

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

PROGRAMA DE DOCTORADO DE CLÍNICA E INVESTIGACIÓN

TERAPÉUTICA. DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN

ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

TESIS DOCTORAL

**APORTACIONES TECNOLÓGICAS EN LA
PRESERVACIÓN DEL SEMEN EN LA RAZA
CAPRINA MAJORERA**

**TARA NIÑO GONZÁLEZ
LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

2013

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL,
BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS. UNIVERSIDAD DE
LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

D. MIGUEL BATISTA ARTEAGA, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD,
DOCTOR EN VETERINARIA Y ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE
PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE
GRAN CANARIA

INFORMA:

Que D^a TARA NIÑO GONZÁLEZ, licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo mi
dirección el presente trabajo titulado **“Aportaciones tecnológicas en la
preservación del semen en la raza caprina Majorera”** y considero que reúne las
condiciones y calidad científica necesarias para optar al grado de Doctor en
Veterinaria por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

La Doctoranda

El Director

Fdo. Tara Niño González

Fdo. Miguel Batista Arteaga

Las Palmas de Gran Canaria, a 26 de abril de 2013

El presente trabajo es una compilación de los siguientes artículos publicados en diferentes revistas científicas:

- Batista M, Niño T, Álamo D, Castro N, Santana M, González F, Cabrera F, Gracia A (2009): Successful artificial insemination using semen frozen and stored in an ultrafreezer in the Majorera goat breed. *Theriogenology* 71: 1307-1315.
- Batista M, Niño T, Álamo D, Castro N, Santana M, González F, Cabrera F, Gracia A (2011): Influence of the preservation temperature (37°C, 20°C, 4°C, - 196°C) and the mixing of semen over sperm quality of Majorera bucks. *Reproduction in Domestic Animals* 46: 281-286.
- Batista M, Santana M, Niño T, Álamo D, Cabrera F, González F, Gracia A (2012): Sperm viability of canine and caprine semen samples preserved in a dry shipper. *Animal Reproduction Science* 130: 105-110.

AGRADECIMIENTOS

La verdad es que la realización de esta tesis doctoral ha sido un proceso tan largo, que por el camino han pasado muchísimas personas a las que agradecerles su colaboración.

A nivel académico debo agradecer a todos los integrantes de mi equipo de trabajo, empezando por mi director de tesis, el Dr. Miguel Batista Arteaga con el que he compartido risas y lágrimas y al que siempre veré como mi mentor y llamaré “Jefe”, siempre te queda mi respeto y gratitud. A los doctores Anselmo Gracia, Fernando González, Fernando Cabrera, Desirée Álamo y Melania Santana, agradecerles tanta (tanta, tanta) ayuda y apoyo moral. No debo nunca olvidarme de los amigos de Producción Animal y su política del “yo te ayudo y tú me ayudas”, Tacho, Noemí, Baifo, Lorenzo, Isa y Davinia, en muchos momentos he sentido que éramos un único departamento, y esa forma de trabajar ha sido muy agradable.

Trabajar con animales conlleva siempre unas tareas extras, como es cuidar de su bienestar. Gracias a todas esas personas que cuidaron este aspecto para que, personas como yo, podamos llevar a cabo trabajos como éste. Ese apoyo logístico debo agradecerlo a todo el personal de granja (incluidos los jubilados): Antonio, Juan (él lleva aquí mas años que nadie), Rosario, Luis, Pino, Serafín, Bernardo, Primi y Lourdes. Que no me olvide yo de “Ventu” y “Santi”, que además de ayudarme a “tirarle besitos a los machos” han llegado a convertirse en buenos amigos con los que se puede contar. Nuria y Ricardo, que me han llevado de la manita por toda la burocracia que implica hacer una tesina y una tesis, no dejando nunca que se me pase un plazo, gracias. Y, como no, a Manolo Ruiz, o “Manolo el de Correos”, que me proporcionó la materia prima, los machos cabríos usados en el estudio

A nivel personal, han sido muchas las personas que han aguantado mis historias y mis desahogos, empezando por mis padres Luis y Ada, mi hermana Silvia y mi supernovio Simón, que me han aguantado nerviosismos, malos humores y estreses. Gracias. A mi familia política Túbal, Lupe, Pedro José, Mari, Fran, Marisa, Inma y Rosa María. A mis “tíos de Sardina”, tíos de verdad, primos y abuelitas (son tantísimos que si los nombro a todos, ocupa más los agradecimientos que el resto de la tesis) muchísimas gracias, de verdad. A ese grupo de grandes amigos, personas que están ahí, que no te juzgan y te apoyan y sujetan en la vida real, a esos con los que se comparten momentos buenos, divertidos y relajados, zenkiu. A Patry, Nuri y Carmencita, que han sido un apoyo especial. A Dácil por la portada y a Dani por sus correcciones. Y a todas esas personas que directa o indirectamente han colaborado en la realización de esta tesis doctoral.

Y una vez terminada y defendida esta tesis, VÄMONOS A CELEBRARLO!!!

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. <u>Anatomía del aparato reproductor masculino en la especie caprina</u>	7
2.1.1. Testículos y escroto.....	7
2.1.2. Epidídimo y conducto deferente.....	8
2.1.3. Cordón espermático.....	9
2.1.4. Glándulas accesorias.....	9
2.1.5. Genitales externos.....	11
2.2. <u>Gametogénesis en el macho cabrío</u>	12
2.2.1. Espermatogénesis.....	12
2.2.1.1. Fases de la espermatogénesis.....	13
2.2.2. Morfología del espermatozoide.....	14
2.2.3. Transporte del semen.....	15
2.3. <u>Producción seminal en el macho cabrío</u>	16
2.3.1. Métodos y frecuencia de recogida.....	16
2.3.1.1. Métodos de extracción seminal.....	16
2.3.1.2. Frecuencia de recogida.....	18
2.3.2. Factores que pueden influir sobre la producción seminal.....	19
2.3.2.1. Edad de los machos.....	19
2.3.2.2. Alimentación.....	19
2.3.2.3. Individuo y raza.....	20
2.3.2.4. Variación estacional de actividad reproductiva.....	20
2.3.3. Características del semen en la especie caprina.....	21
2.3.3.1. Características macroscópicas.....	21
2.3.3.2. Características microscópicas.....	22
2.3.3.3. Características bioquímicas.....	26
2.4. <u>Diluyentes seminales</u>	28
2.4.1. Componentes básicos de un diluyente.....	28
2.4.1.1. Fuentes de energía.....	28
2.4.1.2. Soluciones tampones y electrolitos.....	29
2.4.1.3. Estabilizadores de membrana.....	29
2.4.1.4. Antibióticos.....	30
2.4.1.5. Agua.....	30
2.4.2. Clasificación de los diluyentes.....	31
2.4.2.1. Diluyentes naturales.....	31
2.4.2.2. Diluyentes sintéticos.....	31
2.5. <u>Conservación del semen caprino</u>	32
2.5.1. Semen fresco.....	32
2.5.2. Semen refrigerado.....	33
2.5.3. Semen congelado.....	34
2.5.3.1. Contrastación y selección de eyaculados.....	34
2.5.3.2. Proceso y tasa de dilución.....	34
2.5.3.3. Período de equilibrado.....	35
2.5.3.4. Métodos de envasado.....	36
2.5.3.5. Congelación en nitrógeno líquido.....	37

2.5.3.6. <u>Congelación en ultracongeladores</u>	38
2.5.3.7. <u>Transporte de semen congelado</u>	39
2.5.4. Descongelación y contrastación seminal post-descongelación	40
2.5.4.1. <u>Procedimiento</u>	40
2.5.4.2. <u>Contrastación del semen congelado-descongelado</u>	40
2.6. Anatomía del aparato reproductor femenino en la especie caprina	42
2.6.1. Ovarios y oviducto	42
2.6.2. Útero	42
2.6.3. Cuello uterino	43
2.6.4. Vagina	43
2.6.5. Genitales externos	43
2.7. El ciclo estral de la cabra	44
2.7.1. Estacionalidad	44
2.7.2. Pubertad	45
2.7.3. Ciclo estral	45
2.7.3.1. <u>Estro</u>	46
2.7.3.2. <u>Fase folicular</u>	47
2.7.3.3. <u>Fase luteal</u>	47
2.8. Tratamientos de inducción del celo y ovulación en la especie caprina	48
2.8.1. Inducción del estro con ovulación	48
2.8.1.1. <u>Inducción del estro con ovulación mediante el efecto macho</u>	48
2.8.1.2. <u>Inducción del estro con ovulación mediante control del fotoperiodo</u>	49
2.8.1.3. <u>Inducción del estro con ovulación mediante tratamientos hormonales</u>	50
2.8.2. Sincronización del estro con ovulación	51
2.8.2.1. <u>Sincronización del estro con ovulación utilizando progestágenos</u>	51
2.8.2.2. <u>Sincronización del estro con ovulación utilizando prostaglandinas F_{2α}</u>	52
2.9. Gestación y su diagnóstico en la cabra	53
2.9.1. Fisiología de la gestación	53
2.9.1.1. <u>Progestación</u>	53
2.9.2. Endocrinología de la gestación	54
2.9.2.1. <u>Progesterona</u>	54
2.9.2.2. <u>Estrógenos</u>	55
2.9.2.3. <u>Lactógenos placentarios</u>	55
2.9.2.4. <u>Prolactina</u>	55
2.9.3. Métodos de diagnóstico de gestación	56
2.9.3.1. <u>Métodos clínicos</u>	57
2.9.3.2. <u>Métodos laboratoriales</u>	60
2.10. Inseminación artificial en la especie caprina	63
2.10.1. Aplicaciones, ventajas y desventajas de la inseminación artificial	63
2.10.2. Momento óptimo de inseminación	64
2.10.3. Técnicas de inseminación artificial	65
2.10.3.1. <u>Inseminación intravaginal</u>	65
2.10.3.2. <u>Inseminación pericervical</u>	65
2.10.3.3. <u>Inseminación cervical profunda</u>	66
2.10.3.4. <u>Inseminación intrauterina por laparoscopia</u>	66

3. MATERIAL Y MÉTODOS (GENERAL)	68
3.1. Valoración de la calidad seminal <i>in vitro</i>	69
3.1.1. Animales	69
3.1.2. Alojamiento, alimentación y plan sanitario	69
3.1.3. Recogida seminal	71
3.1.4. Contrastación seminal	72
3.1.4.1. Pruebas macroscópicas	72
3.1.4.2. Pruebas microscópicas	72
3.1.5. Procedimientos de diluyococonservación seminal	76
3.1.5.1. Lavado	76
3.1.5.2. Dilución	77
3.1.5.3. Equilibrado	78
3.1.6. Protocolos de congelación y conservación seminal	79
3.1.7. Descongelación y valoración de la calidad seminal post-descongelación	79
3.2. Sincronización del celo, inseminación artificial y tasa de fertilidad	81
3.2.1. Animales	81
3.2.2. Tratamiento de inducción y sincronización del celo y la ovulación	81
3.2.3. Momento y procedimiento de la inseminación artificial	82
3.2.4. Preparación de las dosis de inseminación artificial	83
3.2.5. Diagnóstico de gestación	84
3.2.6. Parto, fertilidad y prolificidad	84
4. EXPERIENCIAS	86
4.1. Experiencia I: Utilización de los ultracongeladores de -152°C para la preservación del semen en la especie caprina: resultados <i>in vitro</i> y fertilidad tras inseminación artificial	88
4.1.1. Introducción	88
4.1.2. Material y métodos	90
4.1.2.1. Experimento 1	90
I. Animales	90
II. Diseño experimental	90
III. Recogida y evaluación seminal	90
IV. Procesado seminal	91
V. Congelación y descongelación seminal	92
4.1.2.2. Experimento 2	93
I. Animales	93
II. Sincronización del celo y ovulación. Detección de celos	93
III. Diseño experimental e inseminación artificial	94
IV. Diagnostico de gestación y tasas de fertilidad	95
4.1.2.3. Análisis estadístico	95
4.1.3. Resultados	98
4.1.4. Discusión	104

4.2. Experiencia II: Influencia de la temperatura de conservación (37, 20, 4, -196°C) y del pool seminal en la calidad espermática de los machos cabríos de raza Majorera	109
4.2.1. Introducción	110
4.2.2. Material y métodos	111
4.2.2.1. Experimento I	111
I. Animales	111
II. Diseño experimental	111
III. Recogida y valoración espermática	112
IV. Procesado seminal: congelación y descongelación	112
4.2.2.2. Experimento II	114
I. Animales	114
II. Diseño experimental	114
III. Sincronización y detección de celos	114
IV. Inseminación artificial, diagnóstico de gestación y fertilidad	115
4.2.2.3. Análisis estadístico	116
4.2.3. Resultados	119
4.2.4. Discusión	126
4.3. Experiencia III: Viabilidad espermática en muestras de semen caprino conservadas en un contenedor de transporte (vapores de nitrógeno líquido)	130
4.3.1. Introducción	131
4.3.2. Material y métodos	132
4.3.2.1. Animales	132
4.3.2.2. Recogida seminal	132
4.3.2.3. Evaluación y procesado seminal	132
4.3.2.4. Congelación seminal, almacenamiento y descongelación	133
4.3.2.5. Características del contenedor del transporte seco	134
4.3.2.6. Análisis estadístico	135
4.3.3. Resultados	137
4.3.4. Discusión	140
5. CONCLUSIONES	143
6. RESUMEN	146
7. ABSTRACT	150
8. BIBLIOGRAFÍA	153

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La especie caprina en Canarias representa uno de los principales sectores en la ganadería del archipiélago, con una importante transcendencia cultural, social y económica. En el año 2007, la cabaña caprina en Canarias ascendía a más de 363000 cabezas de ganado, representando el 29% de la carne y el 70% de la leche producida en el archipiélago.

El ganado caprino existente en las Islas Canarias está representado en su mayoría por las tres razas autóctonas, que antiguamente conformaban la Asociación Caprina Canaria (ACC). Dichas razas son la Majorera, la Tinerfeña y la Palmera. Concretamente, los animales de la raza caprina Majorera destacan por su marcado carácter lechero, de alto rendimiento, su gran rusticidad y elevada adaptabilidad a zonas áridas y desfavorecidas. Estas cualidades permitirían que estos animales pudiesen ser catalogados como raza mejorante, circunstancia que confiere a esta raza, la posibilidad de favorecer las capacidades productivas de diversas razas criollas caprinas, presentes en diferentes zonas del mundo con características ambientales extremas, como ocurre en muchas zonas del continente africano y centroamericano.

Desde el punto de vista reproductivo, la cabra Majorera se caracteriza por presentar ciclos estrales de 21 días. Los celos suelen tener una duración media de 40 horas, obteniéndose 1.3 partos al año y presenta una prolificidad media de 1.8 cabritos por parto (Batista y cols., 1999). Aunque no se ha concretado de manera estricta, la duración de la gestación en la raza Majorera no debería encontrarse lejos de la duración media (150.8 días) registrada en la especie caprina (Asdell, 1964). De manera general, se asume que la mayoría de los partos acontecen en un rango de 147 a 155 días de gestación, aunque se han descrito ligeras diferencias en función de la raza, mes de concepción, edad del animal, número de partos del animal y número de cabritos/hembra gestante (Peaker, 1978).

En las últimas décadas, las técnicas reproductivas en el ganado caprino han experimentado un notable desarrollo, teniendo como resultado más práctico y directo, un aumento en el rendimiento productivo. Entre otros, cabe destacar los avances que se han logrado en el campo de la tecnología seminal, con novedosas y eficaces técnicas de conservación, criopreservación y traslado de semen de la raza caprina. Del mismo modo, tienen

una gran importancia los avances que se han llevado a cabo en torno a las nuevas técnicas de reproducción asistida, destacando sobre todo los diferentes protocolos de inseminación artificial y transferencia de embriones.

La conservación (a corto, medio y largo plazo) de semen de macho cabrío, de una forma eficaz y sin que pierda sus cualidades, aporta diversas ventajas frente a la monta natural. Por una parte, la dilución y conservación de dosis seminales permite que un mayor número de hembras puedan ser inseminadas de forma artificial, en un mismo día o período, en comparación a si se hiciese de forma natural, sin temor a que los machos queden agotados. De esta manera, se podrán sincronizar más eficazmente los celos de las hembras y concentrar de esta forma el trabajo de granja; en consecuencia, se favorecería un manejo más racional del periodo de cubriciones (inseminaciones artificiales), permitiendo una mayor agrupación de los partos, facilitando así el trabajo en las explotaciones durante la época de los nacimientos.

Asimismo, con las nuevas técnicas de inseminación artificial se puede hacer un mejor seguimiento de la paternidad, pudiendo hacer cruzamientos concretos, minimizando el margen de error. De esta forma, se limitarían los problemas asociados a la monta natural que manifiestan numerosas granjas, donde un número variable de machos son utilizados para cubrir a las hembras, siendo frecuente desconocer qué hembra ha sido cubierta por un determinado macho.

Otra evidente ventaja asociada con los procedimientos de tecnología seminal, es la posibilidad de crear una reserva o banco de esperma de las diferentes razas caprinas, como se viene haciendo, desde hace muchos años, en el ganado vacuno. La creación de este banco o reserva de esperma nos permite, con un menor número de machos reproductores con eyaculados de buena calidad, obtener un gran número de dosis seminales, que no necesariamente se deberían utilizar para realizar inseminaciones artificiales de manera inmediata, sino que podrían ser destinadas para su conservación a largo plazo. En consecuencia, estos avances incorporan la ventaja de permitir un movimiento de material genético (tanto en el tiempo y en el espacio) de forma independiente al transporte de animales, tarea esta última, a veces complicada y otras veces imposible, por causas como pueden ser la orografía, enfermedades endémicas de cada lugar o restricciones aduaneras.

La criopreservación seminal, base en la selección y mejora genética, permite que a partir del mismo macho mejorante, se pueda obtener una primera generación de una manera más rápida y numerosa, lo que se traduce en una mejora genética del ganado en un plazo más breve y de manera más efectiva. Además, de un macho reproductor seleccionado se puede seguir generando descendencia, incluso tiempo después de muerto el animal. Con respecto a la dispersión genética en el espacio, podemos destacar que, de esta manera, el material genético se puede transportar de una forma más rápida, cómoda y eficaz que teniendo que transportar animales vivos.

En consecuencia, el trabajo de investigación que constituye la presente tesis doctoral ha propuesto testar diferentes técnicas de preservación seminal, con objeto de incrementar la eficacia de los protocolos habitualmente utilizados para la conservación del semen caprino. Se ha pretendido, por tanto, innovar en la estructuración de estos procesos, intentando realizar aportaciones con un elevado grado de aplicación, no solo destinadas a los centros o laboratorios de preservación seminal sino también que resultasen útiles para los ganaderos.

De esta manera, la primera experiencia constaba de dos experimentos; el primer experimento pretendía valorar la viabilidad del semen, congelado mediante dos protocolos diferentes (nitrógeno líquido y ultracongeladores de -152°C) y si el tiempo de almacenamiento (hasta 1 año) podría modificar la calidad del semen; el segundo experimento definió la fertilidad tras inseminar con semen congelado (conservado durante 1 y 6 meses), mediante los mismos dos protocolos valorados previamente.

En una segunda experiencia, se valoraba *in vitro* la calidad del semen preservado a diferentes temperaturas (37°C , 20°C , 4°C , -196°C) y la influencia de procesar el semen de manera individual o en forma de *pool*; la segunda fase de esta experiencia determinó la fertilidad del semen en fresco y congelado-descongelado, tras haber sido procesado de manera individual y en forma de *pool*. Finalmente, la tercera experiencia aspiraba a confirmar si las muestras de semen preservadas en *criocontenedores de transporte* (vapores de nitrógeno líquido), utilizados para el transporte de semen congelado, mantenían sus características en función del tiempo de almacenamiento en este tipo de dispositivos.

De esta forma, los objetivos de la presente tesis doctoral han sido los siguientes:

1. Valorar la eficacia del ultracongelador de -152°C para la congelación y conservación del semen caprino (raza Majorera), evaluando la influencia del tiempo de preservación sobre la calidad seminal *in vitro*.
2. Determinar la fertilidad del semen caprino de la raza Majorera, congelado y conservado mediante ultracongeladores de -152°C durante dos periodos definidos (1 mes, 6 meses) de almacenamiento.
3. Establecer la calidad y longevidad del semen caprino conservado a distintas temperaturas (37°C , 20°C , 4°C y -196°C) y procesado bien de manera individual o tras realizar un *pool* de eyaculados.
4. Definir la fertilidad tras realizar inseminaciones con semen fresco o congelado-descongelado, procesado bien de manera individual o tras realizar un *pool* de eyaculados, en la raza caprina Majorera.
5. Evaluar la calidad del semen caprino conservado en contenedores de transporte (vapores de nitrógeno líquido) durante diferentes periodos de tiempo.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO EN LA ESPECIE CAPRINA

Bajo este enunciado corresponde estudiar el testículo que es el órgano productor de los espermatozoides; el epidídimo, que los almacena, así como el conducto deferente que los transporta hasta la porción pélvica de la uretra, y las glándulas accesorias, cuyas secreciones dotan a los espermatozoides de las condiciones físico-químicas más adecuadas para la eyaculación y fertilización. Finalmente, se describirán las características del pene, órgano responsable de la copulación y responsable final de la deposición del semen en la vagina de la hembra.

2.1.1. TESTÍCULOS Y ESCROTO

Los testículos, derecho e izquierdo, son los órganos parenquimatosos encargados de producir las células germinales masculinas, aunque también contiene células responsable de la síntesis de testosterona. Las gónadas masculinas están situadas fuera del abdomen, en el escroto, que es una estructura sacular derivada de la piel y la aponeurosis de la pared abdominal (Smith, 1986). Cada testículo descansa dentro del proceso vaginal, una extensión separada del peritoneo que pasa a través de la pared abdominal por el conducto inguinal.

El **escroto** de los pequeños rumiantes tiene forma ovoidea, comprimida del lado craneal al caudal, es largo y penduloso y tiene un cuello bien marcado, que no se contrae (Constantinescu, 2001). La piel, en el caso del ganado caprino de raza Majorera, es de color pizarra y recubierta en parte con pelos cortos. Inmediatamente craneal al escroto, se sitúan dos pezones rudimentarios.

El **testículo** se conforma como un órgano ovoideo ligeramente comprimido. Esta morfología genera dos caras, lateral y medial, así como los polos o extremidades, cefálica y caudal (adyacentes a la cabeza y la cola del epidídimo, respectivamente), así como un borde epididimario y un borde libre opuesto (Garret, 1988). Estas referencias sirven para determinar la orientación del órgano en la bolsa escrotal, permitiendo definir que la extremidad cefálica es de posición dorsal en rumiantes.

La masa parenquimatosa fundamental del testículo es mantenida por un almacén o estroma de tejido conectivo fibroso. La fracción más densa y compacta de dicho estroma corresponde a la túnica albugínea envolvente. Desde la cara profunda de la misma se proyectan, hacia el interior del testículo, pequeños tabiques o septos, de tal modo que generalmente confluyen hacia el centro, generando una franja conectiva que se describe como mediastino del testículo (Orsi y cols., 1984; Delgadillo, 2005). Dicho parénquima se reagrupa en los espacios intersticiales como lobulillos testiculares, integrados por un número variable de túbulos seminíferos y de intersticio. Los lobulillos se dirigen hacia la periferia como túbulos seminíferos contorneados (largos y de trayecto tortuoso) para transformarse en túbulos seminíferos rectos a la altura del mediastino (Smith, 1986; Batista y cols., 2002). Adyacente a la membrana basal de los túbulos, se desarrolla una densa capa de células epiteliales espermatogénicas mantenidas por otras de sostén, las células de Sertoli, de marcada actividad metabólica (Ahmad y Noakes, 1995).

La fracción extratubular la constituye el intersticio, que se agrupa longitudinalmente entre los túbulos adyacentes (Orsi y cols., 1984). Las grandes células que lo integran, células de Leydig, sintetizan testosterona, encargada de activar la gametogénesis e imprimir en el macho los atributos y caracteres sexuales secundarios, así como la libido.

2.1.2. EPIDÍDIMO Y CONDUCTO DEFERENTE

El epidídimo aparece como un órgano coniforme, alargado y adosado a la extremidad cefálica y borde epididimario del testículo (Delgadillo, 2005). La primera porción es la **cabeza del epidídimo**, íntimamente unida a dicha extremidad del testículo, pues sirve como receptáculo de los espermatozoides producidos por el mismo. El **cuerpo del epidídimo** es la porción adyacente al borde epididimario del testículo; esta estructura se va estrechando progresivamente, permaneciendo unido al borde testicular por el mesorquio. Por último, la **cola del epidídimo** es continua a la extremidad caudal del testículo (Ahmad y Noakes, 1995). En el caso de los rumiantes, la cabeza del epidídimo se tuerce sobre la extremidad cefálica del testículo, pero el cuerpo desciende por la cara medial testicular (Smith, 1986; Constantinescu, 2001).

En cuanto a su constitución intrínseca, en la cabeza del epidídimo podemos distinguir un número indeterminado de lobulillos epididimarios glandulares (Batista y cols., 2002). A los centros tubulares de cada lobulillo van a desembocar los conductillos eferentes, procedentes de

la red testicular y que alcanzan el epidídimo atravesando la túnica albugínea. Éstos se encargan de transportar los espermatozoides inmaduros y de favorecer el contacto con las secreciones del epidídimo, dotándolos de motilidad. Los espermatozoides son recogidos por el conducto del epidídimo, que recorre el cuerpo y cola del mismo. Consta de numerosas asas y circunvoluciones, donde se almacenan billones de espermatozoides, completando su maduración hasta que tenga lugar la eyaculación (Smith, 1986; Constantinescu, 2001). Desde este punto, las contracciones peristálticas irán empujando a los espermatozoides hacia el conducto deferente.

Los **conductos deferentes** son los encargados de vehicular los espermatozoides hasta la porción pelviana de la uretra. Presenta, a lo largo de todo su recorrido, tres trayectos principales: extraabdominal, intraabdominal y un último trayecto intrapélvico (Constantinescu, 2001). Camina, al principio, por la cara medial del testículo, adyacente al epidídimo hasta su incorporación al cordón espermático, ocupando en este último una posición craneomedial en el caso de los rumiantes (Delgadillo, 2005). Posteriormente, a través del canal inguinal, se integra directamente a la cavidad abdominal para alcanzar el pliegue genital, cruzando medialmente el uréter del lado correspondiente, iniciando así la porción pelviana del conducto (Smith, 1986). A la altura del cuello de la vejiga se engrosa formando la ampolla, antes de convertirse en conducto eyaculador en su unión con la uretra.

2.1.3. CORDÓN ESPERMÁTICO

De origen básicamente vascular, se extiende entre el canal inguinal y la extremidad cefálica del testículo. Está constituido por vasos testiculares, los plexos nerviosos y linfáticos y el conducto deferente. La referencia central corresponde al trayecto de la arteria testicular y sus ramas terminales. En torno a su trayecto tortuoso y dependiente de la vena testicular, se agrupa un denso plexo venoso, o plexo pampiniforme, formando una red tupida en el caso de los ungulados (Garrett, 2001; Delgadillo, 2005).

2.1.4. GLÁNDULAS ACCESORIAS

Las glándulas accesorias se encuentran localizadas en la pared dorsal de la uretra pelviana, a cuyo interior vierten su secreción, dotando al material seminal de las propiedades físico-químicas necesarias para la viabilidad, motilidad y capacitación fecundante de los espermatozoides

(Delgadillo, 2005). Las glándulas accesorias son la próstata, las glándulas bulbouretrales y las glándulas vesiculares.

I. Próstata

Esta glándula accesoria es de emplazamiento retroperitoneal y está localizada inmediatamente caudal a las glándulas vesiculares. En el caso de los rumiantes, está compuesta por el cuerpo de la próstata, adosado a la pared dorsal de la uretra y de escaso desarrollo, y por una abundante porción diseminada presente en la pared uretral (Constantinescu, 2001). La cápsula prostática es fibromuscular, cuya naturaleza permite, en el momento de la eyaculación, de la extrusión de las secreciones a la luz uretral a través de numerosos conductillos prostáticos que desembocan en la mucosa (Smith, 1986).

II. Glándulas bulbouretrales

El par de glándulas bulbouretrales (de Cowper) se localizan, en general, sobre la pared dorsal de la extremidad caudal de la uretra pelviana, relacionándose con el bulbo del pene (Delgadillo, 2005). Aparecen cubiertas por músculos concretos (bulboesponjoso y bulboglandular) pertenecientes a la porción urogenital del periné, muchas de cuyas fibras pueden penetrar entre los septos conectivos de la glándula (Garrett, 2001). El líquido segregado, lubricante de la mucosa uretral, es rico en iones fundamentales que ejercen sobre el material seminal una decidida actividad espermiocinética. Cada cuerpo glandular drena hacia la uretra por su propio y único conducto bulboglandular, cuya desembocadura reside en el llamado receso uretral, una invaginación dorsal de la mucosa que marca en los rumiantes el comienzo de la porción peneana de la uretra (Constantinescu, 2001).

III. Glándulas vesiculares

Son dos porciones glandulares asociadas al origen de la porción pelviana de la uretra y prolongadas sobre el cuello de la vejiga urinaria, lateral a las ampollas de los conductos deferentes (Delgadillo, 2005). En el caso del ganado caprino, son muy compactas y de superficie lobulada, de forma casi esférica, de aspecto nodular y aparecen unidas entre sí por una franja de tejido conectivo no glandular. Los dos conductos excretores atraviesan la próstata antes de terminar en el colículo seminal, anexo a la desembocadura ipsilateral del conducto deferente (Constantinescu, 2001).

2.1.5. GENITALES EXTERNOS

I. Uretra

La uretra se origina en el cuello de la vejiga de la orina. Su porción pélvica, envuelta por el músculo uretral estriado, recibe secreciones de diversas glándulas y las conduce a una segunda porción peneana fuera de la cavidad pélvica (Constantinescu, 2001). A este nivel, se le unen otros dos cuerpos cavernosos para formar el cuerpo del pene, que se proyecta por debajo de la piel de la pared corporal.

II. Pene

En todos los mamíferos domésticos, el pene presenta un sustrato vascular de tejido eréctil que garantiza la turgencia o erección necesaria para la protrusión, intromisión y eyaculación. Este tejido eréctil (cavernoso y esponjoso) es, además, determinante de la forma general y grado de desarrollo del órgano, el cual comprende un tamaño medio en el caso de los rumiantes (Smith, 1986). Por otro lado, la naturaleza fibroelástica del pene de los rumiantes condiciona el tipo de reflejos eyaculadores (Garrett, 2001). De manera general, podemos distinguir diferentes regiones de relevancia anatómica: la raíz, el cuerpo y el glande del pene.

La **raíz del pene** corresponde a su extremo proximal y la forman un par de pilares y el bulbo del pene. Los primeros representan el origen de los cuerpos cavernosos; el segundo constituye la expansión globulosa que marca el principio del cuerpo esponjoso del pene. El bulbo del pene manifiesta una notable protrusión, resultado del especial desarrollo del tejido esponjoso y también al espesor del músculo bulboesponjoso que lo cubre (Constantinescu, 2001).

El **cuerpo del pene** es la parte comprendida entre la convergencia de los pilares y el glande, por lo que su base anatómica se corresponde con los cuerpos cavernosos. Está especialmente desarrollado en el caso de los ungulados, al menos en longitud, pues no solo comprende la larga porción prepucial, sino también la llamada porción libre, que se prolonga más allá de la inserción del prepucio (Constantinescu, 2001). En el caso de los rumiantes, el cuerpo del pene es largo pero bastante fino y cilíndrico (Smith, 1986).

El **glande del pene** constituye el ensanchamiento o expansión del cuerpo esponjoso del extremo distal del cuerpo peneano. En pequeños rumiantes, está poco desarrollado en virtud de

la escasa cantidad de tejido esponjoso y, como resultado, el glande del pene del macho cabrío es corto y casi hemisférico (Smith, 1986). Sin embargo, lo más característico es la gran longitud del proceso uretral (tejido eréctil); desde la base ventral del glande, se proyecta libremente en una longitud de 2-3 cm en el macho cabrío (Delgadillo, 2005).

III. Prepucio

El prepucio es la vaina o envoltura cutánea que protege a la porción libre del pene no erecto (Delgadillo, 2005). La piel del mismo se continúa dorsalmente con la de la pared del abdomen y caudalmente con la del escroto. Cranealmente aparece abierto al exterior por un orificio prepucial, a través del cual se evagina la porción libre del pene (Garrett, 2001).

2.2. GAMETOGENESIS EN EL MACHO CABRÍO

2.2.1. ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual las células germinales indiferenciadas, asentadas en la base de los túbulos seminíferos, se dividen por mitosis para mantener el mismo número de espermatogonias y cíclicamente producir espermátocitos primarios que en su momento, por meiosis, producen espermátidas haploides, que finalmente se diferencian en espermatozoides que se liberan en el lumen del tubo seminíferos (Jonhson, 1991). En la mayoría de los mamíferos, este proceso se lleva a cabo en los túbulos seminíferos a lo largo de toda la vida reproductiva del macho; sin embargo, en algunas especies, la espermatogénesis puede resultar interrumpida o subdividida en una serie de fases, basadas en situaciones ambientales que se traducen en señales hormonales que estimulan o inhiben la espermatogénesis (Kretser y Kerr, 1994).

