139	3
A	21.2889	2
A	21.1806	1

Cuadro XXXIII. Morfoanomalías Primarias y Tiempo PostCong. (0 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Tiempo PC
A	55.833	1
A	53.833	2
B	46.0556	3

Cuadro XXXIV. Morfoanomalías Primarias y Tiempo PostCong. (2 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Tiempo PC
A	56.000	1
BA	51.000	2
B	48.722	3

Cuadro XXXV. Morfoanomalías Secundarias y Tiempo PostCong. (0 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Tiempo PC
A	53.944	3
B	46.167	2
B	44.167	1

Cuadro XXXVI. Morfoanomalías Secundarias y Tiempo PostCong. (2 hrs. PDC)

Grupo/Tukey	Media	Tiempo PC
A	51.278	3
BA	49.000	2
B	44.000	1