En la reproducción sexual, presente en los animales domésticos, el genoma de las células reproductoras se mezcla por meiosis para dar origen a una célula genéticamente diferente. En el ciclo reproductivo sexual, las generaciones de células haploides llevan un juego sencillo de cromosomas y cuando los genomas de dos células haploides se mezclan y fusionan dan origen a una célula diploide. Las células proliferan mediante división mitótica (fase diploide) y posteriormente estas células diploides generarán nuevas células haploides mediante el proceso conocido como meiosis (Alberts y cols., 2002)

2.2.1.1. Fases de la espermatogénesis

I. Espermatocitogénesis

La espermatocitogénesis es la primera fase de la espermatogénesis e involucra a las células germinales o espermatogonias, localizadas en la capa más próxima a la base del túbulo seminífero (Johnson, 1991).

Existen diferentes clasificaciones de estas células, las cuales se basan en el tipo de coloración que adquiere el núcleo (cromatina). De esta forma, se pueden distinguir 3 tipos de espermatogonias: la espermatogonia A que tiene un núcleo con granulaciones finas de cromatina, la espermatogonia intermedia que se diferencia básicamente por la presencia de finas placas de cromatina junto a la membrana nuclear y la espermatogonia B que tiene un núcleo con gránulos fuertemente teñidos próximos a la membrana nuclear (Setchell, 1984; Johnson, 1991; Kretser y Kerr, 1994). A partir de las espermatogonias B, tiene lugar un proceso de meiosis que terminará por generar los espermatoцитos primarios y secundarios.

El proceso de meiosis involucra dos tipos de divisiones celulares: en la primera, que involucra los espermatoцитos primarios, los cromosomas aparecen como pares de cromátidas (Kretser y Kerr, 1994). Durante esta primera división meiótica, en los espermatoцитos primarios, rápidamente se desvanece la membrana nuclear, ocurre la metafase, anafase y la telofase: los espermatoцитos secundarios son el resultado de esta división y contienen un número haploide de cromosomas duplicados (Johnson, 1991). Los espermatoцитos secundarios permanecen en un período corto de interfase, hasta justo antes de la segunda división meiótica, produciendo espermátidas con un número haploide de cromosomas (Kretser y Kerr, 1994).

II. Espermiogénesis

Como continuación del proceso de espermatocitogénesis, las espermátidas esféricas resultantes del mismo se transforman en espermátidas maduras, en la última fase de diferenciación conocida como espermiogénesis. Este proceso incluye un complejo número de cambios conformacionales que consisten básicamente en la pérdida de orgánulos y citoplasma, quedando solamente vestigios del Aparato de Golgi (que posteriormente formará el acrosoma), mitocondrias y centriolos, que permitirán la formación del espermatozoide maduro. Las etapas básicas de los cambios metamórficos de los espermatoцитos son cuatro:

- Fase de Golgi: se forman gránulos proacrosómicos que convergen posteriormente en un solo gránulo (dentro del aparato de Golgi) y se inicia la formación de la cola (Kretser y Kerr, 1994).

- Fase de encasquetamiento: en esta fase, el gránulo acrosómico se adhiere a la superficie del núcleo y el flagelo primitivo comienza a alongarse (Kretser y Kerr, 1994).

- Fase acrosómica: en esta fase ocurren cambios en el núcleo, el acrosoma y la cola de las espermátidas. En su fase final, el acrosoma se condensa y se alarga y hay un desplazamiento del citoplasma en sentido contrario al núcleo (Ramalho-Santos y cols., 2002).

- Fase de maduración: en el núcleo, la cromatina se condensa en el núcleo, así como se forma una vaina fibrosa alrededor del axonema, cubriéndolo desde el cuello hasta el inicio de la pieza terminal (Kretser y Kerr, 1994).

III. Espermiación

Representa la liberación de los espermatozoides en el interior de los túbulos seminíferos. Al desprenderse, los espermatozoides aún conservan pequeños restos de citoplasma, estas estructuras se conocen como gotas citoplasmáticas. El resto del citoplasma de la espermátida (cuerpos residuales) es fagocitado por las células de Sertoli (Garner y Hafez, 2000).

2.2.2. MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE

El producto final de la espermatogénesis es una célula altamente especializada, el espermatozoide. La estructura del espermatozoide maduro está compuesto por las siguientes partes: cabeza, cuello y flagelo.

La característica principal de la **cabeza** del espermatozoide es el núcleo aplanado oval, que contiene cromatina muy compacta. La cromatina condensada consiste en un complejo formado por ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas básicas llamadas protaminas espermáticas. Su contenido de ADN nuclear es haploide; esto es, posee la mitad de cromosomas que el núcleo de las células somáticas de la misma especie (Johnson, 1991).

El extremo anterior del núcleo espermático está cubierto por el **acrosoma**, un delgado saco membranoso de doble capa ubicado sobre el núcleo y que se desarrolla durante las últimas etapas de la formación del espermatozoide. Esta estructura, en forma de casquete, contiene

acrosina, hialuronidasa y otras enzimas hidrolíticas que participan en el proceso de la fecundación. El segmento ecuatorial del acrosoma, junto con el segmento anterior de la región post-acrosómica, son las regiones que se fusionan inicialmente con la membrana del oocito durante la fecundación (Dadoune, 1993).

La **cola** espermática está formada por el cuello y los segmentos medio, principal y caudal. El cuello forma la placa basal que se une a una depresión en el extremo posterior del núcleo. Ésta es continua en sentido posterior, y tiene nueve fibras gruesas que se proyectan hacia atrás a través de la mayor parte de la cola. La región comprendida entre el cuello y el anillo citoplasmático es el segmento medio. El centro de este segmento medio, junto con toda la longitud de la cola, comprende el axonema, el cual se compone de nueve pares de túbulos dispuestos radialmente alrededor de dos filamentos centrales. El axonema y las fibras densas asociadas del segmento medio están cubiertos por numerosas mitocondrias. La vaina mitocondrial, dispuesta en un patrón helicoidal alrededor de las fibras longitudinales de la cola, es la fuente de energía necesaria para la motilidad espermática (Dadoune, 1993).

La gota citoplasmática, que suele desprenderse de los espermatozoides tras la eyaculación, está compuesta de citoplasma residual (Johnson, 1991).. Esta gota citoplasmática puede retenerse en la región del cuello, donde se conoce como gota proximal, o cerca del anillo citoplasmático, donde se conoce como gota distal.

2.2.3. TRANSPORTE DEL SEMEN

Los espermatozoides provenientes de la *rete testis* son en su mayoría inmóviles e incapaces de mostrar un desplazamiento lineal. Por tanto, a su llegada a la cabeza del epidídimo, los espermatozoides son inmaduros. La motilidad progresiva se adquiere gradualmente cuando el espermatozoide se desplaza a lo largo del epidídimo; por lo tanto, el número de células móviles se incrementa en el cuerpo y alcanza su máximo cuando entra a la región de la cola, al mismo tiempo, el movimiento cambia de vibratorio a un desplazamiento rectilíneo (Setchell, 1991; Yanagimachi, 1994; Gatti y cols., 2004).

2.3. PRODUCCIÓN SEMINAL EN EL MACHO CABRÍO

2.3.1. MÉTODOS Y FRECUENCIA DE RECOGIDA SEMINAL

2.3.1.1. Métodos de extracción seminal

Cualquier método de recogida seminal debería garantizar la calidad de los eyaculados recogidos, no entrañar peligro ni dolor para el animal y permitir la obtención de volúmenes seminales semejantes a los de la monta natural, evitando tanto la contaminación como el shock térmico.

Bajo estas características, la recogida seminal en macho cabrío suele realizarse mediante vagina artificial (Ritar y SÁlamon, 1982; Greyling y Grobbelaar, 1983) o electroeyaculación (Greyling y Grobbelaar, 1983; Loubser y cols., 1983a). Otro método menos extendido de recogida seminal es mediante punción, a través de la cola del epidídimo (Gilmore y cols., 1998).

La **vagina artificial** es, hoy en día, el método más extendido para la obtención de semen de macho cabrío, ya que permite utilizar presiones y temperaturas adecuadas para estimular la eyaculación. Existen diversas variedades de vaginas artificiales, pero todas tienen en común el hecho de que proporcionan los estímulos elásticos, mecánicos (presión) y térmicos (temperatura) primordiales para la erección del pene y eyaculación (Evans y Maxwell, 1987).

De manera general, la vagina artificial consiste en un cilindro rígido externo de aproximadamente 20 x 5.5 cm de goma fuerte, plástico o cualquier material sintético que tenga buenas propiedades aislantes; también incluye un cilindro interno de goma flexible de unos 2-3 cm y con una longitud superior al cilindro externo que nos permita reinvertir para formar un depósito estanco donde introduciremos agua atemperada. En el momento de la recogida seminal, la temperatura de la cara interna de la vagina artificial no deberá ser superior a 40-44°C, para evitar quemaduras en la mucosa del pene. Finalmente, para conseguir una adecuada turgencia y presión, se insufla aire para dar la presión adecuada a la vagina. La vagina va unida a un embudo y a un tubo colector, donde quedara recogido el semen tras el momento del eyaculado (Ritar y SÁlamon, 1982; Greyling y Grobbelaar, 1983).

Para la recogida suele recurrirse a la inmovilización de una hembra ovariectomizada (Roca y cols., 1992a; Pérez y Mateos, 1996), ya que la ausencia de ovarios en la hembra le proporciona un estado reproductivo constante a lo largo de las sucesivas recogidas. Muchos autores

practican una estrogenización periódica de la hembra mientras se prolonguen los períodos de recogida seminal (Chemineau, 1986; Pérez y Mateos, 1996). Sin embargo la estrogenización puede restringirse únicamente a las primeras recogidas (Peskovatskov, 1985), cuando los machos no han adquirido la suficiente confianza como para permitir la cercanía del operario durante la monta. Esta tarea de aprendizaje depende de varios factores como la destreza del técnico, del temperamento del animal y de su comportamiento sexual (Leboeuf y cols., 2000) entre otros.

De manera general, el operario se coloca en el lado derecho de la hembra de una forma tranquila y discreta. En el momento en que el macho sube sobre la hembra, el operario desviará el pene hacia la vagina artificial para que el macho eyacule dentro. Cuando el semental empuja para la eyaculación, el operario permite que la vagina artificial se mueva con el empuje, manteniéndola alineada con el pene. Una vez se produce la eyaculación, la vagina que estaba en posición horizontal se coloca ahora en posición vertical y el eyaculado fluye hacia el interior del tubo graduado (Batista y cols., 2011).

La **electroeyaculación** es un mecanismo que nos permite obtener semen de todos los animales que posean intacta la vía neuronal implicada. Sin embargo, la principal limitación es la necesidad de someter al animal a un tratamiento de tranquilización o incluso anestesia general, ya que este método puede producir molestias al animal. El electroeyaculador consta de un vástago (fuente de electrodos) y una fuente de voltaje. El vástago debe introducirse entre 7 y 9 cm en el recto con los electrodos en posición ventral. Se necesita de unas 3 a 8 series, entre 2 y 5 voltios, para lograr un eyaculado, los estímulos se aplican siguiendo un patrón de varios segundos de estímulo seguido de varios segundos de parada. Sin embargo, este método proporciona eyaculados de peor calidad, con mayor volumen, pero menor concentración, menor motilidad y/o menor porcentaje de espermatozoides vivos (Greyling y Grobbelaar, 1983), así como peores resultados para la criopreservación seminal (Jiménez-Rabadán y cols., 2012).

Una tercera forma de recoger semen consiste en la **recogida seminal de la cola del epidídimo** directamente (Fournier-Delpech y cols., 1979; Gilmore y cols., 1998). Este método es de gran utilidad en aquellos casos que se precise recoger semen de un macho recién muerto.

Asimismo, la capacidad fertilizante del semen obtenido de la cabeza del epidídimo en ciervo, dentro de las 24 horas tras su recogida no presenta variación significativa (Garde y cols., 1998).

Kaabi y cols. (2003) sugieren que, cuando el semen no pueda ser recogido del epidídimo ovino y conservado inmediatamente, se puede conservar el epidídimo a 5°C durante 24 horas y a partir de ahí obtener semen viable.

2.3.1.2. Frecuencia de recogida

Cada especie animal tiene definido un ritmo de recogida, cuya periodicidad dependerá del grado de reservas espermáticas, características de cada especie, raza e individuo. El macho cabrío es capaz de soportar severos ritmos de recogida como demuestran los diferentes estudios. Okere y cols. (1986) no encontraron diferencias significativas entre las características del semen recogido tres veces al día durante 21 días consecutivos y el obtenido dos veces por semana durante 5 meses. No obstante, Joseph y Nai (1989) sí apreciaron descensos en la concentración a medida que el número de recogidas se incrementaban de 1 a 3 por día durante 3 meses; asimismo, Ritar y cols. (1992) también encontraron un descenso en la concentración espermática, al final de un período de 5 días durante el cual se sometía a los machos a un ritmo de 5 recogidas por día. Sin embargo, hay discrepancia en cuanto a si este efecto se acompaña también de un descenso en el volumen eyaculado y la motilidad (Joseph y Nai, 1989; Ritar y cols., 1992).

En las experiencias de producción seminal, en las que se pretende que el ritmo de recogida no ejerza influencia sobre las características seminales del macho cabrío, están indicadas frecuencias de recogida de 2 o 3 recogidas por semana, porque proporciona una producción seminal continua a lo largo de amplios períodos de tiempo (Corteel, 1976, 1981; Roca y cols., 1992a,b).

Por esta razón, para detectar posibles variaciones estacionales a lo largo del año, se adoptan habitualmente estas frecuencias de recogida (Borgohain y cols., 1983; Delgadillo y cols., 1993), aunque en ocasiones se han empleado frecuencias aún menores (Greyling y Grobbelaar, 1983; Tuli y Holtz, 1995; Pérez y Mateos, 1996).

2.3.2. FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR SOBRE LA PRODUCCIÓN SEMINAL

2.3.2.1. Edad de los machos

La edad de la madurez sexual viene dada por la época de nacimiento, la alimentación y el peso del animal. De esta forma, de un macho joven que ha sido bien alimentado y que ha recibido un manejo adecuado, se puede obtener semen de calidad desde los 7-8 meses de edad. No obstante, se ha comprobado que la calidad seminal no es muy buena en animales excesivamente jóvenes que, aunque hayan alcanzado la pubertad, no han completado su madurez reproductiva. No es recomendable la utilización de machos menores de 7 meses de edad, ya que la espermatogénesis aún no está plenamente desarrollada (Hackett y Wolynetz, 1982).

Un estudio realizado por Salhab y cols. (2003) confirmó que se obtenía semen de buena calidad a partir de los 11 meses de edad, si bien su calidad se incrementaba por encima de los 14-15 meses de edad.

Por otro lado, a partir de los 4 años de edad del animal, la producción seminal y la calidad del eyaculado comienza a disminuir, dando como resultado un menor porcentaje de fertilidad. No obstante, es precisamente a esa edad cuando se puede llegar a conocer la valoración genética de un macho a través de su descendencia (Leboeuf y cols., 2000)

2.3.2.2. Alimentación

En el macho cabrío, se ha comprobado (Walkden-Brown y cols., 1994) que un bajo nivel nutritivo puede reducir la libido, el volumen seminal, la motilidad y vitalidad espermáticas, la concentración espermática e incrementar el porcentaje de morfoanomalías.

En este aspecto, se debe hacer referencia a la nutrición que reciben los animales desde la etapa fetal hasta que alcanza la madurez sexual y que puede influir en sus rendimientos reproductivos posteriores. Parece claro, que los límites máximos de los parámetros reproductivos en la especie caprina vienen determinados por el genotipo, de tal manera que la expresión del potencial genético está marcadamente condicionado por factores ambientales; entre ellos, la nutrición ocupa un papel preponderante (Abecia y Forcada, 2001).

Del mismo modo, diferentes estudios realizados en machos cabríos (Walkden-Brown y cols., 1994; Martin y Walkden-Brown, 1995) demostraron que una alimentación de buena calidad antes del inicio de la estación reproductiva se traduce en un adelanto de la misma (genera una más pronta reactivación ovárica de las hembras) y un incremento de la producción seminal.

2.3.2.3. Individuo y raza

Resulta evidente que existe una variabilidad, entre razas y entre individuos, tanto para la calidad seminal como para el comportamiento sexual. Así, hay estudios que indican que el comportamiento sexual de machos y hembras es hereditario en varias especies (Kilgour, 1985; Stellflug y Berardinelli, 2002). Por otro lado, algunos investigadores consideran que el comportamiento sexual que precede a la monta es muy característico en ovino y fácilmente medible mediante diversos parámetros como la jerarquía social, tiempo de reacción, eficacia de la cubrición, calidad seminal y diámetro testicular (Folch y Roca, 1979).

Por otro lado, sí se han detectado marcadas diferencias en la libido de los machos cabríos en función de la raza involucrada. Por ejemplo, en similares condiciones ambientales y nutritivas, los machos de la raza Malagueña presentaban un comportamiento sexual más intenso y niveles más elevados de testosterona que los machos de la raza Verata, tras una exposición previa a hembras en celo (Pérez y Mateos, 1996).

2.3.2.4. Variación estacional de la actividad reproductiva

La existencia de una variación estacional en la actividad reproductiva en la especie caprina, tanto en hembras como en machos, se encuentra perfectamente definida. De esta forma, a lo largo del año presentan una época de actividad reproductiva activa, y otra época del año en que esa actividad es notablemente menor. En el hemisferio norte, la época reproductiva se corresponde con los meses de junio a diciembre y numerosos estudios confirman que la época de mayor producción y/o calidad seminal es en otoño e invierno (Amir y cols., 1986; Karagiannidis y cols., 2000).

Mandiki y cols. (1998) muestran que esta estacionalidad en el caso del macho se traduce en un cambio en los patrones de secreción de las gonadotropinas hipofisarias: hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), así como la secreción de testosterona. De esta

forma, los niveles de secreción de FSH y la frecuencia pulsátil de LH y testosterona, disminuye durante la estación no reproductiva y alcanza sus niveles máximos durante la estación reproductiva, que se corresponde con el período de fotoperíodo decreciente.

En latitudes subtropicales, existen muchas diferencias en el grado e intensidad de la estacionalidad reproductiva y su reflejo en una mejor o peor calidad seminal. De esta forma, en machos Cashmere (Walkden-Brown y cols., 1994) en Australia (29°S), la estacionalidad reproductiva es moderada y no existe apenas influencia en su producción espermática, mientras los machos de la raza Angora presentan la mayor actividad sexual en otoño. En las razas canarias (Islas Canarias, 28 °N), no se observan apenas variaciones estacionales ni en la talla testicular, ni en la producción seminal, cualitativa o cuantitativamente; solo durante los meses de febrero y marzo, se ha observado una disminución del nº de espermatozoides/eyaculado, pero sin importancia significativa (Cabrera y cols., 2005).

2.3.3. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN EN LA ESPECIE CAPRINA

En el caso del macho cabrío, la eyaculación se desarrolla de una forma rápida, transcurriendo únicamente un par de segundos desde el momento en que el macho penetra a la hembra y el momento en que eyacula, realizando en ese mismo momento un “golpe de riñón”. La eyaculación está integrada por una sola fracción en la que se obtiene los espermatozoides y los líquidos seminales procedentes de las glándulas accesorias (bulbouretrales, vesiculares y próstata).

De manera general, se considera que el semen de macho cabrío presenta un volumen eyaculado de aproximadamente 1 ml, una concentración de $3 \cdot 10^9$ spz/ml y una motilidad del 75%. No obstante, en los siguientes apartados se definen las características macro y microscópicas del semen, así como los diferentes procedimientos para su valoración

2.3.2.1. Características macroscópicas

El **volumen eyaculado** que podemos encontrar en las distintas razas varía desde los 0.35-0.5 ml en la Jamnapari (Sinha y cols., 1981), la Malabari (Patil y Raja, 1978) o la Moxoto (Feliciano-Silva y cols., 1992), hasta los 1.53 de la Saanen (Lima y cols., 1994). En el caso de la raza Majorera, el volumen medio de cada eyaculado se encuentra en torno a 1.57 ml (Cabrera y cols.,

2005). El volumen eyaculado se determina habitualmente por lectura directa sobre el tubo graduado utilizando en la recogida (Daudu, 1984; Karatzas y cols., 1997).

El **color del semen** de macho cabrío es blanco grisáceo o amarillo, siendo este parámetro más variable que el observado en semen de carnero (Lebouef y cols., 2000). El color del eyaculado varía entre uno y otro animal, e incluso entre eyaculados del mismo animal; estas variaciones parecen obedecer tanto al tipo de nutrición del animal, como a la diferente aportación de las glándulas sexuales accesorias (Mendoza y cols., 1989). Al igual que el volumen, el color del semen se evalúa mediante observación directa en el tubo graduado utilizado para la recogida.

2.3.3.2. Características microscópicas

La **concentración espermática** estima el recuento total de espermatozoides existentes en el eyaculado, y se expresa en una unidad de volumen (mm o cm cúbicos). La concentración espermática representa uno de los parámetros básicos para determinar el mejor aprovechamiento de la productividad del macho. Resulta fundamental conocer el número de espermatozoides presentes en cada eyaculado, para definir el posterior procesado del semen (refrigeración, congelación).

En la concentración espermática se han encontrado oscilaciones desde los $0.6 \cdot 10^9$ esp/ml en la raza Red Sokoto (Daudu, 1984), hasta los 4.5×10^9 esp/ml de la raza Saanen o los 5.9×10^9 esp/ml registrados en la raza Anglo-nubiana (Lima y cols., 1994). Cabrera y cols. (2005) han descrito una concentración espermática en torno a 3.45×10^9 esp/ml en la raza Majorera.

La concentración espermática se determina habitualmente diluyendo el semen 1:200-1:400 en solución con un 0.5% de eosina o solución salina formolada, para a continuación realizar el recuento mediante hemocitómetro (Loubser y Van Niekerk, 1983a,b; Daudu, 1984; Chauhan y Anand, 1990; Ritar y cols., 1992; Tuli y Holtz, 1992, 1994) en microscopio óptico a 10X y 40X. La principal ventaja de este procedimiento es que muestra un grado aceptable de exactitud y no se precisa de gran infraestructura, si bien como desventajas se encuentran que es un procedimiento tedioso y precisa de un periodo relativamente prolongado de tiempo para su estimación.

Otra alternativa para determinar el número de espermatozoides presentes en un eyaculado se basa en estimar la concentración espermática, en función de la opacidad mostrada por una muestra de semen. Concretamente, sobre una alícuota del semen, diluida 1:400 en solución salina formulada o solución isotónica de citrato, se estima el grado de absorción y dispersión de la luz que producen los espermatozoides mediante un espectrofotómetro previamente calibrado (Memon y cols., 1986; Delgadillo y cols., 1991; Azawi y cols., 1993; Karatzas y cols., 1997).

La **motilidad espermática** es el indicador más valorado al analizar una muestra de semen. Existe una alta correlación entre el porcentaje de espermatozoides móviles y la integridad de la membrana plasmática, la morfología espermática y la fertilidad de los animales (Roca y cols., 1992a; Pérez y Mateos, 1996; Dorado y cols., 2007). Al determinar la motilidad espermática de una muestra, se pretende determinar el porcentaje de espermatozoides que presentan movimiento, ya sea de forma general o bien cuantificando aquellos espermatozoides que sean capaces de presentar un movimiento progresivo.

La motilidad espermática progresiva puede valorarse como el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo (Ritar y SÁlmon, 1982, 1991; Tuli y cols., 1991; Roca y cols., 1992a; Pérez y Mateos, 1996; Dorado y cols., 2007). El procedimiento tradicional para determinar la motilidad espermática consiste en la observación visual directa. Esta técnica de valoración subjetiva implica la dilución de una muestra de semen en citrato sódico o PBS, hasta una concentración aproximada de 100×10^6 espermatozoides/ml. A continuación, se deposita una pequeña gota del semen diluido entre un porta y un cubreobjetos, para generar una fina película que permita determinar, de forma más o menos precisa, el número de células móviles presentes en la muestra, e incluso valorar si el tipo de movimiento espermático es normal o no. Todo este protocolo se debe realizar a 36-38°C y se procede a observar varios campos por muestra, utilizando para ello un microscopio óptico o de contraste de fases, entre 100-400 aumentos, sin conocer el evaluador la procedencia de la muestra (Daudu, 1984; Memon y cols., 1985; Deka y Rao, 1986; Chauhan y Anand, 1990; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995; Ritar y Ball, 1993; Karatzas y cols., 1997). Algunos autores incluso utilizan un hemocitómetro para tratar de ser más objetivos en la apreciación (Sinha y cols., 1995).

Más recientemente, se han utilizado diferentes sistemas automatizados de análisis espermático, que permiten definir de una manera más objetiva y precisa el porcentaje de espermatozoides motiles, así como las características del movimiento espermático (Salvador y cols., 2006; Dorado y cols., 2007; Batista y cols., 2009, 2011). Estos sistemas permiten establecer, de un modo muy fiable, correlaciones entre la calidad del movimiento de los espermatozoides y la capacidad fecundante de los mismos.

Los valores de **motilidad progresiva** del semen fresco presentan resultados que oscilan entre un 53% en la Moxoto (Feliciano-Silva y cols., 1992) a un 87% en la Murciano-Granadina (Roca y cols., 1992a). En el caso de las razas caprinas canarias, la motilidad progresiva media se encuentra en valores en torno a un 65-80% (Cabrera y cols., 2005; Batista y cols., 2009, 2011).

La **vitalidad espermática** o porcentaje de espermatozoides vivos, se determina habitualmente mediante tinción supravital donde los espermatozoides vivos (con membrana intacta) no permitirán la entrada del colorante a su citoplasma, y se observarán sin teñir. Por otro lado, los espermatozoides que tengan la membrana citoplasmática dañada, permitirán la entrada de la tinción y el espermatozoide adquirirá una coloración determinada. Entre las tinciones vitales, la técnica más tradicional es la tinción de eosina-nigrosina, siendo una técnica muy fácil y rápida de realizar, valorándose la extensión resultante bajo microscopio a 400-1000 aumentos (Greyling y Grobbelaar, 1983; Loubser y Van Niekerk, 1983a,b; Karatzas y cols., 1997) y se hace un recuento de 200 espermatozoides, determinando el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta (células no teñidas) y el porcentaje de espermatozoides dañados y/o muertos (células teñidas de color rosado). No obstante, el principal inconveniente de esta técnica es que al tratarse de un colorante hipotónico que se añade a una muestra en fresco, puede favorecer la presentación de morfologías anormales de los espermatozoides, especialmente de la cola (Lebouef y cols., 2000). Por esta razón, en la mayoría de los laboratorios más sofisticados de tecnología seminal, este procedimiento ya no se utiliza para determinar la vitalidad de las muestras seminales (Salvador y cols., 2006; Hidalgo y cols., 2007; Batista y cols., 2009), siendo reemplazados por técnicas más específicas (hypo-osmotic swelling test, HOST).

El **porcentaje de morfoanoamalias** se corresponde con el porcentaje de espermatozoides que presenten cualquier tipo de alteración en las distintas partes que componen esta célula: cabeza, pieza intermedia y cola. La determinación de morfoanomalías espermáticas es un aspecto de importancia fundamental en los procesos de contrastación seminal, puesto que la motilidad espermática y, por tanto, la capacidad fertilizante de los espermatozoides están íntimamente relacionadas con la morfología espermática.

Tradicionalmente, la determinación del porcentaje de morfoanomalías se realiza mediante la utilización de la tinción de eosina-nigrosina, de manera similar a lo descrito en el procedimiento de vitalidad espermática (Loubser y Van Niekerk, 1983; Ali y Mustafa, 1986; Skalet y cols., 1988) o mediante la técnica de la “gota gruesa”, fijando la muestra de semen en solución fosfato tamponada con glutaraldehído al 2% y a 37°C, para contar a continuación 100-400 espermatozoides bajo microscopio de contraste de fases a 1000 aumentos (Roca y cols., 1992a,b; Salvador y cols., 2006). Asimismo, otros autores (Paulenz y cols., 2005; Batista y cols., 2011) utilizan una tinción específica denominada Spermac®, que permite distinguir además de las acrosomías, el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal. Finalmente, algunos investigadores (Hidalgo y cols., 2006, 2007; Dorado y cols., 2007) utilizan equipos más sofisticados (análisis computerizado de la morfología espermática) para la evaluación de las morfoanomalías presentes en el eyaculado.

El porcentaje de morfoanomalías del semen fresco suele situarse por debajo del 10-15% (Dorado y cols., 2007; Batista y cols., 2009, 2011), mientras que una vez congelado-descongelado, el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal oscilaba entre un 20 y un 50% (Singh y cols., 1995; Hidalgo y cols., 2007; Dorado y cols., 2007; Batista y cols., 2009).

La valoración del **estado del acrosoma** presenta un gran interés a la hora de determinar la calidad seminal de un eyaculado, sobre todos en los procesos de congelación y descongelación seminal, ya que la alteración y/o separación del acrosoma antes de tiempo, se relaciona con un proceso prematuro de capacitación espermática y, por tanto, con una efectividad limitada (Hidalgo y cols., 2006; Dorado y cols., 2007). Entre las diferentes técnicas que se pueden utilizar para valorar el porcentaje de acrosomas alterados, se encuentran prácticamente las mismas descritas para la valoración de las morfoanoamalias. De esta forma, se puede utilizar la prueba

de la “gota gruesa” (Memon y cols., 1985; Pintado y Pérez, 1992; Pérez y Mateos, 1996), mediante tinción Giemsa (Singh y cols., 1995) o mediante tinción supravital (Spermac®), en la que cada porción del espermatozoide (cabeza, acrosoma, pieza intermedia y cola) toma una tonalidad diferente, pudiéndose observar de esta forma más claramente cada una de las partes (Hidalgo y cols., 2007; Dorado y cols., 2007; Batista y cols., 2009, 2011).

En semen fresco, los porcentajes de acrosomías se sitúan habitualmente entre un 5-10% (Hidalgo y cols., 2006; Dorado y cols., 2007; Batista y cols., 2009, 2011), se incrementan ligeramente en el semen refrigerado (Batista y cols., 2011), y muestran unos valores menos uniformes en muestras congeladas-descongeladas, con valores que oscilan entre 15 y un 50% (Chang-Yong y cols., 2006; Dorado y cols., 2007; Hidalgo y cols., 2007; Batista y cols., 2011).

2.3.3.3. Características bioquímicas

I. Capacidad de endosmósis

Jeyendran y cols. (1984) desarrollaron un sencillo test que determinaba la integridad funcional de la membrana espermática y cuyos resultados parecen altamente correlacionados con la fertilidad del individuo. Este test se denominó test de resistencia osmótica o HOST (Hypoosmotic Swelling Test).

La funcionalidad de este test se relaciona con la capacidad de la membrana celular de permitir el paso selectivo de moléculas a través de ella. Cuando un espermatozoide es expuesto a condiciones hipoosmóticas, el agua entra en un intento de conseguir el equilibrio osmótico. Esta entrada produce un aumento del volumen celular y la membrana plasmática se expande drásticamente (Drevius y Eriksson, 1966).

La zona de la cola del espermatozoide parece ser aún más sensible a este fenómeno, probablemente porque se encuentra unida de forma más débil a los filamentos de la cola; de esta manera, el enroscamiento de la cola indica también la integridad de la membrana de la cabeza (Jeyendran y cols., 1984).

El uso del HOST se recomienda como prueba adicional a las pruebas estándar de contrastación. Incluso, se ha postulado que al definirse su correlación significativa con varias de estas pruebas, podría sustituir a alguna de ellas (García y cols., 1984).

II. pH

El pH del semen recién eyaculado se encuentra próximo a 7.4, valor próximo al detectado en otros fluidos orgánicos. Al reducir el pH seminal, se reduce también el metabolismo energético de la célula y por tanto su motilidad. El metabolismo glucolítico del espermatozoide provoca que el pH intracelular disminuya y el metabolismo celular quede reducido. El ácido láctico es principal metabolito resultante de esta reacción metabólica y se ha utilizado como indicador de calidad seminal (Rigau y cols., 1996).

La adición de sustancias tamponadoras ayudan a limitar este efecto. Con este fin se pueden utilizar tampones sencillos como bicarbonato o citrato sódico, o bien algunos más complejos (TES, HEPES, MOPS, TRIS), que además de regular el pH en un rango más amplio, no son dependientes de la temperatura (SÁlamon y Maxwell, 1995; El-Alamy y Foote, 2001)

III. Osmolaridad

Diversos estudios han llegado a la conclusión que ni la motilidad ni la vitalidad espermáticas se ven afectadas por la presión osmótica en rangos comprendidos entre 250 y 290 mOsm (Fraser y cols., 2001), mientras que cuando desciende por debajo de los 200 mOsm, se detecta una significativa reducción de la motilidad (Gilmore y cols., 1996; Fraser y cols., 2001) Sin embargo, los diluyentes isotónicos (300mOsm) o ligeramente hipertónicos son los que mejores resultados han dado en condiciones de utilización comercial (Meque, 2004).

2.4. DILUYENTES SEMINALES

Por diluyente entendemos la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir la concentración espermática deseada y que, además, es capaz de preservar las características funcionales de las células espermáticas, así como mantener el nivel de fertilidad adecuado (Meque, 2004).

De forma natural, los espermatozoides se encuentran englobados en el líquido seminal, que contiene los nutrientes necesarios para que puedan mantener su actividad metabólica y le permita avanzar por el tracto genital femenino. Pero, estos nutrientes garantizan una actividad por un tiempo limitado. Para conservar espermatozoides durante periodos más prolongados sería necesario reducir su actividad metabólica, lo que se consigue mediante la dilución en un medio adecuado y reduciendo progresivamente la temperatura, de forma que no produzca shock térmico a las células seminales (Pursel y cols., 1973).

2.4.1. COMPONENTES BÁSICOS DE UN DILUYENTE

De manera general, se considera que un buen diluyente debe reunir una serie de propiedades, entre las que se deberían incluir:

- Aportar nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (carbohidratos)
- Controlar el pH del medio (Bicarbonato, TRIS, HEPES)
- Proteger frente al shock térmico por frío (básicamente yema de huevo)
- Controlar la presión osmótica (sales, NaCl, KCl)
- Evitar el desarrollo microbiano (antibióticos)

2.4.1.1. Fuentes de energía

El espermatozoide tiene capacidad de obtener la energía necesaria para mantener su metabolismo celular y generar movimientos; este metabolismo tiene lugar básicamente en las mitocondrias de la pieza intermedia. Existen diversas opiniones sobre cuál es el tipo de azúcar más conveniente para un diluyente seminal. Valorando la vitalidad espermática post-descongelación, algunos investigadores han elegido la fructosa o glucosa como fuente energética (SÁlmon y Maxwell, 1995) mientras que otros ha usado la galactosa, ribosa o

trehalosa, aunque los resultados obtenidos no han superado los obtenidos con el uso de glucosa (Barrios y cols., 2000; Paulenz y cols., 2000).

2.4.1.2. Soluciones tampones y electrolitos

Los espermatozoides y las bacterias contenidas en el semen producen metabolitos como el ácido láctico, por lo que son necesarias las sustancias tampón para su preservación (El-Alamy y Foote, 2001). El compuesto Tris (Hidroximetil aminometano) y el citrato sódico proporcionan una solución tampón en los diluyentes que contienen yema de huevo (Gomes y cols., 1984).

Por su parte, los electrolitos son utilizados para regular la presión osmótica, siendo el cloruro de potasio y el cloruro de sodio los más habitualmente utilizados (SÁlamon y Maxwell, 1995; El-Alamy y Foote 2001). Los espermatozoides diluidos en medios hiper o hipotónicos pueden sufrir turgescencia o plasmolisis de las cabezas, respectivamente. La mayoría de los diluyentes son hipertónicos con respecto al plasma seminal, ya que estas diluciones son menos dañinas que las hipotónicas.

2.4.1.3. Estabilizadores de membrana

La principal función de los estabilizadores de membrana en los diluyentes seminales consiste en prevenir o retardar las alteraciones no deseadas en la estructura y la función de las membranas de los espermatozoides (Lebouef y cols., 2000).

En 1981, Watson puso de manifiesto la acción protectora de los componentes de la yema de huevo, afirmando que la lecitina y las lipoproteínas son responsables de la protección frente al choque térmico. Las lipoproteínas de la yema de huevo proporcionan la mejor protección, reduciendo la viscosidad de la membrana plasmática, aunque la albúmina sérica bovina, la fracción proteica de la yema de huevo, la caseína, los triglicéridos de la leche y el colesterol también han mostrado cierta eficacia (Gebauer y cols., 1970)

Asimismo, la porción proteica que tiene la leche en el diluyente muestra funciones protectoras (Lebouef y cols., 2000), especialmente la lacto-albúmina, que permite la conservación de la integridad de la membrana plasmática y de la motilidad espermática (Watson, 1995; Ollero y cols., 1998).

Por tanto, es evidente que la yema de huevo desempeña una función protectora sobre la integridad de la membrana espermática, aunque también puede estar implicada en la desestabilización de la misma. Este fenómeno ha sido observado por algunos investigadores, que han demostrado que al aumentar su concentración, aumenta también la frecuencia en el daño del acrosoma (Watson y Martin, 1973).

2.4.1.4. Antibióticos

En machos sanos, el tejido testicular y las glándulas accesorias están libres de carga bacteriana. No obstante, durante el proceso de recogida seminal, los eyaculados pueden contaminarse (Byrne y cols., 2000). Esta contaminación bacteriana puede favorecerse por algunos componentes de los diluyentes como la glucosa y las temperaturas de conservación del semen. Para controlar el crecimiento bacteriano, es necesario añadir agentes antibióticos a los diluyentes.

La contaminación bacteriana en las muestras seminales pueden producir efectos adversos como disminución de la motilidad espermática, aglutinaciones, aumento del porcentaje de acrosomías y reducción del pH hasta niveles ácidos (5.7-6.4; Althouse y cols., 2000), efectos todos que reducen el tiempo de conservación de dichas muestras.

La adición de penicilina y estreptomina fue en un principio la combinación más utilizada, posteriormente se han utilizado con éxito aminoglicósidos, entre los que se encuentra la gentamicina, neomicina y kanamicina (Anel y cols., 1998).

2.4.1.5. Agua

La elaboración de los diluyentes seminales requiere de la inclusión de agua destinada a la dilución de sus diferentes compuestos. El agua debe poseer una serie de características específicas, siendo el agua bidestilada o ultrapura las más habitualmente utilizadas (Leboeuf y cols., 2000).

2.4.2. CLASIFICACIÓN DE LOS DILUYENTES

La preservación seminal a temperaturas entre 0-5°C o su congelación implica una reducción del metabolismo de los espermatozoides (Leboeuf y cols., 2000) pero no queda totalmente detenido. Por esta razón, resulta de vital importancia conservar el semen en medios que le aporten nutrientes, siendo múltiples las variedades de diluyentes que se han desarrollado, pudiendo agruparse en diluyentes naturales y diluyentes sintéticos.

2.4.2.1. Diluyentes naturales

Dentro de los diluyentes naturales, el más comúnmente utilizado es la leche de vaca, bien entera, desnatada o en polvo para reconstituir. Con independencia de la presentación, debe ser calentada previamente a 92-95°C al baño María, para de esta forma inactivar la fracción proteica que podría resultar tóxica para los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1987).

Con el mismo fin pueden ser usadas las leches vegetales, como las de frutos secos (almendras, nueces, sésamo; Sabate, 2003) o legumbres, que pueden ser un sustituto igual de válido que la leche de vaca.

2.4.2.2. Diluyentes sintéticos

Los diluyentes sintéticos se caracterizan por contener amortiguadores como Tris o citrato, glucosa o fructosa como fuente de energía y yema de huevo para proteger la membrana del espermatozoide contra los bruscos cambios de temperatura (Evans y Maxwell, 1987). Los más habitualmente utilizados son aquellos a base de:

- Diluyente yema de huevo-tris-fructosa
- Diluyente yema de huevo-glucosa-citrato

2.5. CONSERVACION DEL SEMEN CAPRINO

2.5.1. SEMEN FRESCO

El almacenamiento del semen caprino conlleva un daño ultraestructural, bioquímico y funcional, en especial el conservado a temperaturas de congelación. Un problema específico para la conservación de semen caprino ha sido el detrimento que produce el plasma seminal en la viabilidad de los espermatozoides, específicamente cuando se conserva en un medio a base de yema de huevo o de leche (Iritani y cols., 1961). Las glándulas bulbouretrales secretan una enzima (lipasa) que interacciona con los constituyentes de la leche o la yema de huevo, provocando una intensa inhibición de la motilidad espermática (Leboeuf y cols., 2000).

Por esta razón, si el semen va a ser procesado (refrigeración y/o congelación) y requiere la adición de diluyentes que contengan yema de huevo o leche, es necesario retirar el plasma seminal presente en el eyaculado, mediante el lavado de los espermatozoides, justo tras su recogida (Pellicer, 1995). Mediante este proceso, conseguimos aumentar la vitalidad y la motilidad de los espermatozoides durante su almacenamiento en medios a base de yema de huevo o de leche (Corteel, 1975; Leboeuf y cols., 2000).

Los eyaculados obtenidos en la estación reproductiva contienen mayor cantidad de plasma seminal que los obtenidos durante la estación no reproductiva, y se observa una correlación negativa entre el volumen de plasma seminal en el eyaculado y el porcentaje de células móviles tras la conservación del mismo (Corteel, 1981).

En relación con el lavado, hay que señalar que se trata de un proceso complejo y lento, y también provoca una cierta pérdida de espermatozoides (Corteel, 1981). Además, no parece mejorar la fertilidad de los espermatozoides en razas caprinas de leche (Corteel, 1975) ni de lana (Ritar y SÁlamon, 1983).

Por otro lado, la viabilidad del semen conservado a temperaturas de 20-25°C, en diluyentes a base de leche (Paulenz y cols., 2005; Salvador y cols., 2006; Mara y cols., 2007) presenta valores inferiores al 50% tras 12 horas de conservación, alcanzando valores más bajos (que podrían limitar su aplicabilidad en condiciones de campo) tras 24 horas de preservación a temperatura ambiente.

2.5.2. SEMEN REFRIGERADO

El semen caprino se ha conservado a temperaturas de refrigeración que oscilan entre 2 y 15°C, pero sobre todo se ha evaluado entre 4-5°C (Leboeuf y cols., 2000). Se han testado números diluyentes, para definir *in vitro* la viabilidad y longevidad del semen, así como la fertilidad asociada.

De esta forma, se han evaluado diluyentes a base de citrato de sodio-yema de huevo, citrato de sodio-fructosa-yema de huevo, con leche entera, desnatada, o reconstituida, con o sin yema de huevo, CUE (Universidad Cornell Extender), Spermasol, Neoseminan,, entre otros muchos (Leboeuf y cols., 2000).

La fertilidad y vitalidad de los espermatozoides conservados a temperatura de refrigeración, en los diluyentes ya mencionados, durante 5 a 72 horas (Roca y cols., 1997; Leboeuf y cols., 2000; Paulenz y cols., 2005; Salvador y cols., 2006), muestran una gran variabilidad. La elevada variabilidad que se detecta en la viabilidad espermática del semen conservado como semen refrigerado, puede deberse a que la mayoría de los investigadores utilizan semen *sin lavar*. En consecuencia, las interacciones que el plasma seminal experimenta con la yema de huevo y los constituyentes de la leche presente en los diluyentes, puede terminar generando esa disminución de la viabilidad espermática, sobre todo cuanto más se prolongue esa interacción.

La mayoría de los resultados descritos para viabilidad y fertilidad de espermatozoides no lavados, conservados en refrigeración durante 5-8 horas son satisfactorios, pero períodos de almacenamiento superiores (por encima de 12-24 horas) muestran una reducción de la fertilidad (Leboeuf y cols., 2000; Paulenz y cols., 2005; Salvador y cols., 2006).

2.5.3. SEMEN CONGELADO

La congelación del semen es una herramienta que nos permite distribuir la calidad genética de un macho en el espacio y en el tiempo. No obstante, durante el proceso de congelación seminal, los espermatozoides se ven expuestos a múltiples agresiones físico-químicas que perjudican su integridad, disminuyendo considerablemente la fertilidad del semen.

2.5.3.1. Contrastación y selección de eyaculados

En el proceso de congelación seminal, es muy importante la fase de contrastación, ya que nos va a permitir seleccionar los eyaculados con mejor calidad y descartar aquellas muestras que no muestren unas características mínimas de calidad, ya que la supervivencia posterior a la congelación va a depender en gran medida de estos factores.

De manera general, las características seminales valoradas habitualmente antes de proceder a su crioconservación incluyen el volumen eyaculado, color, concentración espermática, motilidad masal, motilidad progresiva o individual, porcentaje de espermatozoides vivos, acrosomías y anomalías morfológicas (Memon y cols., 1985; Tuli y Holtz, 1994, 1995; Singh y cols., 1995; Karatzas y cols., 1997).

La mayoría de los autores consideran no aptos para la congelación, aquellos eyaculados con menos de $2.2-3.3 \times 10^9$ esp/ml (Memon y cols., 1985; Ritar y SÁlmon, 1991; Ritar y Ball, 1993), una motilidad masal inferior a 3 o 4 (Tuli y Holtz, 1992, 1994; Sinha y cols., 1995), una motilidad individual progresiva menor de un 70-80% (Memon y cols., 1985; Ritar y SÁlmon, 1991), un porcentaje de espermatozoides vivos inferior al 80% (Ritar y Ball, 1993) y/o un porcentaje de acrosomas normales por debajo del 80% (Pintado y Pérez, 1992)

2.5.3.2. Proceso y tasa de dilución

En los programas de inseminación artificial, la dilución del semen es un factor determinante en la calidad y aprovechamiento del eyaculado, de lo cual depende el número y concentración de las dosis seminales obtenidas por donante.

Para obtener una buena fertilidad en caprino, la dosis necesaria de espermatozoides se sitúa en torno a los 200-300 millones. Partiendo de esto, muchos autores diluyen el semen lo

suficiente para conseguir concentraciones que rondan los $400-600 \times 10^6$ esp/ml, en función del volumen eyaculado y la concentración inicial de éste (Memon y cols., 1985).

Sin embargo, otros autores emplean tasas de dilución constantes tras una verificación mínima de calidad, acelerando así todo el proceso (Chauhan y Anad, 1990; Sinha y cols., 1995). Las tasas de dilución empleadas oscilan entre 1:2 y 1:30 (Chauhan y Anad, 1990; Ritar y cols., 1990; Tuli y Holtz, 1992). Ritar y Ball (1993) comprobaron mejores resultados con una tasa de dilución 1:2 frente a 1:0.5 o 1:1, pero Ritar y cols. (1990) no encontraron diferencia alguna entre emplear tasas de dilución de 1:2 o 1:3.

Existen varios protocolos para realizar la dilución de los eyaculados. Muchos autores prefieren realizar una primera dilución que no incluya la fracción glicerolada del diluyente, con el fin de obtener una aclimatación progresiva de la célula al medio hiperosmótico que supone el medio glicerolado, evitando así la deshidratación celular (Tuli y Holtz, 1994). La adición de la fracción glicerolada se realiza posteriormente a temperaturas de refrigeración (Deja y Rao, 1986; Pintado y Pérez, 1992; Soderquist y cols., 1997). No obstante, existen evidencias que la adición del glicerol a 5°C no parece mostrar ventajas sobre la adición de la fracción glicerolada a 25-30°C (SÁlmon y Ritar, 1982; Tuli y Holtz, 1994; Leboeuf y cols., 2000). De hecho, muchos trabajos recientes realizan una primera dilución a temperatura ambiente, que no incluye glicerol y transcurrido un periodo no superior a 10-15 minutos tras esa primera dilución, se añade la fracción glicerolada también a temperatura ambiente (Cabrera y cols., 2005; Dorado y cols., 2009, 2010; Batista y cols., 2011, 2012). En cualquier caso, independientemente de la temperatura a la que se añada la fracción rica en glicerol, la mayoría de autores adicionan el diluyente glicerolado, en 2-3 pasos, con 10 minutos de intervalo entre fases, para favorecer la adaptación progresiva de los espermatozoides al medio con glicerol (Corteel 1980; Leboeuf y cols., 2000; Cabrera y cols., 2005).

2.5.3.3. Período de equilibrado

Tras la pertinente dilución (con su fracción glicerolada) y descenso de la temperatura de los eyaculados, el semen se mantiene a una temperatura constante de 4-5°C durante un período comprendido entre 2 y 6 horas, para permitir la reestructuración imprescindible de las membranas y dotar así a la célula de mayor resistencia frente a la congelación.

En las especies bovina y ovina, se recomienda equilibrar el semen de 1 a 5 horas a 5°C (Fiser y cols., 1984, 1986; Gillan y cols., 1997; Soderquist y cols., 1997), puesto que tiempos superiores a 5 horas resultan ser menos favorables que tiempos más breves. En la especie caprina, se han propuestos diferentes periodos de equilibrado previos a los procedimientos de congelación seminal. Deka y Rao (1986) ya proponían varios periodos de equilibrado (1, 3, 5 horas) y distintas concentraciones de glicerol, con mayores valores de calidad post-congelación en aquellas muestras equilibradas durante 5 horas. Existen autores que prefieren realizar un equilibrado en dos fases, que incluye un enfriamiento lento y progresivo, desde temperatura ambiente hasta los 4-5°C, y entonces mantener esta temperatura durante 2-3 horas más (Cabrera y cols., 2005; Batista y cols., 2012; Jiménez-Rabadán y cols., 2012). Otros autores prefieren, una vez completado el proceso de dilución, un periodo de equilibración de hasta 5 horas a 5°C, antes de proceder al proceso de congelación seminal (Hidalgo y cols., 2007; Dorado y cols., 2010). Menos frecuentemente, el semen diluido (sin glicerol) es enfriado directamente desde 37°C o temperatura ambiente (20-25°C) hasta los 4-5°C durante un periodo de 2.5 horas, para posteriormente adicionarle el diluyente de congelación (rico en glicerol) y ser equilibrado durante 30 minutos, antes de ser sometido a vapores de nitrógeno líquido (Memon y cols., 2011).

2.5.3.4. Métodos de envasado

Existen diferentes posibilidades para el envasado de las dosis seminales, si bien se pueden destacar básicamente el envasado en forma de *pellets* y el envasado en pajuelas.

El método de envasado en *pellets* fue diseñado por SÁlamon (1971). Consiste en pipetear de 0.1 a 0.3 ml de semen diluido y refrigerado a 4°C y depositarlo en agujeros hechos sobre la superficie de bloques de hielo carbónico (-79°C), para a continuación, almacenarlos en nitrógeno líquido. No obstante, el método más utilizado para el envasado del semen congelado son las pajuelas (0.25 y 0.50 ml) por su fácil identificación, manipulación, almacenamiento y descongelación (Hidalgo y cols., 2006; Jiménez-Rabadán y cols., 2012). Aunque existen diferentes opciones respecto a la concentración final de espermatozoides presentes en la pajuela, la mayoría de los autores suelen preferir trabajar con unas concentraciones finales entre 300-400 x 10⁶ espermatozoides/ml (Gacitua y cols., 2005; Batista y cols., 2012).

Se han realizado diferentes experiencias que comparaban la calidad seminal post-descongelación, en función del tipo de envasado utilizado. Los resultados no muestran resultados concluyentes; Maxwell y cols. (1995) concluyen que la fertilidad era mayor tras realizar inseminaciones con semen crio-conservado en *pellets*, en comparación con las muestras conservadas en pajuelas. No obstante, otros autores obtuvieron mejores resultados tras realizar inseminación con semen conservado en pajuelas (Bag y cols., 2004), mientras otros estudios no encontraron diferencias significativas tras realizar inseminación artificial con semen conservado mediante ambos métodos (Byrne y cols., 2000).

2.5.3.5. Congelación en nitrógeno líquido

Una vez que ha concluido el periodo de equilibrado, el procedimiento de congelación seminal se inicia sometiendo las muestras a vapores de nitrógeno líquido, durante un periodo de tiempo determinado. De manera habitual, las pajuelas se disponen horizontalmente, sobre una rampa o estante de metal extraíble que se introduce en una caja de poliestireno con nitrógeno líquido en su interior; de esta forma, las pajuelas quedan a una distancia entre 4 y 8 cm de la superficie del nitrógeno líquido, permitiendo que los vapores de nitrógeno, cuya temperatura oscila entre -120°C y -130°C , actúen sobre las dosis seminales (Tuli y Holtz., 1994; 1995; Cabrera y cols., 2005; Hidalgo y cols., 2007). El tiempo que las muestras seminales deben permanecer bajo los efectos de los vapores depende de las dimensiones de la caja, pero, de manera general, se encuentra entre 10 y 20 minutos (Karatzas y cols., 1997; Cabrera y cols., 2005; Batista y cols., 2009; Dorado y cols., 2009). Una vez transcurrido este periodo de tiempo, las muestras se sumergen en nitrógeno líquido a -196°C , donde permanecen almacenadas hasta el momento de su utilización (Lebouef y cols., 2000).

Otros trabajos reportan la utilización de máquinas automatizadas de congelación, que someten a las pajuelas a un descenso programado de la temperatura y que facilitan el manejo de las muestras; no obstante, mantienen una primera fase de disminución lenta de temperatura, para posteriormente introducir las pajuelas en nitrógeno líquido (Arav y cols., 2002; Gacitua y Arav, 2005)

El objetivo final de preservar el semen mediante congelación consiste en descender la temperatura del espermatozoide, con el fin de ralentizar su metabolismo hasta casi detenerse y

por tanto prolongar su viabilidad de manera indefinida. No obstante, incluso a temperaturas tan bajas como -196°C , se mantiene cierta actividad metabólica. De esta manera, Ritar y SÁlmon (1991) ya observaron una pérdida de motilidad durante la conservación del semen caprino en nitrógeno líquido durante un período de 6 meses, con independencia de si el semen había sido lavado o no antes del proceso de congelación. Deka y Rao (1986) detectaron también un aumento significativo de las anomalías espermáticas hasta los 12 meses de crio-preservación.

2.5.3.6. Congelación en ultracongeladores

Desde hace casi una década, se han realizado diferentes trabajos que han propuesto utilizar ultracongeladores de -152°C para la preservación de muestras seminales, tanto en la especie canina como en la especie caprina (Medrano y cols., 2002; Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006, 2009).

En estos protocolos, una vez transcurrido el correspondiente periodo de equilibrado, las muestras seminales pueden ser congeladas directamente en los ultra-congeladores, sin necesidad de ser sometidas a vapores de nitrógeno líquido (Medrano y cols., 2002; Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006). La curva de congelación presentaba un descenso lento de temperatura ($-5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$), desde 5°C a -10°C , seguido de un descenso rápido ($-25^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) desde -10°C hasta -100°C y, a partir de esta temperatura, una velocidad de congelación de $-10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ desde -100°C hasta -150°C (Álamo y cols., 2006; Batista y cols., 2006). Asimismo, se ha definido estrictamente (Medrano y cols., 2002) la influencia de la apertura repetida de la puerta del ultra-congelador sobre la temperatura de las muestras seminales, así como el tiempo máximo que se puede trabajar de manera efectiva, sin que la temperatura del ultra-congelador disminuya por debajo de -130°C (temperatura crítica de recristalización).

Los resultados de los diferentes estudios han permitido validar la eficacia de los ultra-congeladores de -152°C como técnica alternativa al nitrógeno líquido para la criopreservación de las muestras seminales, que mantienen unos parámetros de calidad similares a los obtenidos con nitrógeno líquido, tanto en la especie canina como en la especie caprina (Medrano y cols., 2002; Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006).

2.5.3.7. Transporte de semen congelado

El transporte del semen congelado se suele realizar mediante la utilización de crio-contenedores de nitrógeno líquido, que presentan una autonomía variable en función del recipiente, pero que no modifican las condiciones de temperatura de preservación (Hendricks y cols., 2010). De esta forma, los criocontenedores de nitrógeno líquido son el procedimiento de elección para el traslado de muestras seminales, tanto en transporte terrestre, como en transporte marítimo. No obstante, en los últimos años, el traslado aéreo de crio-contenedores conteniendo nitrógeno líquido se encuentra sujeto a regulación como material peligroso y, en consecuencia, el transporte aéreo de muestras congeladas de semen precisa de otras alternativas (Bielanski, 2005a), como son los criocontenedores de transporte seco.

Los criocontenedores de transporte seco (*dry-shippers*) presentan una cámara de almacenamiento (recubierta de una material hidrofóbico absorbente) que permite mantener una fase de vapor de aproximadamente -150 a -160°C (Bielanski, 2005a,b; Hendricks y cols., 2010). Esta temperatura puede ser conservada, sin necesidad de añadir cantidades adicionales de nitrógeno líquido, entre 3 y 7 días, dependiendo del tipo de recipiente y el tipo de dosis seminal conservada (Bielanski, 2005a,b; Nascimento y cols., 2010). Este tipo de contenedores limitan los riesgos asociados a la presencia de nitrógeno líquido (Hendricks y cols., 2010) y constituyen el procedimiento permitido por la IATA (International Air Transport Association) para el transporte de muestras biológicas que precisan ser conservadas a muy bajas temperaturas.

2.5.4. DESCONGELACIÓN Y CONTRASTACIÓN SEMINAL POST-DESCONGELACION

2.5.4.1. Procedimiento

Tradicionalmente, la descongelación del semen se realiza en baño María, a temperaturas de 30-40°C durante 10-120 segundos (Corteel, 1975; Ritar y SÁlamon 1991; Sinha y cols., 1995; Dorado y cols., 2007), con ventajas frente a la descongelación a temperatura ambiente o a 5°C.

En algunos trabajos se ha obtenido mejor calidad seminal con mayores velocidades de descongelación, comprendiendo temperaturas del orden de 55-70°C durante 7 segundos (Tuli y cols., 1991).

2.5.4.2. Contrastación del semen congelado-descongelado

A la hora de evaluar el semen congelado y descongelado, el factor mas estudiado es la motilidad, seguida por el porcentaje de acrosomías, la resistencia osmótica, el porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de anomalías espermáticas, actividad enzimática intracelular o extracelular y, finalmente, otras como la aglutinación o penetración de ovocitos.

La **motilidad** suele valorarse de forma similar a como se ha descrito para el semen fresco, pero con menores tasas de dilución (Tuli y cols., 1991).

Tras congelar y descongelar semen, la calidad del movimiento espermático se ve muy deteriorada. En el caso del semen de caprino, la calidad del semen descongelado suele quedar muy reducida comparada con la del mismo semen antes de ser congelado, con valores de motilidad desde el 20-30% (Corteel,1981) al 60-70% (Delgadillo y cols, 1991; Batista y cols., 2011), siendo lo más habitual encontrarla entre un 30 y un 60% (Sinha y cols., 1995; Hidalgo y cols., 2007; Dorado y cols., 2009)

Con respecto al porcentaje de **espermatozoides morfológicamente normales**, se suele determinar también mediante tinción supravital (Loubser y Van Niekerk, 1983; Ali y Mustafa, 1986; Skalet y cols., 1988) o la técnica de la “gota gruesa”, fijando la muestra de semen en solución de fosfato tamponada y glutaraldehido al 2% y a 37°C. A continuación, se realiza un recuento de 100-400 espermatozoides bajo el microscopio de contraste de fases a 1000 aumentos (Roca y cols., 1992a,b; Pérez y Mateos, 1996). Otros estudios utilizan la tinción

Spermac® para valorar el grado de espermatozoides anormales (Batista y cols., 2011), con una eficacia similar. Tras la descongelación, los valores medios de espermatozoides con morfoanomalías son muy variables, con valores que oscilan entre un 5 y un 25% (Singh y cols., 1995; Dorado y cols., 2007; Batista y cols., 2009, 2011).

El porcentaje de **espermatozoides con acrosoma normal** se determina mediante la prueba de la “gota gruesa”, valorando un número medio entre 100 y 200 espermatozoides (Memon y cols., 1985; Roca y cols., 1992b; Pérez y Mateos 1996), mediante tinción Giemsa (Deka y Rao, 1986, Singh y cols., 1995), o bien mediante la tinción Spermac® (Batista y cols., 2009, 2011). El porcentaje de acrosomas intactos en el semen descongelado varía según la literatura entre el 30 y el 40% (Dunner, 1993), incrementándose al 40-70% (Memon y cols., 1985; Batista y cols., 2009), mientras otros autores obtienen valores de un 70-90% de acrosomas normales (Sinha y cols., 1995; Batista y cols., 2011).

El porcentaje de **endósmosis** positiva se determina diluyendo una gota de semen (unos 50 µl) en 1 ml de una solución de citrato trisódico (1g/100ml) y fijando la muestra en glutaraldehído para observarla mediante microscopio de contraste de fases (Dunner y Vázquez, 1991).

La mayoría de los autores (Corteel, 1980, Singh y cols., 1995, Karatzas y cols., 1997) descartan para inseminación aquellas dosis que muestran valores de espermatozoides móviles inferior al 30-45% y/o la puntuación en motilidad menor de 3 (puntuando de 0 a 5).

2.6. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO EN LA ESPECIE CAPRINA

Los órganos del aparato reproductor femenino incluyen ovarios, oviductos, el útero, cuello uterino, la vagina y los genitales externos (Delgadillo, 2005).

2.6.1. OVARIOS Y OVIDUCTOS

Existe una íntima relación anatómica entre el ovario y el oviducto. En los rumiantes domésticos, el ovario se encuentra en una bolsa ovárica abierta, la cual consiste en un delgado pliegue peritoneal del mesosálpinx, que está unido a un asa suspendida en la porción superior del oviducto (Lyngset, 1968a).

El tamaño de los ovarios varía notablemente dependiendo de los estados de reposo o actividad sexual y también del momento del ciclo estral (fase folicular/fase luteal) en que se encuentre la hembra (Delgadillo, 2005). De manera general, los ovarios son alargados, planos, con un tamaño medio de 2-3 cm x 2-2.5 cm (Lyngset, 1986; Garrett, 2001).

Los oviductos son unos conductos estrechos, sinuosos, de naturaleza músculomembranosa, que siempre se localizan adyacentes al ovario correspondiente (Delgadillo, 2005). Representa la estructura responsable de la captación del óvulo (mediante un ensanchamiento a modo de embudo denominado infundíbulo), así como constituye la región donde se produce la fecundación y las primeras fases de desarrollo del embrión, antes de que desemboque en el útero, a través de la extremidad ístmica del oviducto (Smith, 1980).

2.6.2. ÚTERO

El útero, en el caso de los rumiantes, se encuentra casi enteramente dentro de la cavidad abdominal (Constantinescu, 2001). El cuerpo del útero es relativamente corto y su longitud no suele ser superior a 2 cm de largo. Los cuernos uterinos tienen de 10 a 12 cm de largo y están dispuestos de forma que, en su unión con las trompas uterinas, no existe una distinción clara entre ellos. Forman una espiral cerrada de 2.5 cm o más y sus extremos caudales aparecen unidos (Lyngset, 1986; Smith, 1986).

La cubierta muscular del útero (miometrio) está formada por una capa longitudinal externa y dos estratos circulares. La mucosa (endometrio) de los cuernos y cuerpo presentan,

como hecho característico, las carúnculas uterinas que son prominencias ovales, distribuidas irregularmente sobre la superficie uterina (Delgadillo, 2005).

2.6.3. CUELLO UTERINO

El cuello del útero es una estructura parecida a un esfínter que se proyecta caudalmente hacia el interior de la vagina. Se caracteriza por presentar una pared gruesa y una luz estrecha (Smith, 1986). En los rumiantes, presenta unas prominencias con forma de bordes transversales o alternados en espiral que se conocen como anillos cervicales, cuya función es cerrar completamente el cuello del útero (Constantinescu, 2001). El orificio uterino externo se halla en la parte ventral de la vagina.

Esta estructura anatómica se encuentra perfectamente cerrada, excepto durante el estro, cuando se relaja ligeramente y permite la entrada de los espermatozoides en el útero (Lyngset, 1968a).

2.6.4. VAGINA

Es el órgano tubular que, como continuación del útero, se extiende longitudinalmente por la cavidad pelviana, interpuesto entre el recto dorsalmente y el cuello de la vejiga y uretra centralmente (Garrett, 2001). En el caso de los pequeños rumiantes tiene una longitud aproximada de 10 a 15 centímetros de largo (Delgadillo, 2005). Solo el tercio craneal aparece englobado por el peritoneo, ya que hasta aquí se prolonga caudalmente el mesometrio, quedando los dos tercios restantes en posición retroperitoneal (envueltos en túnica adventicia).

La parte más craneal del interior del órgano corresponde al *fórnix vaginal*, o sea, a la hendidura circular que circunscribe la porción vaginal del cuello uterino. Este fórnix presenta gran número de rugosidades vaginales en el caso de los rumiantes (Smith, 1986).

2.6.5. GENITALES EXTERNOS

El vestíbulo, los labios mayores, labios menores, el clítoris y las glándulas vestibulares constituyen los genitales externos (Constantinescu, 2001).

El vestíbulo vaginal es corto, de unos 2.5 a 3 cm de longitud. Las glándulas vestibulares mayores son inconstantes en el caso de los pequeños rumiantes (Smith, 1986). Cuando existen pueden tener el tamaño de un guisante en la oveja y no encontrarse presentes en la cabra. En el vestíbulo vaginal se produce la desembocadura de la uretra, representando por tanto un área anatómica común de los aparatos genital y urinario (Smith, 1980; Garrett, 2001).

La comisura ventral del vestíbulo oculta el clítoris, que está compuesto de tejido eréctil cubierto de epitelio escamoso estratificado, con abundantes terminaciones nerviosas sensoriales. Es corto en el caso de los pequeños rumiantes y las glándulas están ocultas por la fosa clitoridiana (Smith, 1986).

El integumento de los labios mayores está ricamente poblado por glándulas sebáceas y tubulares. Contiene depósito de grasa, tejido elástico y una capa delgada de músculo liso; en su superficie exterior tiene la misma estructura que la piel externa. Los labios menores tienen un núcleo de tejido conectivo esponjoso; la unión de los labios termina constituyendo la hendidura vulvar que aparece más abierta dorsalmente (Garrett, 2001).

2.7. EL CICLO ESTRAL EN LA CABRA

2.7.1. ESTACIONALIDAD

Los animales de la especie caprina, desde el punto de vista reproductivo, se definen como animales poliéstricos estacionales, es decir, presentan una época de actividad reproductiva caracterizada por la aparición de ciclos sucesivos y un período de reposo sexual, denominado anoestro estacional. Por otro lado, hay razas sin una definición clara de la estacionalidad, localizadas principalmente en regiones ecuatoriales.

La estacionalidad esta básicamente regida por el fotoperiodo. La respuesta reproductiva al fotoperiodo esta mediada por la glándula pineal a través de la secreción de melatonina; esta secreción es alta durante la noche y baja durante el día (Maeda y cols., 1984). En los días largos existe menor secreción de melatonina, mientras en días cortos se genera una más prolongada secreción de melatonina. En el hemisferio norte, el período reproductivo comienza con el solsticio de verano, que es cuando comienza el fotoperíodo decreciente y dura hasta el solsticio de invierno, cuando comienza el fotoperíodo creciente (Shelton, 1978). De esta forma, en

latitudes templadas, la mayor parte de las cabras son anovulatorias y no presentan celos durante primavera y verano (Febrero-Agosto), pero comienzan a ciclar cuando la duración del día disminuye. Conforme las noches se alargan, el incremento en la duración de la secreción de melatonina parece que estimula una respuesta endocrina que genera el inicio de la estación reproductiva y el estro en las hembras.

En las zonas tropicales, donde hay menor variación de la duración del día, las cabras tienden a reproducirse todo el año, presentando en todo caso, un anoestro breve y poco intenso (Tielgy y cols., 1982).

2.7.2. PUBERTAD

Las cabras tienden a alcanzar la pubertad entre los 6 y los 8 meses de edad, si bien existen notables variaciones en función de la raza, alimentación, peso corporal y momento del nacimiento.

Las cabras europeas con una correcta alimentación alcanzan la pubertad a los 6-7 meses, si bien no es conveniente cubrir a los animales hasta que hayan alcanzado un mínimo del 60% de su peso adulto, para conseguir una mejor tasa de fertilidad y no comprometer su futuro reproductivo (Pineda, 1989).

El momento de nacimiento tiene influencia sobre la aparición de la pubertad. De esta manera, en razas de latitudes templadas, aquellas cabras que nacen en primavera pueden alcanzar la pubertad a los 6-7 meses, puesto que cuando alcanzan la edad y el peso adecuados, ya se encuentran en plena estación reproductiva. Sin embargo, los animales nacidos en otoño, pueden no alcanzar la pubertad hasta los 10-12 meses de edad, puesto que cuando adquieren la edad y el peso adecuado de la pubertad, se encuentran en anoestro estacional (Pineda, 1989).

2.7.3. CICLO ESTRAL

El ciclo estral, también denominado ciclo ovárico o ciclo sexual, se puede definir como el ciclo biológico reproductivo de la hembra, cuyo acontecimiento central es la ovulación o liberación de un oocito maduro del folículo preovulatorio (Illera, 1994).

La duración del ciclo estral en la mayoría de las razas caprinas se estima entre 19-21 días (Shelton, 1978; Song y cols., 1984a), aunque puede oscilar de forma normal entre 18 y 22 días (Fredriksson y cols., 1984; Chemineau, 1986). En la raza Majorera, la duración media del ciclo estral se ha definido en 21.8 ± 0.9 días (Batista y cols., 1999).

La duración del ciclo estral suele ser muy irregular al comienzo y al final de la estación reproductiva, sobre todo en hembras jóvenes (Smith, 1986). Al inicio de la estación reproductiva, las cabras presentan pocas ovulaciones silenciosas, pero hay una incidencia relativamente alta de ciclos cortos, con intervalos inter-estro de unos 8 días, debido a una corta fase luteal de 5-6 días (Bretzlaff y cols., 1988). Tras estos ciclos cortos se instaura una actividad cíclica normal.

La longitud del ciclo puede modificarse por diferentes factores. El alojamiento de las hembras con los machos, al comienzo de la estación reproductiva, parece acortar la duración del ciclo estral (Shelton, 1978). Asimismo, factores climatológicos adversos como temperaturas frías o muy altas, humedad relativa baja, pueden incrementar el porcentaje de ciclos estrales de menor duración (Singh y cols., 1995).

2.7.3.1. Estro

El celo o estro se define como el intervalo de tiempo durante el cual la cabra permite la monta y cubrición del macho (Mori y Kano, 1984; Metha y cols., 1991; Llewelyn y cols., 1993). La duración media del celo se viene a situar en torno a las 36 horas (Shelton, 1978), con variaciones entre 26 y 40 horas (Hulet y Shelton, 1984). Mayores duraciones del celo se han descrito en diferentes razas caprinas, como la raza Majorera con 42 horas (González, 1995) y en la raza Nubian con 67 horas (Camp y cols., 1983).

La duración del celo puede verse modificada por diferentes factores. Se ha confirmado una menor duración del celo en cabras nulíparas que en cabras múltiparas (Cerbito y cols., 1995), y al igual que en la oveja, parece que en aquellas razas más prolíficas, la duración del celo es mayor que en razas con una menor tasa de ovulación (Pathiraja y cols., 1991). Del mismo modo, si las cabras son cubiertas durante el celo, éste se puede acortar (Romano, 1994).

2.7.3.2. Fase folicular

La fase folicular, definida como el periodo comprendido entre la luteolisis y la ovulación, tiene una duración media de 4-5 días. Tras la regresión luteal, se reducen los niveles plasmáticos de progesterona y desaparece el efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de LH (Goodman y Karsch, 1980), lo cual va a provocar el aumento de la concentración basal de LH (Baird y Scaramuzzi, 1976).

Los niveles de estrógenos comienzan a ascender unas 48 horas antes a la onda preovulatoria de LH. El aumento de los niveles de estrógenos coincide con una disminución de los niveles plasmáticos de progesterona, consecuencia de la luteolisis (Bono y cols., 1983; Smith, 1986), que ocurre de 1 a 3 días antes del estro. El pico de LH tiene lugar entre 6 y 24 horas después del comienzo de los síntomas del celo y sobre las 60-65 horas del inicio de la luteolisis (Llewelyn y cols., 1993; González, 1995). La duración del pico preovulatorio de LH es de unas 9-10 horas. El período de tiempo comprendido entre el pico preovulatorio de LH y la ovulación es relativamente constante, entre 20 y 25 horas, por lo que la ovulación acontecerá al final del celo o justo inmediatamente tras el mismo (Mori y Kano, 1984; Greyling y Van-Niekerk, 1990; González, 1995).

2.7.3.3. Fase luteal

La fase luteal, definida como el período de tiempo comprendido entre la ovulación y la luteolisis, tiene una duración media de 16-17 días en la especie caprina. Se caracteriza por un incremento progresivo de los niveles plasmáticos de progesterona (González, 1995). A partir de los días 5-6 tras el inicio del celo y hasta el momento de la luteolisis, estos niveles se mantienen en unos valores funcionales, que varían dependiendo del número de cuerpos lúteos funcionales (Fredriksson y cols., 1984; Sawada y cols., 1995).

La lisis del cuerpo lúteo y el inicio de una nueva fase folicular, se produce de manera consecutiva a una liberación de prostaglandinas durante varios días. Asimismo, se produce una síntesis de oxitocina de origen luteal en el momento de la luteolisis que estimula la síntesis de prostaglandina F-2alfa (PGF_{2α}) que, a su vez, favorece la síntesis de oxitocina luteal; de esta manera, se establece un circuito de retroalimentación positiva mutua (Freeman y Currie, 1985; Homeida y Cooke, 1989; Homeida y Khalafalla, 1990).

2.8. TRATAMIENTOS DE INDUCCIÓN DEL CELO Y OVULACIÓN EN LA ESPECIE CAPRINA

2.8.1. INDUCCIÓN DEL ESTRO CON OVULACIÓN

La inducción del estro con ovulación se realiza cuando los animales están en anoestro y por lo tanto, está bloqueado el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y no hay secreción apropiada de gonadotropinas. Entre los tratamientos de inducción de la actividad sexual aplicables en el ganado caprino se pueden incluir el efecto macho, el control del fotoperiodo y los tratamientos hormonales.

2.8.1.1. Inducción del estro con ovulación mediante el efecto macho

El “efecto macho” puede definirse como la inducción de la ovulación y las manifestaciones estrales, tras la introducción súbita de machos en un rebaño de hembras no cíclicas, tras un período de completa separación de, al menos, 3 semanas (Corteel y cols., 1982; Chemineau, 1985).

En aquellos rebaños donde el macho permanece todo el año con las hembras, puede resultar difícil que llegue a presentarse la estimulación de manera efectiva. Esta mayor eficacia se obtiene cuando la separación entre machos y hembras es total, no debiendo existir ningún tipo de interacción visual, olfativa o auditiva (Bondurant y cols., 1986); asimismo, también se ha puesto de manifiesto que el macho debe ser sexualmente activo en el momento de su introducción (Rodríguez y cols., 2002) para incrementar su eficacia. No obstante, este efecto puede ser también inducido con machos castrados o hembras a las cuales se les aplica un tratamiento corto con testosterona o estrógenos, obteniendo una respuesta semejante (Lynch y cols., 1992; Vandenberg, 1994).

El contacto con los machos induce en las hembras un rápido y brusco incremento en la frecuencia y amplitud de los pulsos plasmáticos de LH. Este incremento de la actividad hipofisaria estimula el crecimiento folicular ovárico, desencadenándose entonces la descarga masiva de GnRH y la consecuente onda preovulatoria de LH a nivel hipofisario (Ott y cols., 1980; Chemineau 1983, 1987). Estas modificaciones a nivel hipotálamico-hipofisario y ovárico se traducen en la presentación de ovulaciones y manifestaciones estrales en un muy importante porcentaje de hembras, en un plazo entre 3-6 días (Ott y cols., 1980; Chemineau 1983, 1987)

El grado de respuesta al efecto macho viene determinado por el momento de la ovulación, la aparición de manifestaciones estrales asociadas a esa primera ovulación y la frecuencia de ciclos cortos. Estos parámetros son dependientes de diferentes factores, que se pueden agrupar en dos categorías: la profundidad del anoestro y la intensidad del estímulo. De esta manera, a mayor profundidad del anoestro se obtiene un menor grado de reactivación ovárica (Chemineau, 1985). Asimismo, la intensidad del estímulo ejercido por los machos sobre las hembras tiene su reflejo sobre la presentación de ovulaciones y manifestaciones estrales (Chemineau, 1987; Walkden-Brown y cols., 1999).

El principal inconveniente que implica el efecto macho es la falta de sincronización de celos que genera, lo que convierte a esta técnica en algo arriesgada para asociarla a la inseminación artificial. Una solución para minimizar este problema sería aplicar un tratamiento con progestágenos en las hembras anovulatorias, antes de la introducción de los machos, o bien la inyección de progestágeno justo en el momento de la entrada de los machos (Chemineau, 1985). Este tratamiento evita la aparición del primer ciclo acortado y se consigue una mayor sincronización de celos y ovulaciones.

2.8.1.2. Inducción del estro con ovulación mediante el control del fotoperiodo

La estación reproductiva en los pequeños rumiantes coincide con los días decrecientes del año. Sin embargo, esta actividad reproductiva solo tendrá lugar en los días cortos, si antes ha existido un periodo de días largos. En los días largos existe una más breve secreción de melatonina por parte de la glándula pineal, mientras en los días largos se genera una más prolonga secreción de melatonina (Karsch y cols., 1984; Abecia y cols., 2012). Mediante la regulación del fotoperiodo y la administración exógena de melatonina sería posible modificar la estacionalidad reproductiva y acortar el periodo de anoestro estacional en la especie caprina (Malpoux y cols., 1997).

Existen numerosos protocolos para inducir un adelanto de la estación reproductiva, en el que el control del fotoperiodo y la administración exógena de melatonina están implicados. La mayoría de esos tratamientos tienen en común que constan de un primer periodo de días largos artificiales y una segunda fase de días cortos artificiales (Chemineau, 1986; Zarazaga y cols., 2011, 2012).

Un tratamiento tradicional consiste en la administración de un régimen de extra-iluminación durante 2 meses, comenzando en enero y finalizando a principios de marzo. Esta manipulación luminosa externa es integrada por el animal de la misma forma que si hubiese recibido 16 horas diarias de luz. Tras estos días largos artificiales es necesario instaurar los días cortos artificiales, que se pueden simular mediante la administración exógena de melatonina que crea en el animal un estado fisiológico de días cortos, durante un periodo de tres meses (desde principios de marzo hasta principios de junio). Mediante este protocolo se consigue adelantar la estación reproductiva de 60 a 90 días, y asociado al efecto macho permite la presentación de hasta un 90% de celos y más de un 70% de fertilidad (Chemineau, 1986, 1996; Zarazaga y cols., 2009).

2.8.1.3. Inducción del estro con ovulación mediante tratamientos hormonales

La administración de progestágenos junto con gonadotropinas exógenas induce la ovulación y las manifestaciones estrales en la mayoría de las cabras sometidas a tratamiento, ya sea durante el anoestro o la estación reproductiva (Abecia y cols., 2011). En estos tratamientos, los progestágenos tienen como función estimular al hipotálamo para sensibilizarlo a la acción de los estrógenos, presentándose un estro manifiesto. Por otro lado, las gonadotropinas tienen como función madurar folículos que pueden terminar ovulando.

El tratamiento progestágeno se administra en la mayoría de los casos mediante la colocación de una esponja intravaginal de poliuretano impregnada con el progestágeno (Ritar y cols., 1984), simulando de esta forma la fase luteal del ciclo. Los progestágenos más habitualmente utilizados son el acetato de fluorogestona (FGA, 20-45 mg) y el acetato de medroxi-progesterona (MAP, 45-60 mg), si bien parece existir un mayor grado de sincronización del celo y la ovulación en tratamientos a base de FGA (Gordon, 1996; González y cols., 2001; Bartlewski y cols., 2004). El modelo tradicional de tratamiento incluye la administración de un progestágeno durante un periodo de 11 días (tratamiento corto) o de 17-21 días (tratamiento largo).

La administración de gonadotropinas exógenas consiste en la aplicación de gonadotropina coriónica equina (eCG) y se traduce en un acortamiento de la fase folicular del ciclo inducido, una más rápida maduración del folículo ovulatorio y una mayor tasa de ovulación (Powell y cols.,

1996). La respuesta ovulatoria es mejor si se administra la eCG unas 48 horas antes de la retirada del progestágeno (Ritar y cols., 1984). La dosis de eCG a aplicar varía mucho dependiendo de las razas involucradas y la profundidad del anoestro, si bien se toma como referencia la administración de 200-600 UI de eCG, aplicadas por vía IM (Ritar y cols., 1984; Gordon, 1996; González y cols., 2004; Batista y cols., 2009).

2.8.2. SINCRONIZACIÓN DEL ESTRO CON OVULACIÓN

A diferencia de la inducción del estro, la sincronización se realiza cuando las cabras presentan actividad reproductiva y tienen el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal activo, por lo tanto, los ovarios presentan cuerpos lúteos o folículos maduros. Existen dos mecanismos fisiológicos básicos para sincronizar el estro (Hunter, 1982), uno a base de la aplicación de progestágenos y otro con la administración exclusiva de prostaglandinas.

2.8.2.1. Sincronización del estro con ovulación utilizando progestágenos

La aplicación de progestágenos durante un período de 11-17 días es suficiente para conseguir una sincronización de celos durante la estación reproductiva (Gordon, 1996). Sin embargo, los protocolos que incluyen la aplicación de progestágenos durante 11 días simulan una fase luteal más corta de la que acontecería en condiciones normales. Esto podría generar que la inserción de la esponja podría coincidir con la existencia de un cuerpo lúteo en sus primeras fases; al retirar la esponja, la acción del cuerpo lúteo podría prolongarse más allá de la actividad del progestágeno, no se induce la luteolisis y por tanto, no se obtendría una buena sincronización. Por esta razón, estos protocolos cortos (11 días) se deben acompañar de la administración de prostaglandinas o análogos, que se suelen administrar 48 horas antes de la retirada de las esponjas (Gordon, 1996; Abecia y cols., 2012), con objeto de asegurar la luteolisis, si existiera un cuerpo lúteo funcional a la retirada de la esponja.

Por otro lado, con independencia de la duración del tratamiento progestágeno, estos protocolos se suelen complementar con la administración de gonadotropinas exógenas (eCG), que se administran en el momento de la retirada de las esponjas o bien 48 horas antes (Ritar y cols., 1984; Batista y cols., 2009). La administración de gonadotropinas se realiza, no con el objetivo de estimular una maduración folicular ovárica que ya está presente sino, para conseguir una más fuerte respuesta ovulatoria y un mayor grado de sincronización (Gordon, 1996). En

cualquier caso, la dosis de eCG que se administra suele ser menor a la que se emplea en anoestro (Gordon, 1996).

2.8.2.2. Sincronización del estro con ovulación utilizando prostaglandinas F_{2α}

La administración de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) o sus análogos generan la luteolisis, reduce la progesterona plasmática y por tanto, induce una fase folicular con ovulación (Abecia y cols., 2011, 2012). El éxito del tratamiento con estos agentes está supeditado a la presencia real de un cuerpo lúteo. El cuerpo lúteo es sensible a la acción luteolítica de la prostaglandina desde el día 3-4 del ciclo estral hasta el momento de la luteolisis natural (Rubianes y cols., 2003). Por tanto, estos protocolos solo serán aplicables en animales cíclicos y que presenten cuerpo lúteo en el momento de la administración.

El protocolo habitual consiste en la administración de dos dosis de PGF_{2α} o análogos, separados entre sí unos 11 días (Ott y cols., 1980). De este modo, aquellas hembras en las que la primera aplicación de prostaglandinas no genere la lisis del cuerpo lúteo (por hallarse en fase folicular), tras la segunda aplicación de la prostaglandina si va a coincidir en todas las hembras con la presencia de un cuerpo lúteo en el ovario, provocando su actividad luteolítica y la aparición de un celo sincronizado. Los signos de celo se presentan entre 50-60 horas tras la administración de las prostaglandinas (Ott y cols., 1980; González y cols., 2000).

2.9. GESTACIÓN Y SU DIAGNÓSTICO EN LA CABRA

2.9.1. FISIOLÓGÍA DE LA GESTACIÓN

2.9.9.1. Progestación

La fecundación se define como la interacción y la posterior fusión de los pronúcleos masculino y femenino. Este proceso culmina con la formación de una célula única que constituye un nuevo individuo, denominado de forma convencional cigoto, el cual posee una dotación genética biparental (King y Thatcher, 1993). Una vez producida la fecundación, y para que tenga lugar el consecuente desarrollo embrionario, es necesario que se produzca el reconocimiento maternal de la gestación.

El ciclo estral en la especie caprina tiene una duración media de 20-21 días. En las hembras no gestantes, la luteolisis es inducida por la liberación endometrial de prostaglandina F-2alfa (PGF-2alfa) al final de la fase luteal, que genera un rápido descenso de la progesterona plasmática hasta alcanzar niveles basales, representando el inicio de nuevo ciclo estral (McCracken y cols., 1984).

No obstante, si la hembra está gestante, desde el trofoectodermo del embrión se generan una serie de señales biológicas para prolongar la vida del cuerpo lúteo y mantener los niveles de progesterona en niveles suficientes que permitan el desarrollo de la gestación (Bazer y cols., 1996). Estos niveles de progesterona mantienen la funcionalidad endometrial necesaria para el desarrollo embrionario temprano, la implantación, la placentación y el subsecuente desarrollo feto-placentario. Este proceso, donde el embrión debe manifestar su presencia para sobrevivir, se denomina reconocimiento maternal de la gestación (King y Thatcher, 1993). En el caso de la cabra, acontece alrededor del día 17 y el embrión caprino secreta interferon tau (IFN- τ) entre los días 14 y 17 post-fecundación, que actúan como señal antiluteolítica (Guillomot y cols., 1998).

Respecto a la placentación, el elemento más singular en la placenta de los rumiantes es la presencia de células binucleadas en el trofoectodermo. Las células binucleadas están directamente implicadas en la producción de diferentes compuestos como progesterona (Wango y cols., 1991; Wooding y cols., 1996), lactógenos placentarios (Wooding, 1992) y glicoproteínas asociadas a la gestación (Zoli y cols., 1992).

Desde el punto de vista de la naturaleza y extensión de la unión entre las estructuras materna y fetal, la placenta de los rumiantes puede definirse como cotiledonaria (King y Thatcher, 1993). Estos cotiledones son estructuras redondeadas u ovals resultado de la concentración y alta vascularización de las vellosidades de la membrana alantocoriónica. Estos cotiledones interactúan con las regiones carunculares del endometrio materno para formar los placentomas. Concretamente, el epitelio uterino desaparece y el trofoectodermo se asienta directamente sobre el endometrio materno; por esta razón, la placenta ha sido definida como sindesmocorial. No obstante, en pequeños rumiantes se ha aceptado que el término más adecuado para clasificar este tipo de placentas es el de sinepiteliocorial (Wooding, 1992), indicativo que, por una parte, existe una capa resultante (Wooding, 1992) de la fusión de células binucleadas fetales y epitelio materno (sinepitelio-) y, por otro lado, persiste la capa puramente fetal (-corial).

2.9.2. ENDOCRINOLOGÍA DE LA GESTACIÓN EN PEQUEÑOS RUMIANTES

2.9.2.1 Progesterona

En la especie caprina, al igual que en la casi totalidad de mamíferos domésticos, se precisan de concentraciones elevadas de progesterona plasmática para el establecimiento y mantenimiento de la gestación. El cuerpo lúteo permanece como la principal fuente de progesterona a lo largo de toda la gestación en las cabras gestantes (Gordon, 1996).

En la cabra, durante los primeros 15 días de gestación, los niveles plasmáticos de progesterona son similares a los observados en cabras en fase luteal. A partir de este momento comienzan a incrementarse, alcanzando su nivel máximo hacia el tercer mes de gestación, permaneciendo posteriormente en un nivel constante (Sousa y cols., 1999). Unos días antes del parto, comienza un ligero descenso que se transforma en una brusca caída, coincidiendo con el parto (Sousa y cols., 1999).

La regulación de la secreción luteal de progesterona acontece básicamente por la acción de la LH (Camp y cols., 1983; Bretzlaff y cols., 1988), si bien su acción es apoyada de forma sinérgica por la prolactina, tanto en cabras cíclicas como en cabras gestantes (Denamur, 1974; Buttle y Morant, 1983).

2.9.2.2. Estrógenos

La fuente de estrógenos durante la gestación de los rumiantes es básicamente de origen placentario (King y Thatcher, 1993; Sawada y cols., 1995), y su concentración es un buen reflejo de la salud placentaria (Guilbault y cols., 1985).

En la cabra gestante, los estrógenos aumentan progresivamente entre los días 30 y 40 de gestación, para alcanzar su máximo valor justo antes del parto (King y Thatcher, 1993). Concretamente, la estrona constituye uno de los principales estrógenos en el plasma (Dhindsa y cols., 1981) y sus concentraciones plasmáticas se incrementan al inicio de la gestación y permanecen altas hasta el final de la misma, alcanzando un pico máximo poco antes del parto y descendiendo abruptamente tras el mismo (Sawada y cols., 1995).

2.9.2.3. Lactógenos placentarios

Los lactógenos placentarios son compuestos sintetizados en las células binucleadas del corion (Wooding, 1992) y con una estructura similar a la prolactina. Entre otras funciones, los lactógenos placentarios participan en la mamogénesis y lactogénesis (Forsyth, 1986), la esteroidogénesis ovárica y placentaria, el crecimiento fetal (Chene y cols., 1988) y participan en la regulación del metabolismo de la hembra gestante.

Los lactógenos placentarios son detectados en el plasma de las cabras gestantes desde el día 44 de gestación (Currie y cols., 1990), su concentración va incrementándose conforme avanza la gestación, alcanzando niveles máximos a partir de la segunda mitad, y mostrando un descenso gradual durante las últimas semanas de gestación. Asimismo, se ha comprobado que la concentración es mayor en gestaciones múltiples que en simples (Currie y cols., 1990).

2.9.2.4. Prolactina

La prolactina, hormona de origen hipofisario, estimula la síntesis de grandes cantidades de grasa, lactosa y caseína en las células secretoras mamarias (Gordon, 1996). En la especie caprina, los niveles de prolactina son basales durante la mayor parte de la gestación, consecuencia del efecto inhibitor de los niveles elevados de estrógenos y progesterona, que vuelven a la glándula mamaria refractaria a la acción estimulante de la prolactina (King y Thatcher, 1993). En las últimas semanas de gestación, sus valores comienzan a incrementarse,

alcanzando sus niveles máximos unos pocos días antes del parto (Currie y cols., 1988; Kornalijnslijper y cols., 1997).

Como ya se ha indicado, la prolactina también interviene en la regulación de la vida media del cuerpo lúteo constituyendo, conjuntamente con la hormona luteinizante (LH), el denominado complejo luteotrófico (Buttle y Morant, 1983).

2.9.3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN

La duración media de la gestación en la mayoría de las razas caprinas se sitúa cercano a los 151 días (Asdell, 1964), con un rango que comprende entre 147 y 155 días. Entre los factores que modifican la duración de la gestación se encuentran la edad de los animales y el número de fetos presentes. De esta manera, la duración de la gestación es más prolongada en animales adultos que en hembras jóvenes (Asdell, 1964), mientras existe una correlación negativa entre la duración de la gestación y el número de productos que gestea la cabra (Sambraus y Wittmann, 1993).

La identificación rápida y fiable de la gestación tiene una importancia esencial en el manejo de los pequeños rumiantes. El diagnóstico de gestación permite una organización que mejora la rentabilidad de la producción en los rebaños, con evidentes ventajas prácticas y económicas (Restall y cols., 1990; Wani y cols., 1998). Entre otras ventajas, se pueden señalar la alimentación del ganado acorde a su estado productivo, la distribución de las parideras anuales, la identificación de animales infértiles o subfértiles, así como una previsión fiable de la producción de leche/carne.

De forma general, las técnicas de diagnóstico de gestación se pueden agrupar en dos categorías: métodos clínicos y métodos laboratoriales. Existen numerosos métodos clínicos, si bien los más frecuentemente utilizados son el no retorno al celo, palpación y distensión abdominal (Pratt y Hopkins, 1975) y diagnóstico de gestación mediante ultrasonidos (Haibel, 1990; Bretzlaff, 1993). Entre los métodos laboratoriales podemos citar la determinación de niveles plasmáticos de estrógenos, progesterona y proteínas específicas de la gestación (Murria y Newstead, 1988; Ruder y cols., 1988; González y cols., 1999, 2001).

La elección del método adecuado depende del estado de gestación. Unos métodos presentan una mayor precisión en el diagnóstico precoz de gestación, mientras que otros métodos son más adecuados para el diagnóstico en gestaciones avanzadas (Bernard, 1994).

2.9.3.1. Métodos clínicos

I. No retorno al celo

El sistema más elemental para diagnosticar la gestación en los pequeños rumiantes se basa en la incompatibilidad entre la presencia del celo y la gestación. Las hembras que presenten manifestaciones estrales generalmente no están gestantes, mientras que la ausencia de síntomas de celo después del período de cubrición, puede ser indicativa de gestación. La técnica de no retorno al celo debe efectuarse coincidiendo con el final del ciclo estral consecutivo a la cubrición o IA, alrededor de 20-22 días en el caso de la especie caprina (Gordon, 1996)

Esta técnica, aparentemente eficaz y sencilla, en la práctica aporta resultados poco concluyentes, ya que produce un elevado porcentaje de diagnósticos falsos positivos y falsos negativos (Corteel y cols., 1982; Restall y cols., 1990). Entre falsos positivos (cabras que no manifiestan celos, pero no se encuentran gestantes), se pueden citar aquellas situaciones donde el chequeo de celos no se haga de manera rigurosa, al comienzo o final del periodo de celo, cuando las hembras requieran de una gran insistencia para manifestar el celo; asimismo, cuando se induce la reactivación ovárica durante el anoestro estacional, la ausencia de celo puede indicar simplemente que la hembra ha retornado a su condición de anoestro (Gordon, 1996). Del mismo modo, aquellas hembras con ciclos alargados o acortados, con cuerpo lúteo persistente, quistes ováricos luteinizados o hidrómetra, pueden inducir también diagnósticos falsos positivos de gestación, cuando se realizan entre los 20 y 22 días (Smith, 1986; Williams, 1986; Restall y cols., 1990; Gordon, 1996).

Como falsos negativos (cabras que manifiestan celos, pero se encuentran gestantes) podemos citar aquellas situaciones donde los animales son identificados por error (p.e. marcados por el macho) y menos frecuentemente, en aquellas cabras que aún presentando síntomas de celo, podrían estar gestantes (Williams, 1986).

II. Ultrasonografía

La ecografía es un procedimiento fiable y práctico para el diagnóstico de gestación en los pequeños rumiantes. Entre las diferentes alternativas, distinguimos la ultrasonografía en modo-A, que detecta las interfases de los tejidos mediante diferentes resistencias acústicas (Lindhal, 1972), y el sistema Doppler basado en la detección de la circulación fetal o de los movimientos fetales (Wani, 1981; Berkley, 1982). Sin embargo, la ultrasonografía en tiempo real (modo B), ofrece sin lugar a duda, la vía más efectiva para el diagnóstico precoz de gestación (Taverne, 1984).

Mediante el sistema de ultrasonidos en modo B, la valoración ecográfica puede realizarse tanto por vía transabdominal como transrectal. Con respecto al tipo de transductor, las sondas sectoriales ofrecen una mejor imagen que las lineales para el diagnóstico de gestación en cabra. Las frecuencias que normalmente se utilizan por vía transabdominal oscilan entre 3 y 5 MHz, mientras que por vía transrectal se han usado más las frecuencias de 5 y 7.5 MHz (Bretzlaff y cols., 2001; González y cols., 2004).

Utilizando la vía transabdominal, la valoración ecográfica se suele iniciar sobre la zona inguinal, con el animal de pie. Se prefiere realizar la exploración por el lado derecho, ya que por el lado izquierdo nos encontramos con el rumen que nos puede impedir ver con claridad el útero. Sin embargo, si la imagen obtenida por el lado derecho no es la más adecuada, podemos abordar por el lado izquierdo del abdomen, obteniendo en algunos casos mejores resultados. La sonda debe orientarse hacia la parte interna de la pelvis, por lo que la parte caudal del abdomen se explora deslizando la sonda longitudinalmente (Dorn y cols., 1989). Se comienza localizando la vejiga de la orina, que se reconoce fácilmente como un órgano hueco anecogénico de contorno característico.

Cuando se utiliza la vía transrectal, en primer lugar, se extraen las heces presentes en el recto, que dificultan la visualización de las estructuras internas; posteriormente, la sonda lubricada se inserta en el recto, con la superficie de emisión de ultrasonidos orientada hacia abajo. La vía transrectal es más precoz que la transabdominal, pero existen riesgos de ocasionar daños, tales como laceraciones y perforaciones rectales (González y cols., 2004), y se precisa de un mayor tiempo por animal, para la realización del diagnóstico de gestación.

Ultrasonográficamente, la indicación más precoz de una posible gestación es la acumulación de fluido en el interior del lumen uterino, que puede ser detectado unos pocos días antes por vía transrectal que por vía transabdominal (Martínez y cols., 1998). Utilizando la vía transabdominal, la presencia de fluido en el lumen uterino puede ser observado a partir del día 22 en la cabra (Hesselink y Taverne, 1994). No obstante, un diagnóstico fiable se debe sustentar en signos específicos de gestación, como son la visualización de membranas fetales o el mismo embrión (Lavoir y Taverne, 1989; González y cols., 2004). El embrión no puede ser observado con claridad hasta el día 25-30 de gestación (Bretzlaff, 1993; Bretzlaff y Romano, 2001), y el latido cardíaco puede ser detectado solamente a partir del día 30-35 de gestación en todos los embriones (Lavoir y Taverne, 1989).

Usando la vía transrectal, la gestación se detecta por la identificación de las vesículas embrionarias en la parte anterior y ventral de la vejiga de la orina. La detección de los embriones y su latido se inicia a partir de los días 21-22 de gestación, alcanzado una fiabilidad completa a partir de los 24-26 días (Martínez y cols., 1998; González y cols., 2004), mientras el periodo óptimo para determinar el nº de conceptos se sitúa entre los días 25 a 30 de gestación.

La ultrasonografía en modo-B, aparte de permitirnos determinar con precisión la gestación de forma precoz, el número de fetos y la vitalidad fetal (Lavoir y Taverne, 1989; Bretzlaff, 1993), nos facilita estimar el estadio de gestación que presentan los animales (Haibel y cols., 1989), así como la diferenciación de la gestación con respecto a ciertas patologías como hidrómetra, mucómetra, quistes endometriales, quistes ováricos y diferentes tipos de tumores (Haibel, 1990; Batista y cols., 2009). Con esta técnica, los falsos positivos son raros, y suelen ser debidos a una muerte embrionaria temprana, o bien a una confusión entre la vejiga urinaria llena y el útero; asimismo, en la fases iniciales de la gestación, también puede detectarse un falso positivo en aquellas hembras que han desarrollado una hidrómetra (Haibel, 1990). Por otro lado, los falsos negativos pueden ser resultado de que se realice la técnica demasiado temprano, o por la inexperiencia del examinador (Haibel, 1990).

2.9.3.2. Métodos laboratoriales

I. Concentración de Progesterona

El diagnóstico de gestación está basado en la diferencia entre las concentraciones de progesterona de las hembras gestantes, que mantienen el cuerpo lúteo funcional y por tanto presentarán niveles estables o crecientes, frente a las concentraciones de las hembras vacías, que han sufrido la luteolisis al final del ciclo estral consecutivo a la cubrición o inseminación artificial y que, por tanto, mostrarían niveles bajos. Los niveles de progesterona se pueden determinar tanto por enzimoimmunoensayo o radioimmunoensayo (Gordon, 1996; González y cols., 2004)

En la cabra, la muestra para el análisis de progesterona debe tomarse los días 20-22 de gestación, es decir, al final del ciclo estral consecutivo a la fecundación. Por tanto, este método exige conocer con exactitud la fecha de monta o inseminación artificial, ya que no existen diferencias discriminantes entre la concentración de progesterona en la fase luteal del ciclo y en el período precoz de gestación. El análisis se puede realizar sobre muestras de plasma o suero y en la leche. Las muestras de leche tienen la ventaja que tienen una mayor concentración de progesterona y pueden recogerse durante el ordeño; como desventajas existe una gran variabilidad entre las concentraciones medias de hembras gestantes y vacías entre rebaños, así como que la diferencia entre las concentraciones de diagnóstico positivo y negativo es muy pequeña (Thibier y cols., 1981). Por tanto, en la práctica, es más preciso trabajar con muestras de plasma que con muestras de leche (Gordon, 1996; González y cols., 2004).

La determinación de los niveles de progesterona constituye un método exacto para el diagnóstico de no-gestación (Holdsworth y Davies, 1979). Sin embargo, la capacidad para detectar la gestación es menos específica, ya que solo alrededor del 80-85% de las hembras diagnosticadas como positivas (presuntamente gestantes) llegan a parir. Esta baja especificidad se debe a que la existencia de niveles elevados de progesterona al final del ciclo estral consecutivo a la fecundación, puede deberse a condiciones distintas de la gestación, tales como: cuerpo lúteo persistente, ciclos alargados o acortados, mortalidad embrionaria precoz, hidrómetra, etc., situaciones que producen diagnósticos falsos positivos (Smith, 1986; Lavoit y Taverne, 1989).

II. Concentración de Estrógenos

En la cabra gestante, el principal estrógeno producido dentro de los cotiledones fetales es la estrona. La estrona se reduce a estradiol-17-alfa en la circulación fetal, pero permanece como estrógeno primario en la circulación maternal. La concentración plasmática de estrona, así como la de su conjugado sulfato de estrona, comienzan a aumentar gradualmente en las cabras gestantes, de tal forma que el sulfato de estrona puede detectarse en muestras de plasma o leche alrededor de los días 45 y 50 postcubrición, respectivamente (Chaplin y Holdsworth, 1982; Refsal y cols., 1991; King y Thatcher, 1993; Sawada y cols., 1995), proporcionando un diagnóstico de gestación exacto a partir del día 50 de gestación.

III. Proteínas asociadas a la gestación

En los rumiantes, la placentación es superficial y relativamente poco invasiva. Cuando se inicia la implantación (alrededor del día 18 post-fecundación), las células binucleadas migran desde el trofoblasto embrionario y se fusionan con las células epiteliales del endometrio, formando un extenso sincitio feto-maternal (Zoli y cols., 1991). Las células binucleadas tienen la capacidad de liberar sus productos de secreción en el sistema maternal; entre estos productos se encuentran las proteínas específicas de la gestación (pregnancy specific protein-B, PSP-B) y las proteínas asociadas a la gestación (pregnancy-associated glycoproteins, PAGs).

Las PAGs constituyen una gran familia de glicoproteínas, expresadas específicamente en la capa externa de las células epiteliales (corion y trofoectodermo) de la placenta de las especies unguladas (Zoli y cols., 1991; Guruprasad y cols., 1996). Pertenecen a la familia de las proteínas aspárticas, teniendo una alta coincidencia de la secuencia de aminoácidos con los pepsinógenos. Diferentes moléculas de la familia de las PAGs, han sido aisladas desde cotiledones de vaca (Zoli y cols., 1991), de oveja (Zoli y cols., 1991) y de cabra (Garbayo y cols., 1998).

Las concentraciones de PSP-B en cabras gestantes son significativamente mayores que en las cabras vacías el día 24 después de la inseminación artificial, y aumentan hasta 40 ng/ml al final de la gestación (Humblot y cols., 1990).

Por otro lado, en el caso concreto de la especie caprina, la presencia de antígenos inmunológicamente similares a la PAG y PSP-B bovinas se demostró mediante la utilización de sistemas de RIA heterólogos (Humblot y cols., 1990; Sousa y cols., 1999). Más recientemente, a partir de placentas caprinas, se han aislado y caracterizado 3 tipos diferentes de PAGs que presentan diferencias en su secuencia de aminoácidos y en su peso molecular. El uso de estas 3 PAGs caprinas ha permitido el desarrollo de sistemas de RIAs semihomólogos y homólogos, que aportan un diagnóstico de gestación en cabra más precoz y específico (González y cols., 1999, 2001, 2004).

Las concentraciones de PAGs comienzan a incrementarse justo durante el periodo de implantación, alcanzando sus niveles más elevados entre las semanas 8 y 9 de gestación, permaneciendo en niveles detectables hasta justo antes del parto. Después del parto, las concentraciones de PAGs disminuyen rápidamente, alcanzando los valores más bajos en la cuarta semana postparto (Sousa y cols., 1999). Por tanto, la fiabilidad de este procedimiento es mayor del 95% en los días 21-22 post-fecundación, y a partir de los 24 días de gestación, la exactitud del método para diagnosticar la gestación es cercano al 100% (González y cols., 1999, 2004). Por otro lado, los niveles plasmáticos de PAGs en cabras con gestación múltiple son mayores que en cabras con gestaciones simples (Chentout y cols., 2008); probablemente, esta circunstancia obedece a que, en gestaciones múltiples, se desarrollan un mayor número de lugares de placentación y, en consecuencia, existe una actividad secretoria incrementada por las diferentes placentas.

Además de detectarse en sangre, la determinación de las PAGs se ha confirmado en leche de cabras gestantes (González y cols., 2004). En ese estudio, ya se detectaron diferencias significativas en las concentraciones de PAGs en leche, entre cabras gestantes y cabras no gestantes, desde el día 21 de gestación en adelante, si bien la completa exactitud con este procedimiento se presentó a partir del día 32 de gestación (González y cols., 2004).

Finalmente, las PAGs también pueden utilizarse para evaluar la funcionalidad placentaria. La medición secuencial de PAGs en el plasma de cabras puede proporcionarnos un eficiente método para la detección de alteraciones en la unión feto-placentaria (Zarrouk y cols., 1999 a,b).

2.10. INSEMINACION ARTIFICIAL EN LA ESPECIE CAPRINA

2.10.1. APLICACIONES, VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

La inseminación artificial (IA) constituye uno de los procedimientos más ampliamente utilizados dentro de las técnicas de reproducción asistida. La aplicación de la IA en la reproducción de las especies domésticas, permite básicamente el mejoramiento genético de las mismas. Al igual que en bovino y ovino, el semen caprino se puede diluir en medios especiales, de tal forma que un elevado número de hembras puede ser inseminado con el semen de los mejores machos de una población, lo que permite incrementar de manera muy notable, en comparación con la monta natural, el número de descendientes por padre (Leboeuf y cols., 2000, 2008; Cseh y cols., 2012).

Además de la posibilidad de incrementar el número potencial de hembras fertilizables mediante el uso racional de la IA, la posibilidad de preservar el semen (bien mediante refrigeración o crioconservación), permite diseminar los genotipos deseados para los diferentes sistemas de explotación (Leboeuf y cols., 2008). Otra ventaja de la IA es que el semen congelado puede permanecer almacenado durante un periodo indefinido (Cseh y cols., 2012); en las razas estacionales, esta circunstancia permite disociar la recogida del semen y la IA.

Asimismo, el semen congelado puede ser enviado a cualquier parte del mundo sin disminuir drásticamente sus cualidades fecundantes y se reduce la transmisión de enfermedades (Batista y cols., 2012). Del mismo modo, la evaluación del semen previo a la IA, permite la identificación y, en su caso, eliminación de machos infértiles o con fertilidad reducida. El control de la reproducción de los machos y de las hembras para la IA permite a los ganaderos definir los mejores periodos del año para que ocurran los partos, de acuerdo con el mercado y las condiciones ambientales locales (Leboeuf y cols., 2000; Cseh y cols., 2012).

Las principales desventajas de la IA son que requiere la presencia de personal cualificado y que garantice al propietario una alta probabilidad de éxito (Leboeuf y cols., 2000; Cseh y cols., 2012). Asimismo, es necesario el control de técnicas que permitan determinar con precisión el momento del ciclo sexual en el que se encuentra la hembra y que la detección del celo se realice con absoluta fiabilidad (Martemucci y cols., 2011).

Por tanto, el resultado final de un programa de IA depende del conocimiento de la fisiología reproductiva tanto de machos como de hembras, así como de las herramientas utilizadas para controlar su actividad sexual (Bretzlaff y Romano, 2001; Delgadillo, 2005). Las técnicas para la recogida, manejo, dilución, almacenamiento, conservación y utilización del semen, influyen en el éxito de un programa de IA (Leboeuf y cols., 2000).

2.10.2. MOMENTO ÓPTIMO DE INSEMINACIÓN

La detección del estro es una de las fases críticas de la inseminación artificial, ya que la aplicación del semen en el momento adecuado, depende de una adecuada identificación de las hembras en celo (Leboeuf y cols., 2008; Martemucci y cols., 2011). Para garantizar un mayor porcentaje de éxito, se recomienda una detección individualizada de cada hembra, para de esta forma concretar al máximo el inicio y duración de las manifestaciones estrales (Leboeuf y cols., 2000; Batista y cols., 2009; Cseh y cols., 2012). La detección por observación directa e individual puede emplearse cuando el número de hembras no es muy alto y se dispone del tiempo suficiente. Si no se pudiese detectar de la anterior forma, se puede optar por la utilización de machos marcadores, preferentemente vasectomizados o bien machos enteros, pero provistos de cualquier tipo de mecanismo que limitase su capacidad fertilizante (Martemucci y cols., 2011).

Con un celo natural, la IA puede efectuarse una sola vez, alrededor de 18 horas tras el inicio del celo, aunque se obtienen mejores índices, si se realizan dos inseminaciones, a las 12 y 24 horas de iniciado el celo (Leboeuf y cols., 2000; Delgadillo, 2005).

Cuando se utilizan diferentes combinaciones de hormonas exógenas para inducir o/y sincronizar el celo, se puede realizar inseminaciones a tiempo fijo tras la retirada de la esponjas, siendo el mejor procedimiento dos inseminaciones a las 36 y 60 horas tras la retirada de las esponjas (Menchaca y Rubianes, 2007; Cseh y cols., 2012). No obstante, evidentemente resulta mejor detectar celos e inseminar en función del celo visto (Leboeuf y cols., 2008; Batista y cols., 2009); en este caso, los mejores resultados se consiguen con dos inseminaciones a las 12 y 24 horas de comenzado el celo (Leboeuf y cols., 2000; Cseh y cols., 2012).

2.10.3. TÉCNICAS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

En función de la profundidad de deposición del semen, existen diferentes variantes en el procedimiento de inseminación artificial: inseminación intravaginal, inseminación pericervical, inseminación cervical profunda e inseminación intrauterina (Delgadillo, 2005).

2.10.3.1. Inseminación intravaginal

La inseminación artificial intravaginal es un procedimiento relativamente sencillo, que no precisa de equipamiento muy sofisticado, ni requiere de mucho tiempo en su realización (Leboeuf y cols., 2000; Cseh y cols., 2012). Se puede realizar sin el uso de un espéculo vaginal (inseminaciones “a ciegas”) o bien puede utilizarse un espéculo que incluye algún tipo de fuente de iluminación adicional. Asimismo, una ventaja de esta técnica es que no requiere la manipulación prolongada de las hembras, utilizando un sistema de contención mínimo (Delgadillo, 2005).

Los porcentajes de fertilidad que se obtienen mediante este procedimiento muestran notables diferencias en función de si se utiliza semen fresco, refrigerado o congelado-descongelado. De esta forma, con semen fresco o refrigerado (hasta 24 horas), los porcentajes de fertilidad oscilan entre un 60 a un 75% (Roca y cols., 1997; Karatzas y cols., 1997; Paulenz y cols., 2005), mientras que cuando se utiliza semen congelado-descongelado, los porcentajes de fertilidad son mucho más variables, con resultados de fertilidad desde un 20 a un 55% (Karatzas y cols., 1997; Leboeuf y cols., 2000; Nordstoga y cols., 2010, 2011).

2.10.3.2. Inseminación pericervical

Este tipo de técnica es la más difundida para la utilización de semen fresco y refrigerado. Precisa de un cierto grado de inmovilización del animal, para facilitar su manipulación y evitar o reducir al máximo, daños y/o laceraciones en la vagina o cérvix. En todo caso, salvo situaciones excepcionales, no se requiere la aplicación de ningún tipo de sedación o tranquilización para la realización del procedimiento (Leboeuf y cols., 2000; Cseh y cols., 2012).

Si bien no es siempre necesario, se recomienda una limpieza previa de la vulva con una solución no espermicida, para posteriormente introducir un espéculo y, ayudado con un vaginoscopio o una fuente luminosa de luz fría, se localiza la entrada del cérvix en el fondo de la vagina (Delgadillo, 2005; Batista y cols., 2009). Una vez que las pajuelas se hayan cargado en la

pistola de inseminación, el técnico coloca la pistola en el cérvix y la empuja suavemente; en la mayoría de los casos, la vaina de inseminación no penetra más de 2 cm, por lo que el semen se deposita casi a la entrada del cérvix (Delgadillo, 2005; Leboeuf y cols., 2008).

Con este procedimiento, se obtienen porcentajes de fertilidad que alcanzan hasta un 80% en semen fresco o refrigerado (Roca y cols., 1997; Paulenz y cols., 2005; Menchaca y Rubianes, 2007; Batista y cols., 2011), con dosis seminales entre 100 a 200 millones de espermatozoides totales (al menos 60-80 millones móviles) por inseminación. Cuando se utiliza semen congelado-descongelado, la fertilidad desciende ligeramente, con valores que oscilan entre un 40 a un 55% (Ritar y SÁlmon, 1991; Karatzas y cols., 1997; Dorado y cols., 2007; Batista y cols., 2009, 2011; Martemucci y D'Alessandro, 2011).

2.10.3.3. Inseminación cervical profunda

Este procedimiento técnico es una innovación del anterior, puesto que en lugar de la tradicional pistola de inseminación, utiliza instrumentos largos y delgados, que permitan el paso a través de los anillos cervicales hasta una profundidad de 2 a 4 centímetros en el interior del cérvix. De esta manera, es posible incrementar la fertilidad, incluso con la utilización de semen congelado-descongelado, con valores superiores al 70% (Leeboeuf y cols., 2003) si bien requiere de técnicos con mayor capacitación y destreza.

Cuando se realiza esta técnica, se requiere ser cuidadoso para evitar perforar el cervix, ya que un manejo brusco suele terminar con el depósito del semen en la cavidad abdominal y, en consecuencia, con una disminución de la fertilidad y posible peritonitis.

2.10.4.4. Inseminación intrauterina por laparoscopia

La utilización de la laparoscopia para realizar la inseminación artificial no se encuentra muy extendida en pequeños rumiantes. Ello es debido a los factores restrictivos que implica dicha técnica, como son una adecuada infraestructura (laparoscopio, fuente de luz fría), la necesidad de personal cualificado y los costes asociadas a dicho procedimiento (Batista y cols., 2009). Por esta razón, la inseminación intrauterina por laparoscopia se utiliza básicamente para semen congelado-descongelado, y prácticamente queda limitada a centros de inseminación (Ritar y cols., 1990; Eppleston y cols., 1994; Leboeuf y cols., 2000; Cseh y cols., 2012).

La técnica de laparoscopia consiste en la introducción en la pared abdominal de dos o tres cánulas de 5 mm. Una de ellas sirve para deslizar el laparoscopio rígido, la segunda recibe el aplicador del semen (denominado “aspic”) que presenta una aguja hipodérmica en el extremo, para perforar la pared uterina y depositar el semen en el lumen uterino (Delgadillo, 2005; Cseh y cols., 2012). El tamaño del aplicador es variable, pero suele oscilar entre 20 a 25 cm de longitud, siendo en la mayoría de las ocasiones de un solo uso.

3. MATERIAL Y MÉTODOS (GENERAL)

3. MATERIAL Y MÉTODOS (GENERAL)

3.1. VALORACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL *IN VITRO*

3.1.1. ANIMALES

Este trabajo se ha realizado utilizando machos y hembras de la especie caprina y raza Majorera. Los animales presentaban las características típicas de la raza Majorera; según Oliver (1995), la cabra majorera se caracteriza por tener el pelo corto y policromado, cuernos en arco y sus mamas, de coloración pizarra, presentan un gran desarrollo. Todo esto hace que tenga un biotipo marcadamente lechero con una gran adaptación a la aridez.

Previo al comienzo de la experiencia, los machos fueron entrenados para la realización de la recogida seminal mediante vagina artificial. Posteriormente, se realizó la selección de los machos que entrarían a formar parte de la experiencia, descartando aquellos ejemplares que se inhibiesen o no colaborasen en la recogida seminal, o bien que su calidad seminal fuera deficiente.

Durante toda la fase experimental, se utilizaron un total de 8 machos de edades comprendidas entre 1.5 y 6 años de edad y con pesos que oscilaban entre los 50 y los 90 Kg.

Por otra parte, en las fases de valoración de la calidad seminal *in vitro*, se utilizaron dos hembras desempeñando su función como montura viva. Estas cabras fueron seleccionadas atendiendo, por un lado, a su buen carácter y colaboración, ya que eran hembras que aún no estando en celo, debían permitir la monta del macho, sin ofrecer resistencia, y por otro lado, a su constitución física, ya que debían ser capaces de soportar sin problema el peso de cualquiera de los machos donantes.

Los machos de la explotación se encontraban separados de las cabras en un corral aparte, existiendo interacción visual, auditiva y olfativa entre ambos.

3.1.2. ALOJAMIENTO, ALIMENTACIÓN Y PLAN SANITARIO

Los animales se encontraban alojados en la granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. La granja se encuentra situada en el municipio de

Arucas (altitud: 100 metros), en la zona centro-norte de la isla (latitud 28° norte, longitud 15° oeste). Las condiciones climáticas son de una temperatura media diaria que ronda los 14.5-31.5°C y una duración del día que oscila en torno a las 10.5-14 horas de luz a lo largo del año.

Las instalaciones de la explotación se encuentran construidas a base de cemento y hormigón, además de hierro para los comederos y puertas. Los corrales presentaban zona de sombra y zona de recreo al sol (superficie mínima útil por animal de 9 m²). Los bebederos se encontraban al aire libre pero a la sombra, al igual que los comederos. Asimismo, la explotación presentaba corrales de aislamiento, lazareto y sala de lactancia artificial.

La alimentación de los animales era a base de concentrado (millo, remolacha, cebada, avena y soja), además de fibra en forma de heno de alfalfa *ad libitum*. Con estos componentes se elaboró la ración de acuerdo con lo descrito por Castro y cols. (2006). Asimismo, los animales disponían de corrector vitamínico (Ovi-cap Classic®, Nutriblok) a libre disposición.

Las condiciones higiénicas de la explotación consistían en una limpieza diaria y desinfección periódica. La limpieza diaria se realizaba en los corrales, pasillos y en la sala de ordeño, mientras que la desinfección tenía lugar cada 6 meses (o antes si se consideraba necesario), incluyendo tanto desparasitaciones de corrales como desinfección con cloramina T (Halamid®, Fort Dodge).

El plan sanitario consistía en un programa de vacunación de mamitis gangrenosa (Gangrevac®, Fort Dodge), aborto (Bedsavac®, Fort Dodge), enterotoxemia (Basquin Plus CP®, Ovejero), agalaxia contagiosa (Capri-Vac®, Fort Dodge), vacuna polivalente frente a *Mycoplasma*® (Agalax Tres®, Syva) y septicemia hemorrágica (Oviplast Plus®, Intervet Schering Plough Animal Health). Este plan vacunal se realizaba coincidiendo con el período de cubriciones y en los primeros meses de gestación. Asimismo, los animales, tanto hembras como machos, eran sometidos a un tratamiento antiparasitario (Panacur®, Intervet) previo al parto, así como durante el periodo de lactación.

Durante todo el período de recogidas seminales se comprobaba que los animales no presentaban ningún tipo de patología, haciendo especial hincapié en las patologías del aparato

reproductor y enfermedades que pudiesen ser transmitidas mediante el semen. Concretamente se realizaba una palpación de los testículos y la bolsa escrotal, valorando la consistencia, firmeza, movilidad, simetría, así como la ausencia de adherencias entre las diferentes túnicas testiculares. Asimismo, se valoraba el prepucio y pene, confirmando que no presentaban alteraciones (adherencias, retracciones cicatriciales) que podían limitar la exteriorización del pene durante el proceso de recogida. Finalmente, un examen ultrasonográfico (ecógrafo Aloka SSD-500) de los testículos y próstata confirmaba un estado adecuado de estas estructuras reproductivas.

3.1.3. RECOGIDA SEMINAL

Previamente a la recogida seminal, si era necesario, se realizaba una limpieza del pene y prepucio con suero fisiológico atemperado, con objeto de eliminar los restos de orina, pelos, exudados o suciedad que pudiesen generar una disminución de la calidad del eyaculado obtenido.

La recogida seminal fue siempre realizada por el mismo técnico. El semen era obtenido mediante vagina artificial IMV (Instruments de Médecine Vétérinaire, Francia) a 40-42°C, que se conservaba en la estufa (38-40 °C) hasta el momento de la recogida seminal. La vagina constaba de un cilindro rígido rodeado de una camisa de caucho, al que se conectaba un cono de látex y el tubo colector graduado; toda la vagina quedaba rodeada por una cubierta para que conservase mejor el calor y proteger el semen de la luz y las variaciones térmicas.

En cada procedimiento de recogida seminal, cada macho disponía, al menos, de una vagina artificial. Si la recogida seminal se demoraba en exceso, bien porque el macho era reacio al salto o por cualquier circunstancia imprevista, se procedía a la utilización de una nueva vagina artificial. Se descartaban aquellas vaginas que no estuviesen suficientemente limpias, o con fugas de agua o aire que pudiesen limitar el éxito de la recogida, o interferir con la calidad seminal del eyaculado obtenido.

Para la monta se usó una hembra debidamente inmovilizada, no necesariamente en celo, para facilitar la tarea de recogida.

3.1.4. CONTRASTACIÓN SEMINAL

Una vez recogido el semen en los tubos colectores, éstos se depositaban en un baño María a 37°C para proceder a la determinación de los distintos parámetros seminales. Las características macroscópicas valoradas fueron el volumen y el color, mientras que a nivel microscópico se determinaba la concentración espermática, la motilidad progresiva, la vitalidad espermática y los porcentajes de morfoanomalías y acrosomías.

3.1.4.1. Pruebas macroscópicas

I. Volumen del eyaculado

El volumen del eyaculado se registró en mililitros mediante observación directa en el tubo colector graduado utilizado para la recogida.

II. Color del eyaculado

El color del eyaculado se valoraba de forma visual, directamente en el tubo colector de recogida, aceptando como colores normales toda la gama que oscilaba desde el blanco lechoso hasta el amarillento. De esta forma, fueron descartados todos los eyaculados que tuviesen colores rojizos (presencia de sangre), amarillo (presencia de pus), o cualquier otra tonalidad fuera de lo normal. La valoración del color se realizaba siempre por el mismo técnico, no pasando nunca más de 5 minutos desde la recogida.

3.1.4.2. Pruebas microscópicas

I. Motilidad individual progresiva

La motilidad individual progresiva se analizó tras diluir una muestra de semen a razón de 1:20 en solución de lavado (Tabla 1) a 37°C y observando una gota de dicha solución entre portaobjetos y cubreobjetos, generando una fina película que permitía determinar el número de espermatozoides móviles en la muestra. Los portaobjetos y cubreobjetos, así como las pipetas Pasteur utilizadas para procesar el semen, eran mantenidos a 37°C mediante una placa calefactora HT-200 (Minitübe Ibérica, España), que calentaba a su vez la pletina del microscopio.

La determinación subjetiva de la motilidad progresiva se realizaba utilizando un microscopio Olympus BH2-NIC-2 de contraste de interferencia diferencial provisto de una placa calefactora atemperada a 37°C, entre 200 y 400 aumentos, valorando un mínimo de 8-10

campos localizados en la zona central del cubreobjetos (Cabrera y cols., 2005). La valoración del movimiento se realizaba sobre aquellos espermatozoides que presentaban un movimiento progresivo de avance, descartando aquellos espermatozoides que presentasen movimientos circulares, rotatorios o vibratorios.

La determinación subjetiva de la calidad seminal fue siempre realizada por el mismo observador durante todas las experiencias *in vitro*. El valor de motilidad de cada muestra era el resultado de hallar la media de las valoraciones de los diferentes campos observados, aproximándolo al 5% más cercano.

Tabla 1. Solución de lavado utilizada en el procesado del semen

Tris (Hidroximetil) Aminometano	3.029 g
Glucosa	0.500 g
Ácido cítrico	1.589 g
Penicilina	50.000 UI
Estreptomicina	50 mg
dH ₂ O	Hasta 100 ml

La valoración objetiva de la motilidad individual progresiva se realizó mediante un sistema computerizado asistido de análisis espermático (Sperm Vision Lite®, Minitübe Ibérica, España). Las variables seminales incluidas en el análisis fueron el porcentaje total de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva, el porcentaje de espermatozoides con movilidad local y el porcentaje de espermatozoides no móviles. Para cada muestra diluida, se tomaba de 1 a 2 alícuotas de 10 µL que se depositaban en una cámara Makler a 37°C, y los espermatozoides contenidos en al menos 7 campos (seleccionados de manera aleatoria) de cada una de las alícuotas eran evaluados para determinar la motilidad espermática; al menos 2000 espermatozoides/alícuota fueron evaluados para definir los parámetros de motilidad. Los parámetros del análisis espermático eran los siguientes: número de fotogramas, 16; fotogramas por segundo, 25; velocidad límite para espermatozoides no móviles, 10 µm/s; velocidad límite para espermatozoides con motilidad local, 20 µm/s; velocidad límite para espermatozoides con motilidad baja, 30 µm/s; velocidad límite para espermatozoides con velocidad media, 60 µm/s; filtro para partículas, 20%.

II. Concentración espermática

Para la determinación de la concentración espermática de cada eyaculado, se hacía una dilución 1:400 del semen en solución salina formolada al 0.3% (Tabla 2). De esta forma, los espermatozoides podían ser contados mediante el uso de un hemocitómetro. La cámara del hemocitómetro era cargada con la dilución mediante capilaridad. La valoración se realizaba en un microscopio óptico a 400 aumentos (Olympus BH2-NIC-2). El número de espermatozoides observados en una superficie de 0.2 mm² (80 cuadros pequeños de 0.0025 mm² cada uno y distribuidos en 5 cuadros mayores), era multiplicado por 20.050.000, teniendo en cuenta la dilución realizada (1/401) y el volumen cubierto con el recuento (0.2 mm² x 0.1 mm de altura = 0.02 mm³). De esta forma, obtenemos la concentración de espermatozoides por mililitro.

Tabla 2. Solución salina formolada

NaCl.....	9 g
dH ₂ O.....	Hasta 1000 ml
Solución de formaldehído (35-40%).....	8,5 ml

Una vez hallada la concentración de espermatozoides por mililitro y conociendo también el volumen del eyaculado, podíamos calcular el número de espermatozoides totales por eyaculado, multiplicando estos dos datos entre sí. La determinación de la concentración (por ml y total) se realizaba por duplicado.

Del mismo modo, en numerosas ocasiones al comienzo de las diferentes experiencias, la determinación del número de espermatozoides presente en cada eyaculado se realizaba también mediante un fotómetro especialmente diseñado para la medición de la concentración espermática (Fotómetro Spermacue®, modelo 12300/0500, Minitübe Ibérica, España). Para ello, sirviéndonos de una pipeta Pasteur, se rellenaba una microcubeta del sistema con una pequeña muestra de semen. Acto seguido, la microcubeta era introducida en el fotómetro, determinando la concentración de espermatozoides por ml de eyaculado.

III. Vitalidad espermática

El porcentaje de espermatozoides vivos se analizó mediante el uso de una tinción supravital (Barth y Oko, 1989), con los colorantes eosina y nigrosina (Tabla 3). Sobre un portaobjetos a

37°C, se mezclaba una gota de semen diluido a razón 1:20 en solución de lavado (mantenida a 37°C) con una gota de colorante, también atemperado a 37°C. Una vez mezcladas ambas gotas, se realiza una extensión con ayuda de otro portaobjetos que se deslizaba sobre el primero, formando un ángulo de 30-40° entre ambos.

Esta extensión se secaba rápidamente al aire y se observa a microscopio óptico a 1000 aumentos (Olympus BH2-NIC-2), con aceite de inmersión. Los espermatozoides que mostraban algún indicio de coloración rosada en su estructura, indicativo de alteración de la membrana, eran considerados muertos. Por su parte, los que se presentaban totalmente blancos, indicativo de que presentaban una membrana funcional que impedía el paso de los colorantes, eran considerados como vivos.

Para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos se procedió al recuento de 200 espermatozoides en total por cada muestra seminal.

Tabla 3. Tinción supravital para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos

Eosina B azulada.....	1 g
Nigrosina.....	8 g
dH ₂ O.....	Hasta 100 ml

IV. Porcentaje de morfoanomalías

Para la determinación de este parámetro, se colocaba una gota del semen diluido a razón de 1:20 (en solución de lavado) en un portaobjetos a 37°C. Con ayuda de otro cubreobjetos a 37°C se hacía extensión de la gota y se dejaba secar al aire. Una vez seca, se teñía mediante la batería de colorantes Spermac® (Minitübe Ibérica, España), siguiendo las instrucciones del fabricante de la batería de colorantes.

Posteriormente, mediante la utilización de un microscopio óptico de contraste de fases (Olympus BH2-NIC-2), a 1000 aumentos, con el objetivo de inmersión, se hacía recuento de 200 espermatozoides de cada muestra, valorando las distintas morfoanomalías que se presentaban. Las morfoanomalías que se valoraron se diferenciaron en morfoanomalías de cabeza

(microcefalia, macrocefalia, malformación, cabezas sueltas, etc.), de pieza intermedia (gota citoplasmática, pieza intermedia rota, etc.) o de cola (colas rotas, colas enrolladas o dobles colas, etc.).

V. Acrosomías

El porcentaje de acrosomías se determinaba en la misma extensión realizada para el porcentaje de morfoanomalías y siguiendo la misma pauta. Se valoraban 200 espermatozoides de cada muestra distinguiendo entre espermatozoides con acrosoma normal y aquellos que presentaron alguna alteración de cualquier tipo en su estructura acrosómica (acrosoma desprendido, acrosoma rugoso, otros defectos en acrosoma), para luego calcular el porcentaje correspondiente.

3.1.5. PROCEDIMIENTOS DE DILUYOCONSERVACIÓN SEMINAL

Tras la recogida, contrastación y selección de los eyaculados que iban a formar parte del estudio, se comenzaba con el proceso de diluyoconservación, que constaba de 3 fases: lavado, dilución y equilibrado.

3.1.5.1. Lavado

El lavado del semen es un proceso necesario en el caso de congelación de semen de caprino, ya que los líquidos espermáticos son ricos en lipasas. Estas lipasas han de eliminarse, si no fuera así, la membrana lipídica de los espermatozoides iría degradándose, acortando la vida de los espermatozoides criopreservados (Leboeuf y cols., 2000; Cseh y cols., 2012).

Con este objetivo, se realizaban dos lavados consecutivos de cada eyaculado. En primer lugar, el eyaculado era diluido hasta 10 ml, con solución de lavado atemperada a 37°C (Tabla 1) y era posteriormente centrifugado durante 15 minutos a 700 x g. De esta forma, los espermatozoides quedaban precipitados, y con la ayuda de una pipeta Pasteur, se eliminaba el sobrenadante. A continuación, se realizaba el segundo lavado, adicionando la solución de lavado (hasta 10 ml) a temperatura de laboratorio (20-25°C), y se centrifugaba de similar forma que en la primera ocasión. El objetivo de este procesado era que la temperatura del eyaculado fuese disminuyendo progresivamente y evitar o reducir al mínimo los efectos nocivos de un shock térmico.

Una vez centrifugado, se retiraba el sobrenadante con la ayuda de una pipeta Pasteur, y ya se comenzaba con el proceso de dilución del semen.

3.1.5.2. Dilución

Para la dilución y conservación de semen se utilizaban básicamente diluyentes a base de yema de huevo, TRIS (hidroximetil), glucosa, ácido cítrico, antibióticos (penicilina y estreptomycin) y en su caso glicerol, tal y como se muestra en la Tabla 4. Estos diluyentes ya habían sido testado con éxito para la criopreservación del semen caprino en las razas canarias (Cabrera y cols., 2005).

Tabla 4. Composición de los diluyentes empleados en la experiencia (por cada 100 ml)

Diluyente I	Tris.....	2.666 g
	Yema de huevo.....	12 ml
	Glucosa.....	0.44 g
	Ácido cítrico.....	1.398 g
	Penicilina.....	44.000 UI
	Estreptomycin.....	44 mg
Diluyente II	Tris.....	2.45 g
	Yema de huevo.....	11.04 ml
	Glucosa.....	0.40 g
	Ácido cítrico.....	1.29 g
	Penicilina.....	40.480 UI
	Estreptomycin.....	40.48 mg
	Glicerol.....	8%

La cantidad de diluyente a añadir se calculaba partiendo de los datos, ya conocidos, de concentración de cada eyaculado. Conociendo esta concentración, se le añadía la cantidad de diluyente suficiente para obtener la concentración final buscada, que fue distinta en cada uno de los experimentos.

De manera general, una vez definida la cantidad total de diluyente a añadir, ésta se dividía a su vez entre 2. La primera fracción (diluyente I) sería de diluyente que no contiene

glicerol; la segunda fracción (diluyente II) habría de contener un 8% de glicerol, solamente en el caso del semen que fuese a ser conservado mediante congelación. Si el semen iba a ser conservado a otra temperatura que no fuese la de congelación (temperatura ambiente, refrigeración), la segunda fracción del diluyente (si fuese necesario añadir) era similar que la primera fracción.

Los diluyentes se añadían habitualmente a temperatura de laboratorio (20-25°C). El diluyente I o fracción no glicerolada se añadía de una vez, y tras resuspender la dilución mediante la utilización de pipetas Pasteur, se aguardaba 10 minutos antes de añadir el diluyente II. Por su parte, el diluyente II o fracción glicerolada, utilizada únicamente en eyaculados destinados a la congelación, se adicionaba (gota a gota, dejando resbalar por las paredes del tubo que contenía la dilución), dividido en 3 alícuotas, de igual volumen, separadas entre sí 10 minutos. De esta forma, transcurría el tiempo suficiente para que los espermatozoides se adaptasen a las nuevas condiciones de pH y osmolaridad.

Una vez diluido el semen, se procedía a envasarlo en pajuelas de plástico de 0.5 ml, que fueron llenadas mediante aspiración, a temperatura ambiente, dejando una cámara de aire de aproximadamente 1 centímetro de longitud en el extremo abierto de las pajuelas. El sellado de las pajuelas se llevó a cabo mediante bolitas selladoras de distintos colores para identificarlo.

3.1.5.3. Equilibrado

En todas aquellas experiencias en las que el semen se conservó congelado o refrigerado, las pajuelas una vez llenas y selladas, se introducían en una nevera (Liebherr®, Pamplona, España) a 4°C, que permitía el descenso de la temperatura desde los 20-25°C hasta los 4-5°C de forma paulatina. Este descenso se monitorizaba con un termómetro Crison TM 65 con sonda de inmersión, confirmando que tardaba alrededor de 1.5-2 horas hasta alcanzar la temperatura de 4-5°C.

Una vez que el semen diluido llegaba a la temperatura de 4-5°C, el tiempo que las pajuelas permanecían a 4-5°C oscilaba entre 2-4 horas, en función de los experimentos programados. Una vez finalizado el periodo de equilibrado y antes de continuar con el proceso de congelación, se seleccionaban algunas pajuelas de manera aleatoria y se procedía a estimar

el grado de calidad seminal, mediante la valoración de la motilidad espermática y los porcentajes de acrosomías y morfoanomalías.

3.1.6. PROTOCOLOS DE CONGELACIÓN Y CONSERVACIÓN SEMINAL

En función de las experiencias que posteriormente serán explicadas con detalle, el semen fue conservado mediante distintos sistemas, variando ligeramente el protocolo en función del diseño experimental. De esta manera, una vez finalizado el periodo de equilibrado, se comenzaba con el protocolo de crio-preservación. Este proceso se llevó a cabo básicamente de dos formas distintas en función del método de congelación que fuéramos a utilizar. Los protocolos que se utilizaron en las experiencias eran alguno de los siguientes:

- Pajuelas congeladas en nitrógeno líquido: tras el período de equilibrado, las pajuelas se depositaban en una rampa metálica, que se situaba dentro de una caja de poliestireno, con nitrógeno líquido en su interior. De esta forma, las pajuelas se situaban a unos 4-5 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido, permaneciendo durante unos 15-20 minutos sometidas al efecto de los vapores de nitrógeno (Cabrera y cols., 2005). Una vez transcurrido el tiempo correspondiente, las pajuelas se sumergían en el nitrógeno líquido y se almacenan en este medio hasta el momento de su utilización.

- Pajuelas congeladas en ultracongeladores de -152°C : tras el proceso de equilibrado, las pajuelas eran trasladadas (a 4°C) desde la cámara frigorífica hasta el ultracongelador de -152°C (Álamo y cols., 2005), para ser directamente introducidas en el ultracongelador, quedando almacenadas de esta forma hasta el momento de su utilización. Las características del ultracongelador y el procedimiento de congelación se describen al detalle en la primera de las experiencias.

3.1.7. DESCONGELACIÓN Y VALORACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL POST-DESCONGELACIÓN

La descongelación de las dosis seminales se llevó a cabo sumergiéndolas directamente en agua atemperada a 37°C durante 30 segundos como mínimo. Con aquellas pajuelas que no habían sido bien selladas mediante microbolitas selladoras, había que tener la precaución de no

sumergirlas por su extremo abierto para evitar que pasase agua a su interior, circunstancia que sería letal para los espermatozoides.

Una vez transcurridos los 30 segundos, las muestras destinadas a ser valoradas *in vitro* fueron sometidas al siguiente protocolo: el contenido de cada pajuela fue diluido en 1.0 ml (dilución 1:2) de buffer TRIS (2.4 gr de Tris Aminometano, 1.4 g de ácido cítrico, 0.8 g de glucosa, 0.06 g de Bencilpenicilina, 0.218 gr de estreptomicina, agua destilada hasta 100 ml), atemperado a 37°C. Tras diluir la muestra, ésta se mantenía a 37°C (baño María) y se aguardaba unos 5 minutos antes de valorar la calidad seminal. El propósito de esta práctica era dar tiempo a los espermatozoides para que se reactivasen correctamente de su letargo gracias a una temperatura óptima para su actividad.

Transcurrido este período de tiempo, procedíamos a la determinación de los parámetros de motilidad individual progresiva, porcentaje de acrosomías y porcentaje de morfoanomalías, haciendo distinción entre los distintos tipos existentes. Todas estas valoraciones se llevaron a cabo según lo ya explicado en el apartado de contrastación seminal.

3.2. SINCRONIZACIÓN DEL CELO, INSEMINACIÓN ARTIFICIAL Y TASA DE FERTILIDAD

3.2.1. ANIMALES

Los animales que formaron parte de la fase *in vivo* de los diferentes experimentos, se encontraban en las condiciones de alojamiento, alimentación y plan sanitario ya descritas en el apartado 3.1.2.

I. Hembras

En esta fase de las experiencias se utilizaron hembras de diversas edades, si bien todas las cabras eran mayores de 12 meses, y habían alcanzado la pubertad, al menos 2 meses antes de ser sometidas a ningún tratamiento. Previamente a cualquier experiencia, se confirmaba que las hembras se encontraban en un buen estado de salud, mostraban celos regulares cada 20-21 días y se realizaba un examen ecográfico del aparato genital, para confirmar que los animales no presentasen ningún tipo de problema reproductivo que pudiese limitar su fertilidad.

II. Machos

Los machos utilizados en esta fase experimental fueron los mismos que en el apartado anterior. En este caso, fueron utilizados para detectar los celos.

3.2.2 TRATAMIENTO DE INDUCCIÓN Y SINCRONIZACIÓN DEL CELO Y LA OVULACIÓN

Las hembras fueron sincronizadas mediante la inserción de esponjas intravaginales impregnadas con acetato de fluorogestona (20-45 mg de FGA, Chronogest®, Intervet) durante 11 días. El día 9 tras la colocación de las esponjas se inyectó, vía intramuscular, 7.5 mg de luproliol (1 ml, Prosolvin®, Intervet) para asegurar la regresión luteal y 200 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG, Foligon®, Intervet), retirando las esponjas 2 días más tarde.

Para determinar el momento óptimo de la inseminación artificial, se realizó una exhaustiva detección de los celos mediante la utilización de machos enteros. Esta detección de celos se iniciaba entre 12 a 24 horas tras la retirada de las esponjas y, a partir de este momento, se realizaban chequeos cada 8-12 horas. De manera general, cada cabra se testaba de manera individual, presentándose a un macho entero, provisto con arnés, durante un periodo mínimo de 3 a 5 minutos. Se consideraba que la hembra se encontraba en celo, cuando permitía el cortejo y el salto por parte del macho testador.

3.2.3. MOMENTO Y PROCEDIMIENTO DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Una vez que se detectaban los primeros síntomas de celo, se realizaba la primera inseminación 12 horas más tarde, y después de ésta se repetían inseminaciones cada 12 horas hasta el fin del celo (definido como el rechazo evidente de la hembra a ser cubierta por el macho), con un mínimo de 2 y un máximo de 3 inseminaciones consecutivas. A efectos de calcular la edad gestacional, la fecha de la última inseminación se consideraba como día 0 de gestación.

Se decidió llevar a cabo este protocolo de inseminación artificial atendiendo, por una lado, al hecho de que la ovulación en la especie caprina tiene lugar hacia el final del celo o incluso terminado el mismo (Greyling y Van-Niekerk, 1990; González y cols., 1999). Por otro lado, se asumía que el semen descongelado y conservado a la temperatura corporal del tracto genital femenino (Leboeuf y cols., 2000), pierde calidad en un plazo máximo de 12 horas tras su descongelación. La intención de este protocolo era asegurar, de una forma bastante fiable, que existiesen espermatozoides activos a disposición en el momento óptimo para la fecundación del óvulo.

La inseminación artificial se realizó de forma pericervical mediante visualización directa de la entrada del cuello del útero. Este proceso era llevado a cabo de la siguiente manera:

- a. Posicionamiento de la hembra: las hembras eran colocadas sobre un potro de elaboración propia. Este potro se situaba bajo sus caderas, para que el tercio posterior del cuerpo quedara por encima del resto del animal. De esta forma, todo el paquete intestinal se desplazaba por gravedad en sentido craneal, facilitando la visualización y las maniobras dentro de la vagina.
- b. Localización del cérvix: una vez colocada la hembra en posición, se introducía un espéculo vaginal (lubricado con solución no espermicida) a través de los labios vulvares y con la ayuda de una fuente de luz fría, se visualizaba el cérvix en el fondo de la vagina.
- c. Inseminación propiamente dicha: tras preparar las dosis seminales (como se explicará en el siguiente apartado), se introduce el catéter de inseminación (modelo Quicklock, pistola de inseminación para ovino y caprino, Minitübe Ibérica, Tarragona, España) cargado con la muestra,

a través de los labios vulvares. Durante el procedimiento, se intentaba no tocar las paredes vaginales, y con suavidad se introducía la vaina por el cérvix, procurando avanzar entre 1-2 cm a través del cuello uterino; en aquellas ocasiones donde no fuese posible atravesar el cérvix, el semen se depositaba en el fondo de la vagina, justo sobre la apertura cervical. En cualquier caso, el tiempo máximo empleado en realizar la inseminación oscilaba entre 30 y 60 segundos por animal.

d. Una vez depositado el semen, se retiraba con cuidado todo el instrumental y se realizaban una serie de masajes vulvares, con objeto de estimular las contracciones ascendentes de la musculatura vaginal y cervical. Finalmente, se bajaba al animal del potro, evitando movimientos bruscos y procurando que el animal no orinase en los primeros minutos tras la inseminación.

3.2.4. PREPARACIÓN DE LAS DOSIS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

A cada hembra se le asignaba semen de un donante en concreto, procedente de un protocolo determinado de preservación y conservado durante un tiempo concreto, con el que se inseminaría todas las veces que fuese necesario. De esta forma, todas las inseminaciones consecutivas de una misma cabra se realizaron con semen de similares características.

Una vez seleccionadas las muestras, se descongelan sumergiéndolas en agua a 37°C durante 30 segundos. Transcurrido este tiempo, se secaba bien la pajuela, se cargaba en el catéter de inseminación y se cubría con la vaina de inseminación (limpia y nueva cada vez) atemperando todo el material a 37°C. Una vez montado el catéter, se introducía generalmente en una estufa a 37°C, con objeto de que el semen no sufriese cambios bruscos de temperatura hasta que la hembra estuviese completamente preparada. El tiempo máximo transcurrido desde la preparación de las pajuelas, hasta la realización del procedimiento de inseminación oscilaba entre 4 y 6 minutos.

En cada inseminación se utilizaron pajuelas de 200×10^6 espermatozoides cada una, o lo que es lo mismo, en cada inseminación se introducían en el tracto vaginal 400×10^6 de espermatozoides, asegurando de esta forma que introducimos al menos $100 \times 10^6 - 120 \times 10^6$ espermatozoides móviles (30% de motilidad progresiva en los 400×10^6 de espermatozoides).

3.2.5. DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN

El diagnóstico de gestación se llevó a cabo mediante ecografía transabdominal. La ultrasonografía transabdominal se realizó utilizando un ecógrafo Aloka SSD-550 provisto con un transductor lineal de 3.5-5 MHz. Con el animal sujeto y en pié, el transductor con gel de contacto se situaba sobre el área inguinal de la pared abdominal ventral derecha, a la altura de la inserción mamaria. Se consideró que los animales estaban gestantes cuando se observaba con claridad la vesícula embrionaria con el correspondiente embrión en su interior y se evidenciaba latido cardíaco (Lavoir y Taverne, 1989; Martínez y cols., 1998).

El diagnóstico de gestación se realizó el día 35 de gestación, intentado identificar el número de embriones presentes. Posteriormente, los animales se reevaluaban a los 60, 90 y 120 días, comprobando si había existido mortalidad embrionaria y valorando el normal crecimiento fetal. Finalmente, el día 140 de gestación se volvió a repetir una nueva ecografía, para confirmar que los fetos mostraban signos de vitalidad, antes de iniciar los tratamientos de inducción del parto.

3.2.6. PARTO, FERTILIDAD Y PROLIFICIDAD

El día 145 de gestación, las cabras gestantes fueron inducidas al parto. La inducción al parto se realizó con el objeto de intentar agrupar los partos, pudiendo de esta manera realizar una atención más específica en el momento del nacimiento. De esta manera, se identificaban y solucionaban aquellas distocias que se presentaron, así como se registraba de manera estricta y eficaz numerosos datos relacionados con el parto, como número de cabritos por madre, sexos, pesos al nacimiento,...

La inducción de los partos se realizó mediante inyección por vía intramuscular de prostaglandinas, entre 3.75-7.5 mg de Luprostiol (Prosolvín®, Intervet). La mayoría de los tratamientos se administraron entre las 06:00-08:00 horas. A partir de 20-24 horas tras los tratamientos de inducción, las cabras se vigilaron constantemente para valorar diferentes parámetros (intervalo tratamiento-parto, incidencia de distocias, muerte neonatal, retención de placenta, muerte materna).

Finalmente, se definió como *fertilidad* al porcentaje de hembras que habían quedado gestantes tras las inseminaciones artificiales. Este dato se registró mediante diagnóstico de gestación por ecografía transabdominal, tal y como ya se explicó en el apartado anterior. Por *fertilidad a término* se definió el porcentaje de hembras que quedaron gestantes y llegaron a término la gestación. Por su parte, se considero como *prolificidad* a la media del número de cabritos obtenidos de cada parto.

4. EXPERIENCIAS

EXPERIENCIA I

4.1. EXPERIENCIA I: UTILIZACIÓN DE LOS ULTRACONGELADORES DE -152°C PARA LA PRESERVACIÓN DEL SEMEN EN LA ESPECIE CAPRINA: RESULTADOS *IN VITRO* Y FERTILIDAD TRAS INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

4.1.1. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) con semen fresco, refrigerado o congelado-descongelado es una herramienta básica para la cría de ganado caprino, facilitando la difusión del semen caprino con alto valor genético (Leboeuf y cols., 2000; Hidalgo y cols., 2007). En los últimos años, la inseminación artificial con semen fresco se ha convertido en una técnica común en ganado caprino (Roca y cols., 1997; Leboeuf y cols., 2003a; Paulenz y cols., 2005), sin embargo, el uso comercial del semen congelado y conservado se encuentra relativamente limitado en la reproducción caprina.

Al igual que en otros mamíferos domésticos, el proceso de congelación reduce la viabilidad de los espermatozoides caprinos; el porcentaje de fertilidad de cabras inseminadas con semen congelado-descongelado, oscila entre el 30 y el 70% (Ritar y cols., 1983; Ritar y cols., 1990; Baril y cols., 1993; Singh y cols., 1995; Karatzas y cols., 1997; Leboeuf y cols., 2003a; Salvador y cols., 2005; Dorado y cols., 2007), mientras que con semen fresco o refrigerado se registran valores entre el 60 y el 80% (Dauzier y cols., 1966; Ritar y cols., 1983; Roca y cols., 1997; Paulenz y cols., 2005). Mediante inseminación artificial transcervical, una baja proporción de espermatozoides atraviesan el canal cervical; en consecuencia, se precisa de un mayor número de espermatozoides para obtener tasas razonables de fertilidad (Baril y cols., 1993; Roca y cols., 1997; Gacitua y cols., 2005). Diferentes estudios han señalado este hecho como un obstáculo a la hora de realizar inseminación artificial en pequeños rumiantes (Gacitua y cols., 2005; Kaabi y cols., 2006). Por otro lado, se obtienen mejores resultados de fertilidad si la inseminación se realiza de manera intrauterina, mediante laparoscopia (Ritar y cols., 1990; Eppleston y cols., 1994); sin embargo, los altos costes asociados con este procedimiento y la necesidad de técnicos cualificados para llevarla a cabo, son factores limitantes para el uso de esta técnica en caprino.

La criopreservación de las pajuelas en nitrógeno líquido (NL) es el protocolo estándar para congelar y almacenar semen caprino. Otros estudios han descrito la congelación seminal

mediante la colocación de *pellets* de semen en hielo seco a -79°C , pero requiere igualmente de nitrógeno líquido para su almacenaje (Leboeuf y cols., 2000). En algunas áreas geográficas, el NL no siempre es fácil de conseguir y su coste es relativamente elevado. El desarrollo de la liofilización y los métodos de vitrificación, evitando el uso de NL, se ha postulado como alternativas viables para la criopreservación espermática (Holt, 1997). Sin embargo, no se han desarrollado un número suficiente de ensayos *in vivo* como para confirmar la efectividad de estas estrategias alternativas. Por otro lado, otro estudio (Gacitua y cols., 2005) realizado en la especie caprina, describe mayores tasas de fertilidad tras realizar inseminación artificial con semen congelado usando una máquina de congelación direccional; sin embargo, en este estudio también se utilizó NL para almacenar el semen.

En la especie canina, diferentes experiencias (Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006) han confirmado que el uso de ultracongeladores de -152°C para la congelación y conservación de muestras de semen, puede representar una alternativa potencial al NL. Un estudio preliminar desarrollado por nuestro grupo de investigación (Medrano y cols., 2002) valoró, por primera vez, el uso de ultracongeladores de -152°C para la congelación y almacenamiento de semen procedente de machos cabríos de la raza Majorera. Los resultados de este estudio confirmaron que la calidad seminal *in vitro* (hasta dos meses tras la congelación) no mostraba diferencias estadísticamente significativas entre pajuelas congeladas y almacenadas en NL, y pajuelas congeladas y conservadas exclusivamente en ultracongeladores de -152°C . Sin embargo, hasta el momento de la presente experiencia, no se habían evaluado los resultados de calidad seminal tras un largo período de almacenamiento mediante este método; asimismo, no se han completado ensayos de fertilidad que permitan definir la capacidad fertilizante de semen congelado y conservado mediante ultracongeladores de -152°C .

El objetivo de este experimento fue evaluar el uso de ultracongeladores de -152°C tanto para congelar como para almacenar semen caprino durante pequeños períodos de tiempo (1, 3 meses) y períodos más prolongados (12 meses). Además, se llevaron a cabo ensayos *in vivo* para determinar la fertilidad del semen caprino de la raza Majorera, congelado y conservado mediante ultracongeladores de -152°C durante dos periodos definidos (1 mes, 6 meses) de almacenamiento.

4.1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.2.1. Experimento 1

I. Animales

En este primer experimento, cinco machos cabríos de la raza Majorera, con edades comprendidas entre 3.5 y 5 años, fueron seleccionados por su valor reproductivo. El estudio se llevó a cabo en la granja de la Facultad de Veterinaria de la ULPGC. Los animales se encontraban alojados, con una alimentación y plan sanitario como ya se ha descrito en la sección general de Material y Métodos. Todo el trabajo experimental se desarrollo de acuerdo con la legislación española de bienestar y experimentación animal.

II. Diseño experimental

El objetivo de la primera fase del experimento (Figura I) era comparar la calidad seminal *in vitro* del semen congelado y conservado en nitrógeno líquido (NL) y la del semen congelado y conservado en ultracongelador de -152°C (ULF). Asimismo, se perseguía comprobar si la calidad seminal sufría alguna modificación en función del periodo de almacenamiento, en los dos protocolos de crioconservación anteriormente reseñados. Finalmente, un último objetivo de este experimento era comprobar si existía variabilidad individual en la congelabilidad del semen.

Con tal fin, se recogieron diferentes eyaculados a un total de 5 machos, que se procesaban de manera individual y que una vez finalizado el proceso de diluyoconservación, eran sometidos a dos protocolos diferentes de crioconservación (NL, ULF). Posteriormente, el semen era valorado mediante los procedimientos habituales de contrastación (motilidad individual progresiva, porcentaje de morfoanomalías, porcentaje de acrosomías), tras diferentes periodos de conservación (1 día, 1 mes, 3 meses, 12 meses).

III. Recogida y evaluación seminal.

Durante la estación reproductiva (Septiembre-Noviembre 2006), se recogió, mediante vagina artificial, semen de cada macho, dos veces a la semana durante 5 semanas (10 eyaculados por animal). Inmediatamente tras la recogida, los eyaculados fueron colocados al baño María (37°C) y se separó una alícuota de cada muestra para ser valorada. A nivel macroscópico, se valoraba el volumen y el color del eyaculado, mientras que a nivel microscópico se determinó la motilidad individual (total y progresiva), la concentración espermática y los porcentajes de morfoanomalías

y acrosomías. Los métodos y criterios utilizados para valorar las características seminales ya se han descrito con anterioridad; brevemente reseñar que la concentración espermática se determinaba tanto mediante hemocitómetro como mediante la utilización del Spermacue®. La motilidad individual progresiva se analizó aproximadamente 5 minutos tras la recogida seminal, con objeto de que el semen se estabilizase a una temperatura constante, y para que todas las muestras se evaluaran de manera similar. Tras diluir (ratio 1:20) una alícuota en solución de lavado, se procedía a la determinación del porcentaje de espermatozoides con motilidad individual, tanto de forma subjetiva como objetiva (sistema CASA). Finalmente, el porcentaje de morfoanomalías y acrosomías se determinaban mediante el protocolo de tinción Spermacue® (Minitübe Ibérica, España), valorando un mínimo de 200 espermatozoides por muestra.

Para el estudio, solo se seleccionaron aquellos eyaculados con una motilidad progresiva superior al 75%, un porcentaje de acrosomas intactos >75% y un porcentaje de espermatozoides sin morfoanomalías >85%.

IV. Procesado seminal

Entre 5 y 10 minutos tras la recogida seminal, los eyaculados de cada macho fueron lavados para retirar el plasma seminal, mediante la utilización de una solución de lavado, tal y como se ha explicado en apartados previos. Tanto los lavados como el posterior procesado del semen se realizó de manera individualizada para cada macho cabrío. Una vez finalizada la centrifugación y retirado el sobrenadante, el *pellet* era diluido (1:3) con un primer diluyente (no glicerolado) a base de TRIS (Tabla 4). De esta manera, una vez calculada la concentración espermática, cada muestra era diluida (a temperatura ambiente, 20°C) con este primer diluyente, hasta alcanzar una concentración de 800×10^6 espermatozoides/ml. Unos 5 minutos más tarde, se realizaba una segunda dilución (Tabla 4), en tres pasos y separados 10 minutos entre sí, añadiendo esta fracción glicerolada a temperatura ambiente, hasta alcanzar una concentración de 400×10^6 espermatozoides/ml. Finalmente, el semen diluido era envasado en pajuelas de plástico de 0.5 ml y estas pajuelas fueron selladas mediante unas microbolitas plásticas de colores.

Una vez envasadas, las pajuelas se colocaron en el interior de una cámara frigorífica, siendo enfriadas desde temperatura ambiente hasta 5°C durante 2 horas; a continuación, las pajuelas se mantuvieron dos horas más en el refrigerador (5°C) antes de empezar con el

proceso de congelación. Tras el período de equilibrado y justo antes de empezar el protocolo de congelación, se extrajo una alícuota de cada muestra para la valoración de la calidad seminal.

V. Congelación y descongelación seminal

Se llevaron a cabo congelaciones seminales en 15 ocasiones diferentes. La mitad de las pajuelas obtenidas de cada eyaculado se congelaron y conservaron mediante la utilización de nitrógeno líquido, mientras la restante mitad se congelaba y conservaba mediante la utilización de ultracongeladores de -152°C . Concretamente, los procesos de crioconservación fueron los siguientes:

- Protocolo NL, las pajuelas se congelaron sobre vapores de nitrógeno líquido (rampa de congelación, a 4 cm de la superficie del nitrógeno) durante 15 minutos. Una vez finalizado este periodo, las pajuelas se sumergían en NL y se almacenaron en un criocontenedor (Criocontenedor MVE, XC 47/11-10) de NL, hasta el momento de la descongelación.
- Protocolo ULF, tras el período de equilibrado, las pajuelas se trasladaron (en el interior de una caja de poliestireno) directamente desde la cámara frigorífica ($4-5^{\circ}\text{C}$) y se introdujeron en el ultracongelador de -152°C , donde el semen permaneció almacenado hasta el momento de su descongelación.

El modelo de ultracongelador empleado fue el Sanyo (MDF-1155 ATN, Sanyo Electric Co., Japan) equipado con un microprocesador de temperatura que mantenía el interior del ultracongelador a -152°C ; este equipo se alimenta de corriente eléctrica y tiene una capacidad volumétrica de 160 litros, con una capacidad de almacenaje entre 8000 y 10000 pajuelas de 0.5 ml. Antes del inicio de la experiencia, la curva del descenso de temperatura del ultracongelador de -152°C fue definida, mediante la utilización de un termómetro Crison TM 65 (Barcelona), con sonda de inmersión introducida en el ultracongelador, dentro de las pajuelas llenas de semen y diluyente. El descenso de temperatura quedó establecida de la siguiente forma: una velocidad de congelación de $4.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre los 5 y los -10°C , y una mayor velocidad de congelación de $-25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde los -10°C hasta los -110°C ; a partir de esta temperatura, la velocidad de congelación fue de $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde los -110°C hasta los -140°C .

La descongelación se llevó a cabo a los 1, 30, 90 y 365 días tras la congelación. Las pajuelas congeladas fueron sumergidas en agua a 37°C durante 30 segundos, para luego verter el semen de cada pajuela en 1 ml de PBS a 37°C; las muestras fueron entonces mantenidas a 37°C hasta su completa valoración. Tras la descongelación, en cada pajuela, se determinaba la motilidad espermática, el porcentaje de morfoanomalías y de acrosomías, utilizando los mismos procedimientos que se han descrito. Quince pajuelas de cada macho fueron evaluadas cada día (1, 30, 90 y 365 días) y en cada protocolo (NL, ULF).

4.1.2.2. Experimento 2

I. Animales

Ciento cincuenta cabras lecheras de la raza Majorera (59 nulíparas y 91 múltiparas) fueron usadas en este experimento. Las cabras mostraban ciclos estrales regulares de 20-21 días y, antes del inicio de los tratamientos de sincronización, se les realizó un examen ultrasonográfico del tracto reproductivo para intentar descartar hembras con pseudogestaciones. La alimentación, alojamiento y plan sanitario era similar al descrito para los machos cabríos.

II. Sincronización del celo y la ovulación. Detección de celos.

Los ciclos estrales fueron sincronizados mediante la inserción de esponjas vaginales impregnadas en progestágeno (45 mg de acetato de fluorogestona, Chronogest®, Intervet) durante 11 días. Dos días antes de su retirada, las cabras recibieron una inyección intramuscular de eCG (200UI, Foligon®, Intervet) y 7.5 mg de análogo de Prostaglandina F_{2α} (Luprostiol, Prosolvin®, Intervet).

La detección de celo se llevó a cabo 3 veces al día (separadas 8 horas entre sí), empezando 12 horas tras la retirada de las esponjas. Como ya se ha indicado previamente, cada cabra era presentada individualmente al macho y los machos estaban provistos de un mandil para evitar penetraciones.

III. Diseño experimental e inseminación artificial

Los eyaculados se recogieron de los tres machos que presentaron mejor calidad del semen post-descongelación en el experimento 1. Tras la recogida, el semen era mezclado (*pool*) y procesado como ya se ha explicado con anterioridad, hasta alcanzar una concentración final de 400×10^6 espermatozoides/ml. Posteriormente, el semen diluido fue envasado en pajuelas de 0.5 ml y tras los correspondientes procesos de refrigeración y equilibrado, las pajuelas fueron congeladas por los dos protocolos (NL y ULF). Antes de realizar las inseminaciones, las pajuelas eran descongeladas al baño María a 37°C durante 30 segundos. Para cada grupo experimental, se valoraban las pajuelas para confirmar que las hembras eran inseminadas cada vez con un mínimo de 100×10^6 espermatozoides móviles.

Las cabras fueron asignadas a cuatro grupos experimentales (Figura II), teniendo en cuenta su edad, fecha de parto previo y producción láctea, y realizando una distribución uniforme: en el grupo NL-1 (n=40), las cabras fueron inseminadas con semen descongelado, previamente congelado y almacenado en nitrógeno líquido durante un mes; en el grupo NL-6 (n=35), las cabras fueron inseminadas con semen descongelado tras haber estado almacenado en nitrógeno líquido durante 6 meses; en el grupo ULF-1 (n=40), las cabras fueron inseminadas con semen descongelado, después de permanecer congelado en ultracongelador de -152°C durante un mes; finalmente, las cabras del grupo ULF-6 (n=35) fueron inseminadas con semen descongelado, previamente congelado y conservado en ultracongelador de -152°C durante 6 meses.

Las inseminaciones siempre se realizaban de manera uniforme, de tal forma que cada vez que se producían las inseminaciones, un lote de hembras era inseminada con semen congelado-descongelado en nitrógeno líquido y otro lote, con un número similar de cabras, con semen congelado-descongelado en ultracongelador de -152°C. La primera inseminación se realizaba 12 horas tras la detección de los primeros síntomas de celo (aproximadamente a las 18 horas tras el inicio del celo) y, a partir de este momento, cada 12 horas hasta el final del celo, con un mínimo de 2 (18 y 30 horas tras el inicio del celo) y un máximo de 3 (18, 30 y 42 horas tras el inicio del celo) inseminaciones.

Las cabras fueron inseminadas vía cérvix con una pipeta de inseminación, mediante visualización directa de la entrada del cérvix (Andersen y cols., 1973). El semen fue depositado lo más profundamente posible en el tracto genital, definiendo que el tiempo máximo empleado en realizar la inseminación artificial nunca fuese superior a los 60 segundos por animal. Todas las inseminaciones se llevaron a cabo por dos técnicos especializados.

IV. Diagnóstico de gestación y tasas de fertilidad

La gestación fue confirmada mediante ultrasonografía trasabdominal el día 35 tras la inseminación, usando un ecógrafo portátil de tipo B a tiempo real (Aloka SSD-500), equipado con una sonda lineal de 5.0 a 7.5 MHz. Se consideraba que las cabras estaban gestantes cuando se detectaba, con total fiabilidad, el latido cardíaco del embrión. Posteriormente, las cabras fueron reevaluadas para confirmar la viabilidad fetal a los 60, 90, 120 y 140 días de gestación. Finalmente, tras del parto, las tasas de fertilidad y prolificidad fueron registradas en cada una de las hembras.

4.1.2.3. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar de la media (SEM). Los datos de viabilidad espermática del experimento 1 fueron analizados usando el modelo lineal general (ANOVA) de SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). El modelo lineal incluía el efecto de los machos (n=5), los protocolos de congelación (dos protocolos) y el tiempo de almacenamiento (1, 30, 90 y 365 días), así como las interacciones entre ellos. Las variables dependientes expresadas como porcentajes (motilidad espermática, integridad del acrosoma y morfoanomalías) eran sometidas a transformación arcosenica antes de su análisis. Las diferencias entre las medias fueron analizadas mediante la prueba de Duncan. Con respecto a los resultados de fertilidad, las diferencias entre grupos experimentales, estado reproductivo de las cabras (núlparas/múltiparas) y el efecto del tiempo de criopreservación, se compararon por la prueba exacta de Fisher. Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

Figura I. Planificación de la recogida de muestras, contrastación, criopreservación y descongelación seminal (experimento 1)

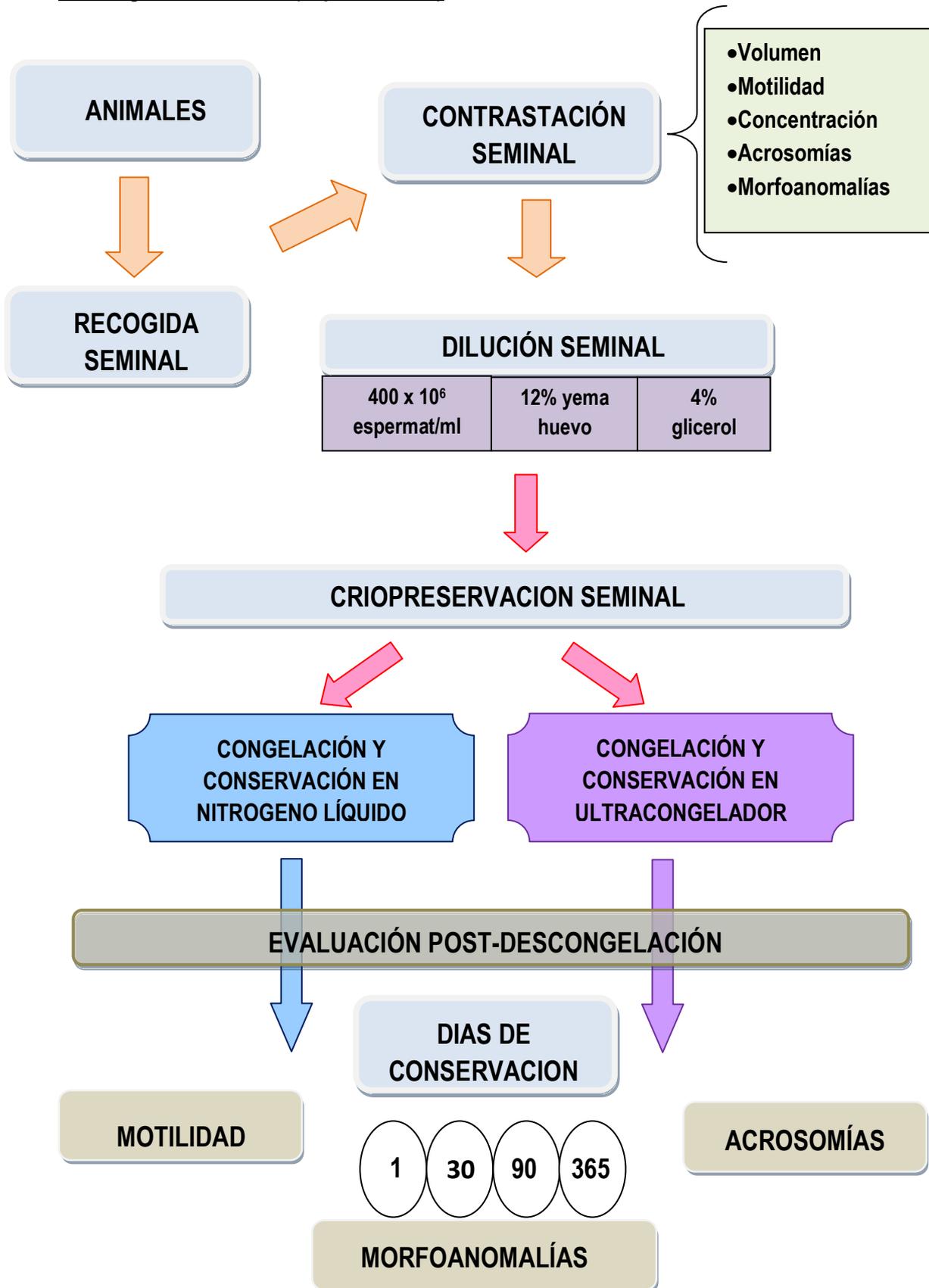
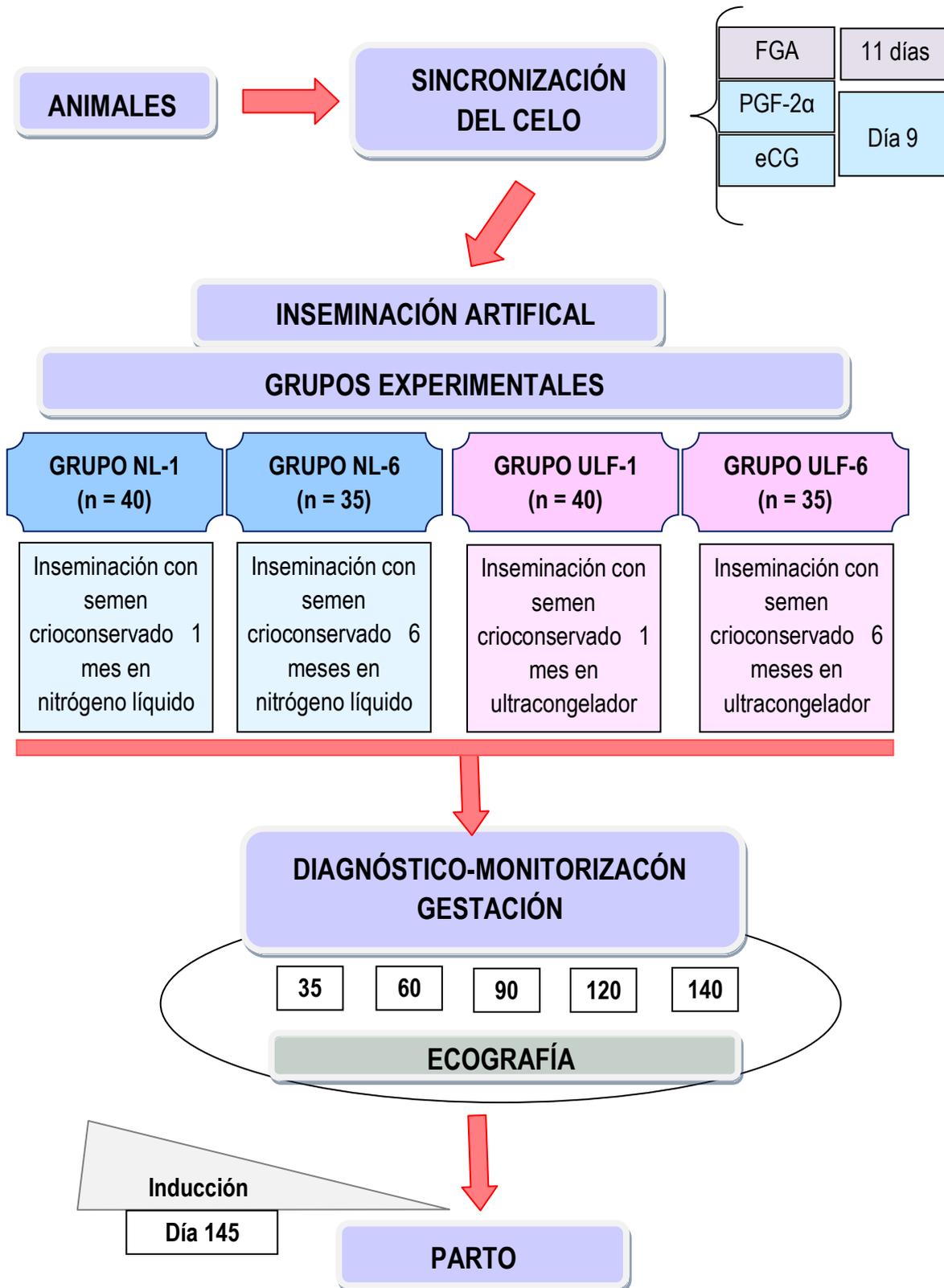


Figura II. Diseño experimental de los procedimientos de sincronización, inseminación artificial y control de la gestación en los diferentes grupos experimentales (experimento 2)



4.1.3. RESULTADOS

La Tabla 4.1.1. representa la calidad seminal de los eyaculados de los machos donantes. El macho 1 presentó el mayor volumen eyaculado, siendo significativamente diferente ($p < 0.05$) con respecto al resto de ejemplares. La concentración espermática mostraba importantes diferencias ($p < 0.05$) entre machos, mostrando valores de concentración total que oscilaban entre 5.7×10^9 y 7.4×10^9 espermatozoides (macho 5 vs macho 2). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.1$) en la motilidad espermática total (rango de medias individuales: 84.7-89.9%) entre los machos; del mismo modo, todos los individuos mostraron valores medios de motilidad progresiva muy uniformes, con valores medios en torno al 70-75%. Además, el porcentaje de espermatozoides con morfoanomalías fue inferior al 9% en todos los machos (rango: 1.0-8.0%), mientras la integridad del acrosoma superó el 82% en todos los eyaculados; tampoco se detectaron diferencias significativas entre machos para estos parámetros.

Tabla 4.1.1. Media \pm SEM de volumen eyaculado, concentración espermática, porcentajes de motilidad espermática progresiva, morfoanomalías y porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto en semen fresco de los machos donantes (n=5).

Macho	Volumen eyaculado (ml)	Concentración espermática ¹	Motilidad progresiva (%)	Morfoanomalías (%)	Acrosomas intactos (%)
1	1.7 ^a \pm 0.2	4.2 ^a \pm 0.5	75.3 \pm 1.8	6.5 \pm 1.2	86.1 \pm 3.9
2	1.2 ^b \pm 0.1	6.1 ^b \pm 0.6	73.5 \pm 2.8	3.6 \pm 0.3	87.9 \pm 3.1
3	1.1 ^b \pm 0.1	5.6 ^b \pm 0.3	72.7 \pm 3.5	3.3 \pm 0.5	90.7 \pm 2.9
4	1.2 ^b \pm 0.2	4.9 ^{ab} \pm 0.5	71.3 \pm 4.9	4.0 \pm 0.8	90.8 \pm 2.2
5	1.1 ^b \pm 0.1	5.2 ^b \pm 0.1	76.3 \pm 2.1	3.1 \pm 0.4	87.2 \pm 4.6

¹: Concentración espermática expresada en $\times 10^9$ espermatozoides/ml

^{ab} Diferentes letras en la misma columna denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

La motilidad progresiva en cada grupo experimental se muestra en la Tabla 4.1.2. Cuatro machos (1, 2, 4, 5) no mostraron diferencias significativas para los valores medios de los porcentajes de motilidad espermática entre los distintos protocolos de congelación (rango: 49.4-68.7% y 51.9-65.0%, para NL y ULF respectivamente); además, el porcentaje de motilidad

progresiva de ninguno de los machos varió significativamente en todo el período experimental; de hecho, la motilidad progresiva de estos cuatro ejemplares siempre se situó entre un 37% y un 45%. Cuando las muestras de estos machos fueron comparadas, no se detectaron diferencias significativas entre ambos protocolos de congelación a lo largo de todo el período experimental.

Sin embargo, el macho 3 mostraba una disminución en la motilidad espermática (total y progresiva) desde el día 1 en adelante para ambos protocolos de congelación, registrando diferencias significativas ($p < 0.01$) con el resto de machos y en casi todos los días evaluados. Por otro lado, al igual que el resto de ejemplares, el macho 3 no presentaba diferencias significativas en los valores medios de motilidad espermática a lo largo del período experimental ni entre los distintos protocolos de congelación.

Tabla 4.1.2. Porcentajes (media \pm SEM) de motilidad espermática progresiva a lo largo del período experimental en muestras congeladas-descongeladas en nitrógeno líquido (NL) o en un ultracongelador (ULF)

Período experimental	Protocolo de congelación	Macho 1	Macho 2	Macho 3	Macho 4	Macho 5
Día 1	NL	38.2 ^a \pm 3.0	42.6 ^a \pm 1.6	29.6 ^b \pm 3.4	41.8 ^a \pm 2.8	40.2 ^a \pm 2.0
	ULF	41.1 ^a \pm 2.2	38.4 ^a \pm 2.1	28.4 ^b \pm 3.2	40.7 ^a \pm 5.0	41.7 ^a \pm 2.1
Día 30	NL	40.3 ^a \pm 3.2	39.8 ^a \pm 2.7	29.7 ^b \pm 3.5	38.5 ^a \pm 4.0	42.0 ^a \pm 2.2
	ULF	42.2 ^a \pm 4.3	41.3 ^a \pm 1.9	28.9 ^b \pm 3.5	43.7 ^a \pm 4.6	43.5 ^a \pm 3.3
Día 90	NL	41.5 ^a \pm 3.2	45.1 ^b \pm 3.1	30.0 ^b \pm 1.5	40.8 ^a \pm 2.4	43.8 ^a \pm 2.0
	ULF	37.9 ^a \pm 1.3	36.8 ^{ab} \pm 4.1	29.3 ^b \pm 2.3	42.8 ^a \pm 3.0	44.2 ^a \pm 2.5
Día 365	NL	37.2 ^a \pm 2.1	44.7 ^a \pm 1.9	28.8 ^b \pm 1.2	39.5 ^a \pm 2.4	**
	ULF	38.2 ^a \pm 3.1	45.3 ^a \pm 2.2	29.4 ^b \pm 1.3	38.8 ^a \pm 2.4	**

^{ab} Diferentes letras en la misma fila denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

La Tabla 4.1.3 muestra los porcentajes de integridad de la membrana del acrosoma. Dentro de cada macho, no se detectaron diferencias significativas entre los protocolos de congelación (NL y ULF), mostrando valores medios muy similares para cada uno de los días valorados a lo largo del periodo experimental.

Cuando los machos fueron comparados entre ellos, solo el macho 3 presentó el día 30 post-congelación, un porcentaje menor de espermatozoides con acrosoma intacto que el resto de ejemplares. Concretamente, en el protocolo ULF, el macho 3 presentó una proporción de acrosomas intactos significativamente inferior ($p < 0.01$) al resto de individuos, mientras en el protocolo de NL, las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) solo entre los machos 4 y 5 con respecto al macho 3; este último macho siguió mostrando el valor más bajo de acrosomas no alterados.

Tabla 4.1.3. Porcentaje (media \pm SEM) de espermatozoides con integridad acrosómica a lo largo del periodo experimental en muestras congeladas-descongeladas en nitrógeno líquido (NL) o en un ultracongelador (ULF)

Periodo experimental	Protocolo de congelación	Macho 1	Macho 2	Macho 3	Macho 4	Macho 5
Día 1	NL	69.2 \pm 2.4	67.7 \pm 3.4	68.9 \pm 1.1	73.8 \pm 2.4	71.6 \pm 3.6
	ULF	72.0 \pm 4.2	70.8 \pm 3.3	67.3 \pm 4.1	70.3 \pm 3.1	69.8 \pm 4.1
Día 30	NL	68.3 ^{ab} \pm 4.4	69.2 ^{ab} \pm 4.3	63.3 ^b \pm 1.2	72.0 ^a \pm 2.5	71.7 ^a \pm 2.2
	ULF	67.6 ^a \pm 3.7	72.2 ^a \pm 3.5	56.1 ^b \pm 4.5	72.9 ^a \pm 5.7	68.3 ^a \pm 4.9
Día 90	NL	70.1 \pm 5.5	69.0 \pm 2.5	66.9 \pm 1.1	68.3 \pm 9.9	73.4 \pm 4.9
	ULF	70.6 \pm 3.1	69.3 \pm 2.5	67.1 \pm 2.0	71.8 \pm 6.6	67.8 \pm 9.2
Día 365	NL	67.0 \pm 4.2	69.7 \pm 3.2	65.9 \pm 2.0	71.1 \pm 4.2	**
	ULF	70.8 \pm 6.0	70.8 \pm 3.1	68.2 \pm 3.0	70.3 \pm 4.5	**

^{ab} Diferentes letras en la misma fila denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

El porcentaje de morfoanomalías observado a lo largo de la experiencia se expresa en la Tabla 4.1.4. Todos los machos mostraron unos valores de morfoanomalías relativamente bajos (rango: 2.0-18.0), no mostrando diferencias significativas entre las técnicas de congelación o entre los diferentes machos, para ninguno de los días valorados; además, el 85.5% de las pajuelas mostraron un porcentaje de morfoanomalías menor al 12%.

Tabla 4.1.4. Porcentaje (media \pm SEM) de espermatozoides con morfología anormal a lo largo del periodo experimental en muestras congeladas-descongeladas en nitrógeno líquido (NL) o en un ultracongelador (ULF)

Periodo experimental	Protocolo de congelación	Macho 1	Macho 2	Macho 3	Macho 4	Macho 5
Día 1	NL	7.9 \pm 1.5	6.9 \pm 2.0	6.4 \pm 0.9	8.0 \pm 0.8	7.5 \pm 1.5
	ULF	8.2 \pm 2.6	7.5 \pm 3.9	7.2 \pm 1.3	7.7 \pm 0.5	7.6 \pm 0.9
Día 30	NL	7.7 \pm 1.6	6.7 \pm 0.5	6.6 \pm 1.1	8.1 \pm 0.7	6.9 \pm 2.2
	ULF	8.6 \pm 2.5	9.2 \pm 1.7	7.4 \pm 1.2	7.5 \pm 1.0	8.5 \pm 2.0
Día 90	NL	7.6 \pm 1.7	7.2 \pm 3.3	7.1 \pm 1.8	8.3 \pm 1.0	6.8 \pm 3.4
	ULF	7.1 \pm 3.1	8.2 \pm 3.3	7.9 \pm 2.2	7.2 \pm 1.4	7.9 \pm 4.2
Día 365	NL	7.3 \pm 1.7	8.0 \pm 2.6	7.1 \pm 3.2	8.5 \pm 1.5	**
	ULF	8.3 \pm 1.8	7.4 \pm 0.9	7.6 \pm 2.7	7.0 \pm 1.2	**

Con respecto a los resultados del experimento 2, el intervalo de tiempo transcurrido desde la retirada de las esponjas vaginales hasta el inicio del estro fue de 29.3 ± 2.1 horas y un 72.7% (109/150) de las cabras iniciaron las manifestaciones de celo entre las 24 y las 32 horas tras la retirada la esponja. Además, la duración del celo no varió entre los diferentes grupos experimentales (36.8 ± 1.1 ; 38.1 ± 2.2 ; 37.2 ± 2.7 ; 38.6 ± 1.9 para los grupos NL-1, ULF-1, NL-6 y ULF-6, respectivamente). Sin embargo, la duración del estro si se vio influenciada por el número de partos de las hembras, siendo aproximadamente 9 horas más prolongado en multíparas (41.2 h) que en cabras nulíparas (32.0 h).

La Tabla 4.1.5 muestra los resultados de fertilidad después del protocolo de inseminación artificial. La tasa de gestación se situó en torno al 40% en ambos protocolos de congelación (NL y ULF), con independencia del tiempo de almacenamiento de las dosis seminales (1 y 6 meses). Dos cabras gestantes, una perteneciente al grupo NL-1 y otra al grupo ULF-1, murieron en el último tercio de la gestación, que se tradujo en una ligera disminución en los porcentajes de cabritos nacidos, pero sin que implicase la aparición de diferencias significativas. Por otro lado, al comparar ambos protocolos de criopreservación, se registró un porcentaje similar de cabras con partos simples (31.2%, 10/32 vs 34.5%, 10/29 para NL vs ULF, respectivamente) y cabras con partos dobles (68.7%, 22/32 vs 65.5%, 19/29 para NL vs ULF, respectivamente). En consecuencia, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la prolificidad (entre 1.60 y 1.67) entre protocolos, ni a lo largo del periodo experimental.

Tabla 4.1.5. Tasa de gestación, fertilidad a término y prolificidad tras inseminación artificial con semen congelado-descongelado almacenado durante 1 y 6 meses en nitrógeno líquido (NL) o en un ultracongelador (ULF)

Protocolo de congelación	Tasa de gestación día 35 (%)	Tasa de gestación día 60 (%)	Fertilidad a término (%)	Prolificidad
NL-1 ^a	45.0 (18/40)	45.0 (18/40)	43.6 (17/39)	1.64 (28/17)
ULF-1 ^b	40.0 (16/40)	40.0 (16/40)	38.5 (15/39)	1.67 (25/15)
NL-6 ^c	42.8 (15/35)	42.8 (15/35)	42.8 (15/35)	1.60 (24/15)
ULF-6 ^d	40.0 (14/35)	40.0 (14/35)	40.0 (14/35)	1.64 (23/14)

NL-1^a: Muestras conservadas en nitrógeno líquido durante 1 mes
 ULF-1^b: Muestras conservadas en ultracongelador durante 1 mes
 NL-6^c: Muestras conservadas en nitrógeno líquido durante 6 meses
 ULF-6^d: Muestras conservadas en ultracongelador durante 6 meses

Finalmente, la Tabla 4.1.6 muestra la fertilidad y la prolificidad en cabras múltiparas y cabras nulíparas. Las cabras nulíparas presentaron una fertilidad a término que oscilaba entre un 28 y un 33%, sin detectarse diferencias significativas entre periodos (1 y 6 meses) y/o protocolos (NL, ULF). Del mismo modo, las cabras múltiparas registraron una tasa de nacimientos prácticamente similar en todos los protocolos (en torno al 50%), sin diferencias entre ellos, pero

sí que mostraron un porcentaje significativamente mayor ($p < 0.01$) de nacimientos que las hembras nulíparas en todos los grupos experimentales. Por último, la prolificidad presentaba también un registro mayor ($p < 0.05$) en cabras multíparas que en las nulíparas, para todos los grupos experimentales evaluados.

Tabla 4.1.6. Fertilidad a término y prolificidad tras inseminación artificial con semen congelado-descongelado almacenado durante 1 y 6 meses en nitrógeno líquido (NL) o en un ultracongelador (ULF) en cabras multíparas y cabras nulíparas

Protocolo de congelación	Fertilidad a término		Prolificidad	
	Nulíparas	Multíparas	Nulíparas	Multíparas
NL-1 ^a	33.3 ¹ (5/15)	50.0 ² (12/24)	1.20 ¹ (6/5)	1.83 ² (21/12)
ULF-1 ^b	29.4 ¹ (5/17)	45.4 ² (10/22)	1.40 ¹ (7/5)	1.80 ² (18/10)
NL-6 ^c	33.3 ¹ (4/12)	47.8 ² (11/23)	1.25 ¹ (5/4)	1.73 ² (19/11)
ULF-6 ^d	28.6 ¹ (4/14)	47.6 ² (10/21)	1.25 ¹ (5/4)	1.80 ² (18/10)

¹² Diferentes números en la misma fila y categoría (fertilidad a término, prolificidad) denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

NL-1^a: Muestras conservadas en nitrógeno líquido durante 1 mes

ULF-1^b: Muestras conservadas en ultracongelador durante 1 mes

NL-6^c: Muestras conservadas en nitrógeno líquido durante 6 meses

ULF-6^d: Muestras conservadas en ultracongelador durante 6 meses

4.1.4. DISCUSIÓN

Este estudio define, por primera vez, la calidad del semen caprino tras una criopreservación prolongada (1 año) usando un ultracongelador de -152°C . Además, los resultados muestran que el almacenamiento a largo plazo de semen caprino no altera su calidad, con independencia del protocolo de preservación. Finalmente, los ensayos de fertilidad confirmaron que las muestras congeladas y almacenadas en ultracongeladores de -152°C permanecen fértiles tras 6 meses de criopreservación.

La calidad del semen fresco fue muy similar entre machos y solo se observaron diferencias significativas en el volumen eyaculado y en la concentración espermática. Tras la descongelación, la motilidad espermática (total y progresiva) mostraba valores medios similares entre protocolos de congelación, siendo comparables a los registros con semen congelado-descongelado en otras razas caprinas (Tuli y Holtz, 1994; Singh y cols., 1995; Hidalgo y cols., 2007; Cabrera y cols., 2005; Chang-Yong y cols., 2006).

La mayoría de estudios de criopreservación del semen en la especie caprina han incluido el uso de nitrógeno líquido para congelar semen (Singh y cols., 1995; Cabrera y cols., 2005; Chang-Yong y cols., 2006; Hidalgo y cols., 2007) y solo algunos estudios han congelado las muestras de semen sin nitrógeno líquido (Leboeuf y cols., 2000; Gacitua y cols., 2005); sin embargo, todos los estudios publicados siempre utilizaron nitrógeno líquido para el almacenamiento posterior. Un trabajo preliminar desarrollado en nuestro laboratorio (Medrano y cols., 2002), pero con un menor número de animales, propuso el uso de ultracongeladores para la criopreservación seminal, donde no era necesario el uso de nitrógeno líquido, ni para la congelación ni para su posterior conservación. En dicho estudio (Medrano y cols., 2002), el semen congelado-descongelado mostró unos valores medios de motilidad progresiva que oscilaron entre el 31% y el 42% (evaluado subjetivamente), en comparación con los valores de 29-45% (evaluado por el sistema CASA), obtenido en nuestro estudio. Parece evidente que el ULF no modificó los parámetros de la motilidad tras la congelación seminal, registrando valores medios altamente correlacionados entre los dos protocolos.

La motilidad espermática no se vio modificada a lo largo de todo el período experimental para ninguno de los machos, mostrando valores medios razonablemente constantes hasta el año

de congelación. Estos resultados coinciden con otros datos publicados que no refieren variación de la calidad seminal durante todo el período de criopreservación (Waide y cols., 1977); sin embargo, otros estudios han encontrado un deterioro en la viabilidad espermática después de un almacenamiento a largo plazo utilizando nitrógeno líquido como medio de criopreservación (Corteel, 1975; Ritar y cols., 1991). Por otra parte, los resultados de nuestro estudio detectaron diferencias entre los machos en la viabilidad seminal después de la congelación. Esta variabilidad individual en la motilidad espermática tras la congelación parece resultar relativamente independiente de la calidad seminal en fresco que presenten los machos; en consecuencia, podemos asumir que es fundamental evaluar la calidad seminal tras la congelación-descongelación para definir los machos donantes como “buenos congeladores” o “malos congeladores” (Leboeuf y cols., 2000).

El porcentaje de espermatozoides con la membrana acrosómica intacta en ambos protocolos de criopreservación mostraba valores (medios) en torno al 60-70%. En otras razas caprinas, tras la congelación y almacenamiento con nitrógeno líquido, el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos oscilaba entre el 40 y el 70% (Singh y cols., 1995; Cabrera y cols., 2005; Dorado y cols., 2007). Del mismo modo, la integridad acrosómica registrada en muestras seminales congeladas y almacenadas en un ULF, alcanzó valores medios del 55% (Medrano y cols., 2002). En consecuencia, nuestros valores son asimilables a los registrados tanto con NL como con ULF, siendo ligeramente superiores a la mayor parte de los estudios publicados.

Con respecto al porcentaje de morfoanomalías tras la descongelación, ambos protocolos (NL y ULF) presentaron resultados estadísticamente similares; además, cuando los machos se compararon entre ellos, los porcentajes de espermatozoides sin morfoanomalías fueron similares durante todo el período experimental. Diferentes estudios han evaluado el porcentaje de espermatozoides normales post-descongelación, registrando resultados que oscilaron entre un 50 y un 80%, tras la congelación en NL (Singh y cols., 1995; Salvador y cols., 2005; Dorado y cols., 2007; Hidalgo y cols., 2007); hasta el momento presente, no se han descrito resultados de morfoanomalías tras la conservación seminal mediante ULF. De acuerdo con nuestros resultados, el ULF no generó un mayor porcentaje de morfoanomalías en los espermatozoides cuando se conserva mediante este protocolo.

El índice de fertilidad observado en nuestra experiencia (43.2 y 39.2% para NL y ULF, respectivamente) era comparable a los obtenidos en otras razas caprinas después de realizar inseminación artificial cervical con semen congelado y descongelado: 39% en cabra Cashmere (Ritar y cols., 1990), y 39-42% en Saanen (Gacitua y cols., 2005). Otros estudios registraron valores superiores tras realizar inseminación artificial con semen congelado-descongelado: 47.6% en la raza Florida (Dorado y cols., 2007), 51% en la cabra de Angora (Ritar y cols., 1991), 57% en la Murciano-Granadina (Salvador y cols., 2005) y 57-61% en Saanen y Alpina (Leboeuf y cols., 2000).

Sin embargo, la mayoría de estos trabajos se llevaron a cabo con cabras multíparas, mientras en nuestro estudio se utilizaron tanto cabras multíparas como nulíparas. De hecho, nuestros resultados mostraron una marcada influencia del número de partos previos de las hembras sobre la tasa de fertilidad; concretamente, las cabras nulíparas presentaron una tasa de fertilidad significativamente inferior (28-33%) que las multíparas (45-50%). Dorado y cols. (2007) describieron una tasa de fertilidad mayor en cabras multíparas (58.8%) que en cabras uníparas (0%) tras realizar inseminación artificial con semen congelado-descongelado; además, se ha demostrado que, tras la inducción de celos con tratamientos hormonales, las cabras nulíparas eran menos fértiles que las multíparas tras realizar inseminación intra-cervical (Leboeuf y cols., 2000). En nuestro estudio, la menor tasa de fertilidad observada en cabras nulíparas podría explicarse por el momento en el que tuvo lugar la inseminación con respecto a la ovulación; en cabras multíparas, la inseminación se llevó a cabo en torno a la mitad del período de celo (duración media del celo: 41.2 h.), mientras que en las cabras nulíparas, la inseminación se realizó en la segunda mitad del celo (duración media del celo: 32.0 h.). Estos hallazgos son coherentes con lo descrito por Leboeuf y cols. (2000), que reportan mejores tasas de fertilidad en las cabras inseminadas durante la primera parte del período estral. Por otro lado, debería tenerse en cuenta que las cabras nulíparas muestran un mayor nivel de nerviosismo que las multíparas, y el estrés asociado con el manejo al que las hembras se ven sometidas por la técnica de inseminación, podría haber generado la menor tasa de fertilidad registrada en nuestro estudio.

Se han realizado diferentes estudios que evaluaban distintos factores que pudiesen afectar a la tasa de fertilidad tras inseminaciones con semen congelado-descongelado (Leboeuf

y cols., 2000; Salvador y cols., 2005; Dorado y cols., 2007). De esta manera, se ha descrito que cuando el semen era recogido en la estación reproductiva, la fertilidad era mejor en comparación a cuando el semen se extraía en la estación no reproductiva (Corteel y cols., 1988); en nuestro estudio, la recogida seminal siempre tuvo lugar en la estación reproductiva. De esta forma, la influencia de la estacionalidad sobre la congelabilidad del semen y, en consecuencia, sobre la posterior fertilidad podría descartarse en nuestro caso. Además, el semen fue mezclado antes de la congelación, para evitar la influencia de las diferencias entre machos en la “congelabilidad” del semen (Leboeuf y cols., 2000); asimismo, las pajuelas fueron evaluadas antes de llevar a cabo las inseminaciones, y solo las pajuelas con una motilidad progresiva mínima, fueron destinadas para realizar las inseminaciones artificiales. Por otro lado, la influencia del técnico inseminador sobre la fertilidad puede ser obviada, ya que ambos técnicos tenían la misma experiencia, y no se observaron diferencias de fertilidad en las hembras inseminadas por ambos técnicos.

Finalmente, diferentes investigadores han establecido la relación entre el lugar donde es depositado el semen y la tasa de fertilidad (Ritar y cols., 1983; Corteel y cols., 1988; Paulenz y cols., 2005), mostrando un mayor porcentaje de fertilidad cuando el semen era depositado en el cérvix o en el útero, en comparación a cuando el semen se depositaba a nivel vaginal. En nuestro estudio, la mayoría de las inseminaciones (90%) fueron intra-cervicales y, por tanto, esta circunstancia no debería haber influido sobre la tasa de fertilidad registrada.

Se han desarrollado muy pocos estudios que hayan valorado la influencia del tiempo de conservación de las pajuelas sobre la fertilidad, tras IA con semen congelado-descongelado. Fougner y cols. (1979) obtuvieron tasas de fertilidad de un 63.4% tras realizar inseminaciones intra-cervicales con semen conservado en NL durante 1-3 años y no hallaron diferencias significativas en la tasa de fertilidad a lo largo del período experimental. Sin embargo, otros estudios han descrito un declive en la calidad seminal (*in vitro*) tras un almacenamiento del semen durante 6 meses en NL (Ritar y cols., 1983). En nuestro estudio, no se observaron diferencias en la tasa de fertilidad tras realizar IA con semen congelado y descongelado durante 1 ó 6 meses de almacenamiento. Por lo tanto, estos resultados confirman que el tiempo de almacenamiento del semen no tiene influencia en la consecuente fertilidad.

Antes de nuestra experiencia, solamente un trabajo (Medrano y cols., 2002) había propuesto el uso de ULF para la congelación y el almacenamiento de semen caprino, pero ese estudio se llevó a cabo durante un corto período de almacenamiento (2 meses) y no se desarrollaron ensayos de fertilidad. En nuestro estudio, no se encontraron diferencias entre ambas técnicas de congelación, presentando resultados similares en calidad espermática *in vitro* durante todo el período experimental (1 año). Además, los resultados de fertilidad confirman que el semen caprino permanece fértil tras la criopreservación en ULF, mostrando tasas de fertilidad y prolificidad prácticamente iguales a las observadas tras IA con semen congelado con NL.

Los congeladores de temperaturas ultra-bajas presentan evidentes ventajas sobre el uso de nitrógeno líquido. De esta forma, se ha descrito (Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006) una mayor capacidad de almacenamiento del ULF, el menor tiempo empleado para la congelación de las pajuelas tras el equilibrado y un manejo mucho más sencillo de las muestras almacenadas. Además, al contrario que la criopreservación con el uso de nitrógeno líquido, no hace falta una reposición periódica del medio de congelación, y el coste global del proceso de congelación, es menor. Sin embargo, una manifiesta desventaja de este protocolo es la limitada movilidad del congelador, que podría reducir la eficacia de la IA en explotaciones ganaderas alejadas del laboratorio. Para evitar esta limitación, podrían plantearse nuevas experiencias, donde el semen congelado y almacenado en ULF sería posteriormente depositado en nitrógeno líquido, para luego evaluar la calidad seminal (*in vitro* e *in vivo*). Además, parecería interesante realizar nuevos ensayos de fertilidad, para determinar la tasa de fertilidad del semen caprino tras ser almacenado en ULF durante varios años.

EXPERIENCIA II

4.2. EXPERIENCIA II. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN (37°C, 20°C, 4°C, -196°C) Y DEL POOL SEMINAL SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA EN LOS MACHOS CABRÍOS DE RAZA MAJORERA.

4.2.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, distintos estudios han intentado definir cuáles son los mejores indicadores de la calidad seminal *in vitro* (Dorado y cols., 2007; Hidalgo y cols., 2007; Batista y cols., 2009). Diferentes parámetros como la motilidad espermática, el porcentaje de acrosomías y el porcentaje de morfoanomalías espermáticas se han propuesto como indicadores que permiten predecir la capacidad fertilizante del semen (Peterson y cols., 2007; Dorado y cols., 2009).

Algunas investigaciones han evaluado la influencia de la temperatura de conservación sobre la calidad seminal en distintas especies de mamíferos (Leboeuf y cols., 2000; Barbas y Mascarenhas, 2009). En concreto, la calidad seminal del macho cabrío ha sido evaluada en muestras conservadas entre 4 y 15-20°C (Leboeuf y cols., 2000; Paulenz y cols., 2005); del mismo modo, las características del semen fresco y las del semen congelado-descongelado han sido ampliamente definidas en diferentes estudios (Cabrera y cols., 2005; Salvador y cols., 2005; Dorado y cols., 2007, 2009). Sin embargo, hasta el momento, ningún estudio había comparado al mismo tiempo, la viabilidad espermática de muestras conservadas a 37, 20 y 4°C durante 24 horas, y la longevidad del semen congelado-descongelado.

La variabilidad individual en la calidad seminal tras la congelación-descongelación ha sido bien estudiada en verracos (Holt y cols., 2005) y perros (Batista y cols., 2006). En bovino, un estudio reciente revela que no existe variabilidad individual en cuanto a motilidad, porcentaje de acrosomías y estado de capacitación de semen crioconservado en nitrógeno líquido (Gillan y cols., 2008). Por otro lado, diferentes estudios han evaluado la importancia del uso de dosis heterospérmicas para mejorar la eficacia reproductiva en el caso de las cerdas (Roca y cols., 2006; Hernández y cols., 2007). Se ha confirmado que la utilización de un *pool* de semen incrementaba la tasa de fertilidad, cuando se comparaba con inseminaciones con semen procedente de ejemplares individuales (Godet y cols., 1996). Finalmente, distintos estudios (Paulenz y cols., 2000; Haugan y cols., 2005) han descrito la influencia del tiempo de almacenamiento sobre la calidad seminal en verraco, sugiriendo que el uso de dosis

heterospérmicas puede prevenir la disminución del índice reproductivo cuando se usa semen conservado.

En caprino, la mayoría de los estudios se han desarrollado usando dosis heterospérmicas (Leboeuf y cols., 2003a; Salvador y cols., 2006; Mara y cols., 2007). La variabilidad individual sobre la calidad del semen fresco, refrigerado y congelado también ha sido objeto de diferentes estudios (Paulenz y cols., 2005; Salvador y cols., 2005). Sin embargo, ningún estudio se ha llevado a cabo con el fin de estudiar si el uso de dosis heterospérmicas de semen caprino incrementa la calidad seminal y la consecuente fertilidad tras la inseminación artificial.

El primer objetivo de este experimento era establecer la calidad y longevidad del semen caprino (raza Majorera) conservado a diferentes temperaturas (37, 20, 4, -196°C) y procesado de manera individual o tras realizar un pool de eyaculados. Por otro lado, este trabajo trataba de definir la fertilidad tras realizar inseminaciones con semen fresco y congelado-descongelado, procesado bien de manera individual o tras realizar un *pool* de eyaculados.

4.2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.2.1. Experimento 1

I. Animales

Para este estudio se usaron cinco machos sanos de la raza Majorera, con edades comprendidas entre los 4 y los 6 años. Las condiciones de estabulación, alimentación y plan sanitario eran similares a las ya descritas en el apartado general de material y métodos. Todo el trabajo experimental se desarrolló de acuerdo a la legislación española referente a investigación y experimentación animal. Antes del comienzo de la experiencia, una evaluación ecográfica confirmó la ausencia de alteraciones a nivel de los testículos y la próstata.

II. Diseño experimental

Este experimento (Figura III), pretendía definir la viabilidad y longevidad del semen, sometido a diferentes temperaturas de preservación (37°C, 20°C, 4°C y -196°C), y procesado de manera individual o en forma de *pool*. De esta manera, se usaron eyaculados (n=30) de cinco machos cabríos, procesados de forma individual (semen individual: SI) y tras la primera dilución (porción

no glicerolada), cada eyaculado fue dividido en alícuotas y parte de estas alícuotas se mezclaron (*pool* de semen: PS). Posteriormente, las muestras seminales (SI y PS) fueron conservadas como semen fresco (37 y 20°C), semen refrigerado (4°C) y semen congelado (nitrógeno líquido). La motilidad espermática del semen fresco y refrigerado fue evaluado (análisis espermático computerizado, CASA) tras 2, 4, 8, 12 y 24 horas de preservación; asimismo, los porcentajes de acrosomías y morfoanomalías fueron evaluadas a las 1, 8 y 24 horas. Finalmente, muestras de semen (20 muestras por cada macho y 20 de PS) fueron descongeladas y conservadas a 37°C durante 12 horas; la motilidad se pretendía evaluar a las 1, 2, 4, 8 y 12 horas tras la descongelación. Además, los porcentajes de morfoanomalías y acrosomías fueron determinados a las 1, 8 y 12 horas tras la descongelación.

III. Recogida y valoración espermática

Seis eyaculados de cada macho fueron recogidos mediante vagina artificial, dos veces en semana, durante la estación reproductiva. Tras la recogida, el semen fue conservado a 37°C hasta su evaluación, donde se definía el volumen, concentración seminal, la motilidad progresiva (subjativa y mediante CASA) y los porcentajes de acrosomías y morfoanomalías. Todo el procedimiento de recogida seminal, así como las diferentes valoraciones de la calidad seminal se realizaron de manera similar a lo descrito en los apartados correspondientes de material y métodos.

Las muestras seleccionadas en este estudio debían presentar una concentración espermática superior a 2000×10^6 espermatozoides/ml, motilidad espermática progresiva > 70%, porcentaje de acrosomías < 20% y porcentaje de morfoanomalías < 90%.

IV. Procesado seminal: congelación y descongelación.

Tras la recogida seminal, cada eyaculado fue “lavado” para retirar el plasma seminal y se procesó individualmente. El proceso de lavado de los espermatozoides fue similar al descrito en la parte general de material y métodos (doble centrifugado, 700 x g, 15 minutos). Una vez eliminado el sobrenadante, se determinaba la concentración seminal y se ajustaba el volumen (a 20°C) con el diluyente I (diluyente no glicerolado, ver composición en Tabla 4), hasta alcanzar una concentración final de 800×10^6 espermatozoides/ml. En este momento, una alícuota (1 ml) del semen diluido de cada uno de los machos se añadía a un tubo de cristal, siendo mezclado y

homogeneizado (PS). Posteriormente, el semen diluido de cada macho (SI) y el *pool* seminal (PS) fueron divididos en cuatro nuevas alícuotas, siendo procesadas de la siguiente forma (figura III): la primera alícuota se depositaba en un tubo de cristal y se conservaba al baño María a 37°C; la segunda muestra se situaba en un tubo de cristal y se preservaba a temperatura ambiente (20°), una tercera alícuota se depositaba también en un tubo de cristal y era enfriada desde temperatura ambiente a 4°C (en un plazo de 1.5 horas), y conservada a 4°C (cámara de refrigeración); finalmente, la cuarta alícuota era destinada a ser criopreservada en nitrógeno líquido.

En las alícuotas destinadas a criopreservación, se añadió un segundo diluyente (diluyente glicerolado, ver composición en tabla 4), a temperatura ambiente (20°C), en un volumen similar al primer diluyente hasta alcanzar una concentración final de 400×10^6 espermatozoides/ml. Finalmente, el semen era envasado en pajuelas plásticas de 0.5 ml y selladas mediante microbolitas plásticas. Las pajuelas fueron depositadas dentro del refrigerador a 4°C durante 5 horas (enfriamiento de 2 horas desde temperatura ambiente a 4°C y 3 horas más de equilibrado). Tras la dilución y justo antes del período de equilibrado, se valoró la motilidad de cada una de las alícuotas. Una vez finalizado el período de equilibrado, las pajuelas se depositaron a unos 4 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido durante 15 minutos. Finalmente, esas pajuelas fueron sumergidas y conservadas en nitrógeno líquido. Estas muestras fueron conservadas en este medio durante 30 días. Se realizaron un total de 6 protocolos de criopreservación en este experimento (se congelaron 6 eyaculados por macho).

Para la descongelación de las pajuelas, se procedió a sumergirlas en agua a 37°C (durante 30 segundos) y el semen era depositado en 1 ml de PBS a 37°C y mantenido a esta temperatura durante el resto del experimento. Para determinar la longevidad seminal, la motilidad fue evaluada a las 1, 2, 4, 8 y 12 horas tras la descongelación; además, los porcentajes de espermatozoides con morfoanomalías y acrosomías fue determinada a las 1, 8 y 12 horas tras la descongelación. El número de pajuelas evaluadas de cada macho (SI) y del *pool* seminal (PS) fue de 20.

4.2.2.2. Experimento 2

I. Animales

En la segunda fase del experimento, se utilizaron un total de ciento veinte cabras de la raza Majorera, en condiciones similares de alimentación y estabulación que las descritas para los machos. Todas las hembras eran multíparas, con edades comprendidas entre 3 y 5 años, de fertilidad comprobada y con ciclos reproductivos regulares. Antes del comienzo de la experiencia, el aparato reproductor fue examinado mediante ecografía transabdominal, confirmando la idoneidad de los animales para participar en el estudio.

II. Diseño experimental

En la segunda parte del experimento (Figura IV), nuestro objetivo era valorar la tasa de fertilidad tras inseminación con semen fresco y semen congelado-descongelado, que hubiese sido procesado de manera individual o en forma de *pool*. Para tal fin, 120 cabras de raza Majorera fueron divididas en cuatro grupos experimentales. En el primer grupo (grupo SIF, n= 30), seis cabras fueron inseminadas con semen fresco de cada uno de los machos (cinco machos, seis cabras por macho). El segundo grupo (grupo SPF, n=30) incluía hembras inseminadas con semen fresco tras hacer el *pool* del semen de los cinco machos. En tercer grupo (grupo SIC, n=30), las hembras fueron inseminadas con semen congelado-descongelado; pajuelas con semen de cada macho fueron usadas para inseminar seis cabras (cinco machos, seis cabras por macho). En el último grupo (SPC, n=30), las hembras fueron inseminadas con un *pool* de semen congelado-descongelado. Todas las cabras fueron inseminadas con un mínimo de 120×10^6 espermatozoides móviles.

III. Sincronización y detección de celos

Durante la estación reproductiva, las hembras fueron sincronizadas mediante la inserción de esponjas intravaginales impregnadas en progestágeno (40 mg de FGA) durante 11 días. Cuarenta y ocho horas antes de la retirada de las esponjas, recibieron una inyección intramuscular de eCG (200 UI) y además se aplicó, al mismo tiempo, una dosis intramuscular de 7.5 mg de análogo de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (Luprostiol, 1 ml).

Los celos fueron detectados dos veces al día (separadas 12 horas), usando un macho testador, comenzando 12 horas tras la retirada de las esponjas. Las cabras fueron presentadas

al macho de forma individual. Se consideró que las cabras ya habían comenzado el celo, unas 6 horas antes de que aceptase la monta por primera vez.

IV. Inseminación artificial, diagnóstico de gestación y fertilidad

Las inseminaciones artificiales se llevaron a cabo con semen fresco y con semen congelado-descongelado. Para el semen fresco, se usaron muestras de cada macho tras ser evaluado (motilidad progresiva de los espermatozoides > 70%) y diluido hasta alcanzar una concentración final de 400×10^6 espermatozoides/ml. Además, se separaba una alícuota de semen de cada macho y se mezclaron hasta conseguir un *pool*. Las muestras de semen (tanto individual como el *pool*) fueron conservadas a 20 °C hasta el momento de la inseminación. Por otro lado, para el semen congelado-descongelado, las pajuelas fueron sumergidas en un baño de agua a 37°C durante 30 segundos. Las muestras eran evaluadas para confirmar que las cabras fuesen inseminadas con un mínimo de 120×10^6 espermatozoides móviles.

Las cabras se inseminaron entre 18 y 20 horas después del inicio del estro. El canal cervical se localizó usando un espéculo con luz como se ha descrito por Andersen y cols. (1973). El semen fue depositado lo más profundamente posible en el canal cervical, utilizando una pipeta de inseminación (Minitube-Ibérica, Tarragona, España). Todas las inseminaciones se realizaron por dos técnicos experimentados.

Treinta días tras la inseminación, se llevaron a cabo ecografías transabdominales (Aloka SSD-500, 5.0-7.5 MHz) para confirmar la tasa de gestación. Las cabras fueron consideradas gestantes cuando se detectó latido cardíaco embrionario (Martínez y cols., 1998). Además, las cabras fueron reevaluadas a los 45, 90 y 120 días de gestación para comprobar la viabilidad fetal. Para controlar mejor la paridera, las cabras fueron inducidas a parir el día 145 de gestación, mediante la administración de un análogo de prostaglandina, administrado por vía intramuscular. Por último, la tasa de fertilidad, prolificidad, así como el peso y sexo de los cabritos fueron registrados en el momento del parto.

4.2.2.3. Análisis estadístico

Los resultados se han expresado como media \pm error estándar de la media. Los datos del experimento 1 fueron analizados utilizando el procedimiento de modelo lineal general (ANOVA) del SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.), con objeto de determinar el efecto de los diferentes parámetros estudiados, así como la interacción entre ellos. El modelo lineal incluyó el efecto del macho (cinco), el procesado seminal (dos protocolos), el tiempo de conservación (1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas para la motilidad espermática; 1, 8 y 12 horas para el porcentajes de morfoanomalías y acrosomías) y la temperatura de almacenamiento (37°C, 20°C, 4°C, congelación-descongelación-37°C), así como las interacciones entre ellos. Las variables expresadas como porcentajes (motilidad, morfoanomalías y acrosomías) fueron transformados en arcosenos antes de su análisis. Cuando se encontraron diferencias significativas, se compararon las medias mediante el test de Tukey. Las diferencias en los resultados de fertilidad (experimento 2) se compararon mediante el test exacto de Fisher. Los valores se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

Figura III. Planificación de la recogida de muestras, contrastación, procesado y criopreservación de las muestras seminales (Experimento 1)

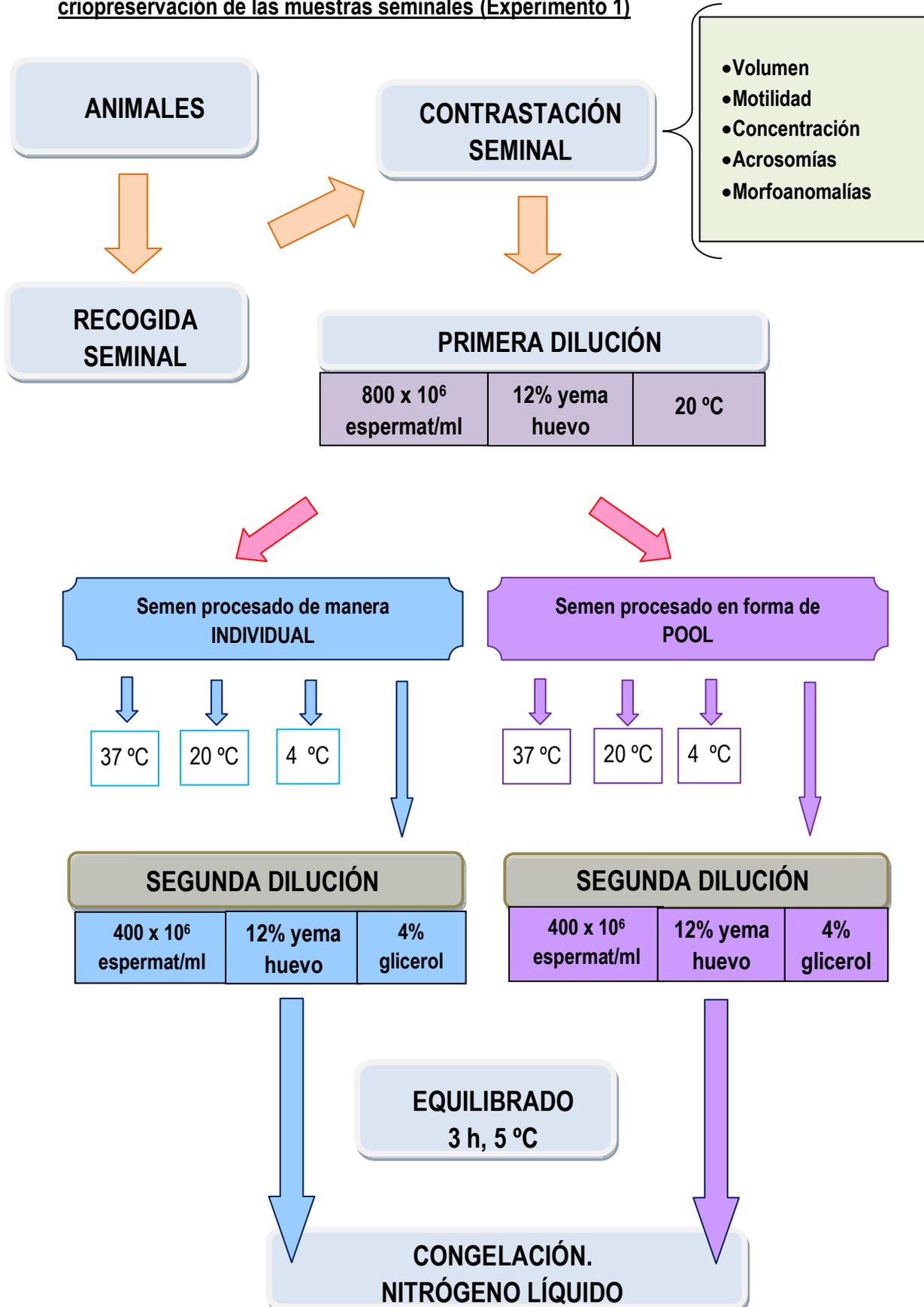
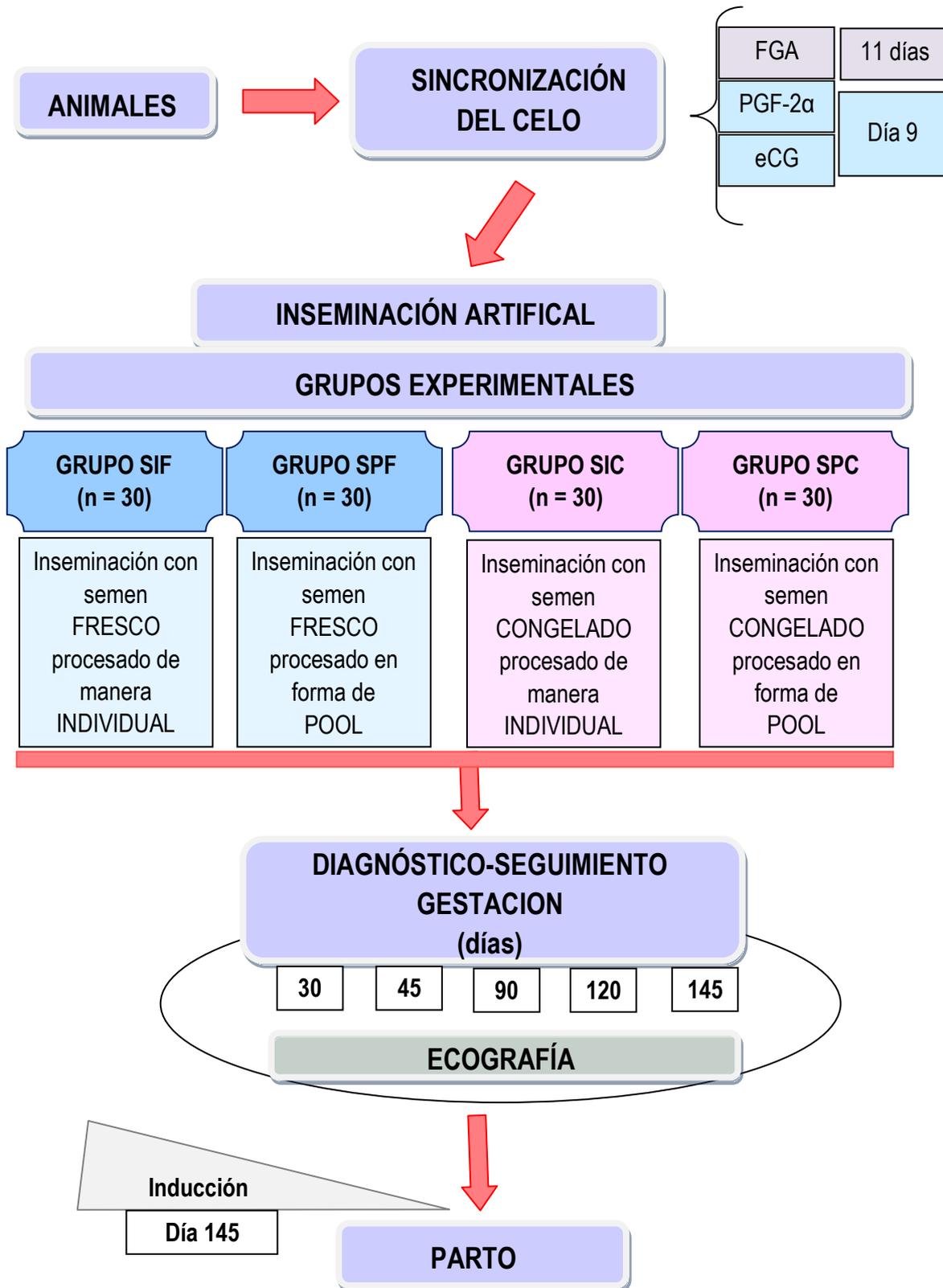


Figura IV. Diseño experimental de los procedimientos de sincronización, inseminación artificial y control de la gestación en los diferentes grupos experimentales (Experimento 2)



4.2.3. RESULTADOS

Las características del semen fresco se muestran en la Tabla 4.2.1. Como se observa, los valores de volumen eyaculado fueron prácticamente similares; con respecto a la concentración espermática, el macho 4 presentaba un menor número ($p < 0.05$) de espermatozoides/ml que los machos 2 y 5; sin embargo, el número total de células espermáticas por eyaculado era muy similar entre machos (rango: $6.4-7.0 \times 10^9$ espermatozoides/eyaculado). La motilidad espermática fue similar entre los machos 1, 3, 4 y 5, con valores muy uniformes dentro del mismo animal, y solo el macho 2 mostró una motilidad inferior a los otros. Todos los machos presentaron valores medios muy similares en el porcentaje de morfoanomalías, con valores inferiores al 8% en todos los casos y un valor medio nunca superior al 4%. Finalmente, el porcentaje de espermatozoides con acrosomas alterados siempre fue inferior al 11%, sin detectarse diferencias significativas entre los diferentes ejemplares.

Tabla 4.2.1. Media \pm SEM de volumen, concentración espermática y porcentajes de motilidad progresiva, morfoanomalías y acrosomas intactos en semen fresco de los machos donantes

Macho	Volumen (ml)	Concentración espermática ¹	Motilidad progresiva (%)	Morfoanomalías (%)	Acrosomas intactos (%)
1	1.4 \pm 0.1	4.7 \pm 0.2 ^{ab}	80.6 \pm 1.2 ^a	2.9 \pm 0.7	94.3 \pm 1.8
2	1.3 \pm 0.2	5.2 \pm 0.3 ^a	71.5 \pm 2.0 ^b	2.8 \pm 0.6	94.0 \pm 1.6
3	1.4 \pm 0.2	4.8 \pm 0.4 ^{ab}	80.0 \pm 3.1 ^a	3.5 \pm 2.3	94.3 \pm 1.0
4	1.6 \pm 0.2	4.0 \pm 0.2 ^b	79.2 \pm 2.7 ^a	2.6 \pm 1.5	92.4 \pm 0.9
5	1.4 \pm 0.2	5.0 \pm 0.1 ^a	80.3 \pm 3.7 ^a	3.8 \pm 0.9	92.9 \pm 1.1

¹: Concentración espermática expresada en $\times 10^9$ espermatozoides/ml

^{ab} Diferentes letras (superíndice) en la misma columna denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Las Tablas 4.2.2. y 4.2.3. muestran la motilidad progresiva de cada macho (semen procesado individualmente, SI) y del *pool* (PS) en los diferentes protocolos de conservación. A 37°C, todas las muestras presentan un declive progresivo en la motilidad espermática, siendo más evidente a partir de las 12 primeras horas de conservación, y únicamente el macho 1 muestra valores de motilidad progresiva cercanos al 25% tras 24 horas de incubación. Además, el macho 2 presentaba la motilidad más baja de todas ($p < 0.01$) tras las primeras 12 horas de

conservación. En las muestras preservadas a 20°C se observa que en 4 de los 5 ejemplares, la motilidad espermática apenas se modifica durante las 24 horas de incubación, con valores entre un 60 a un 70%; el macho 2 presenta los valores más bajos de motilidad desde el primer momento. Un patrón similar se observa en las muestras conservadas a 4°C, con valores que no varían a lo largo del periodo de preservación, si bien en uno de los machos (macho 2), los valores de motilidad espermática son entre un 20 a un 30% inferiores ($p < 0.01$) al resto de ejemplares.

Por otro lado, al comparar la motilidad espermática de las muestras individuales y la del *pool* seminal, no se detectan diferencias significativas (entre la mayor parte de los machos y el *pool*) durante todo el periodo experimental, en muestras preservadas a 37, 20 y 4°C; solo el macho 2 mostraba una motilidad progresiva inferior ($p < 0.01$) que el *pool*, en todas las temperaturas evaluadas (37, 20, 4 °C) y para todos y cada uno de los periodos evaluados (2, 4, 8, 12 y 24 horas).

Finalmente, cuando se procesaron las muestras congeladas y descongeladas, pudimos observar una proporción prácticamente similar (35-45%) de motilidad progresiva entre los eyaculados individuales y el *pool* tras las dos primeras horas post-descongelación; a partir de este momento, se registró un descenso de los valores medios de motilidad progresiva, siendo estos valores inferiores al 25%, en todas las muestras evaluadas, a partir de 8 horas tras la descongelación. Al igual que para el resto de temperaturas evaluadas, el macho 2 presentaba los valores más bajos de motilidad ($p < 0.05$), ya desde el primer periodo de tiempo evaluado, y mostrando valores inferiores al 10% a partir de las 4 horas de incubación.

Tabla 4.2.2. Porcentajes (media \pm SEM) de motilidad progresiva a lo largo del periodo experimental en semen fresco (37°C, 20°C)

		Machos					
T ^a	Horas	1	2	3	4	5	Pool
37°C	2	72.5 \pm 8.6 ^{ab,1}	55.0 \pm 5.2 ^{b,1}	80.5 \pm 3.5 ^{a,1}	72.5 \pm 3.7 ^{a,1}	80.0 \pm 4.5 ^{a,1}	74.7 \pm 4.1 ^{a,1}
	4	65.0 \pm 7.0 ^{a,12}	45.0 \pm 9.9 ^{b,1}	75.5 \pm 3.4 ^{a,1}	70.0 \pm 7.2 ^{a,1}	75.1 \pm 3.1 ^{a,1}	70.0 \pm 6.1 ^{a,1}
	8	62.5 \pm 9.7 ^{a,1,2}	15.3 \pm 8.3 ^{b,2}	62.5 \pm 2.5 ^{a,2}	57.5 \pm 3.6 ^{a,2}	62.5 \pm 3.5 ^{a,2}	62.4 \pm 2.5 ^{a,12}
	12	55.0 \pm 5.1 ^{a,2}	16.3 \pm 9.2 ^{b,2}	60.0 \pm 1.0 ^{a,2}	60.0 \pm 0.5 ^{a,2}	62.3 \pm 3.4 ^{a,2}	66.7 \pm 4.1 ^{a,2}
	24	24.5 \pm 3.2 ^{a,3}	8.3 \pm 4.5 ^{b,3}	2.7 \pm 3.4 ^{b,3}	5.5 \pm 2.3 ^{b,3}	10.0 \pm 2.3 ^{b,3}	13.3 \pm 6.7 ^{b,3}
20°C	2	68.3 \pm 9.4 ^a	48.3 \pm 5.4 ^b	71.7 \pm 5.4 ^a	67.0 \pm 3.5 ^a	68.1 \pm 3.1 ^a	74.7 \pm 2.0 ^a
	4	70.1 \pm 3.5 ^a	43.3 \pm 10.8 ^b	68.3 \pm 7.4 ^a	70.6 \pm 5.4 ^a	73.1 \pm 5.1 ^a	75.0 \pm 3.4 ^a
	8	69.3 \pm 4.1 ^a	48.3 \pm 4.1 ^b	66.7 \pm 7.4 ^a	71.3 \pm 5.4 ^a	67.0 \pm 7.0 ^a	70.2 \pm 3.5 ^a
	12	70.2 \pm 3.5 ^a	47.4 \pm 11.3 ^b	70.7 \pm 7.4 ^a	66.5 \pm 4.3 ^a	70.8 \pm 4.1 ^a	70.7 \pm 4.1 ^a
	24	63.3 \pm 5.4 ^a	43.3 \pm 10.4 ^b	69.0 \pm 6.1 ^a	70.9 \pm 7.4 ^a	70.0 \pm 3.5 ^a	65.0 \pm 9.3 ^a

^{abc}Diferentes letras (superíndice) en la misma fila y categoría (37°C, 20°C) denota diferencias significativas (p<0.05)

¹²³Diferentes números (superíndice) dentro de la misma columna y categoría (37°C, 20°C) denota diferencias significativas (p<0.05)

Tabla 4.2.3. Porcentajes (media \pm SEM) de motilidad progresiva a lo largo del periodo experimental para semen refrigerado (4°C) y semen congelado-descongelado

		Machos					
T ^a	Horas	1	2	3	4	5	Pool
4°C	2	68.3 \pm 5.9 ^a	43.3 \pm 8.4 ^b	71.4 \pm 2.0 ^a	68.3 \pm 7.4 ^a	71.0 \pm 7.1 ^a	69.0 \pm 1.7 ^a
	4	66.6 \pm 2.0 ^a	41.7 \pm 7.4 ^b	68.3 \pm 8.9 ^a	65.0 \pm 7.1 ^a	72.3 \pm 2.0 ^a	66.1 \pm 2.0 ^a
	8	65.0 \pm 3.5 ^a	35.0 \pm 6.1 ^b	64.3 \pm 2.4 ^a	61.7 \pm 5.3 ^a	68.3 \pm 4.5 ^a	65.6 \pm 4.1 ^a
	12	60.3 \pm 1.1 ^a	38.3 \pm 8.3 ^b	63.9 \pm 3.5 ^a	65.0 \pm 5.3 ^a	67.1 \pm 2.1 ^a	60.7 \pm 7.1 ^a
	24	60.0 \pm 2.9 ^a	38.3 \pm 5.4 ^b	63.7 \pm 4.1 ^a	60.3 \pm 4.8 ^a	66.7 \pm 2.2 ^a	59.9 \pm 6.7 ^a
-196°C	1	44.0 \pm 1.9 ^{a,1}	32.6 \pm 4.8 ^{b,1}	40.0 \pm 4.1 ^{a,1}	42.3 \pm 2.2 ^{a,1}	45.1 \pm 3.1 ^{a,1}	45.3 \pm 5.9 ^{a,1}
	2	41.7 \pm 2.3 ^{a,1}	27.1 \pm 5.1 ^{b,1}	35.9 \pm 3.2 ^{a,1}	38.0 \pm 4.3 ^{a,1}	42.3 \pm 1.4 ^{a,1}	43.2 \pm 6.0 ^{a,1}
	4	40.0 \pm 3.5 ^{a,1}	6.3 \pm 4.1 ^{b,2}	30.5 \pm 6.4 ^{c,1}	27.8 \pm 3.9 ^{c,2}	33.8 \pm 3.1 ^{c,2}	32.3 \pm 4.5 ^{c,2}
	8	19.7 \pm 9.3 ^{a,2}	4.0 \pm 1.0 ^{b,2}	2.0 \pm 2.2 ^{b,2}	5.6 \pm 2.0 ^{b,3}	5.3 \pm 2.6 ^{b,3}	12.7 \pm 2.5 ^{c,3}
	12	9.6 \pm 1.5 ^{a,3}	0.0 \pm 0.0 ^{b,3}	0.0 \pm 0.0 ^{b,2}	0.0 \pm 0.0 ^{b,3}	0.0 \pm 0.0 ^{b,3}	10.5 \pm 2.2 ^{a,3}

^{abc} Diferentes letras (superíndice) en la misma fila y categoría (4°C, -196°C) denota diferencias significativas (p<0.05)

¹²³ Diferentes números (superíndice) dentro de la misma columna y categoría (4°C, -196°C) denota diferencias significativas (p<0.05)

Los porcentajes de acrosomías (Tabla 4.2.4.) fueron prácticamente similares en las muestras conservadas a 20 y a 4°C (valores medios comprendidos entre 6.1 y 11.7%). Además, no se detectaron diferencias significativas en la proporción de acrosomías entre las dosis individuales y las muestras de *pool* durante todo el período de conservación. Sin embargo, todas las muestras de semen individual (menos en el caso del macho 4) conservadas a 37°C mostraron un aumento progresivo en el porcentaje de acrosomas alterados, a lo largo del periodo experimental. Finalmente, en las muestras congeladas-descongeladas no se encontraron diferencias significativas para las primeras 8 horas tras la descongelación; sin embargo, 12 horas tras la descongelación, la proporción de alteraciones del acrosoma se había incrementado notablemente, y únicamente las muestras PS mostraron valores medios de integridad del acrosoma por encima del 70%.

Tabla 4.2.4. Porcentajes (media \pm SEM) de acrosomías a lo largo del periodo experimental para semen fresco (37, 20°C), refrigerado (4°C) y congelado-descongelado

T ^a	Horas	Machos					
		1	2	3	4	5	<i>Pool</i>
37°C	1	9.0 \pm 5.5 ¹	9.5 \pm 2.1 ¹	11.0 \pm 2.8 ¹	9.9 \pm 1.4	8.2 \pm 2.2 ¹	12.1 \pm 2.0
	8	17.5 \pm 3.6 ^{a,12}	16.0 \pm 2.7 ^{a,2}	10.5 \pm 2.9 ^{ab,1}	8.4 \pm 2.1 ^b	7.8 \pm 2.5 ^{b,1}	14.2 \pm 1.4 ^{ab}
	24	24.5 \pm 2.1 ^{a,2}	22.7 \pm 4.9 ^{a,2}	23.3 \pm 3.9 ^{a,2}	10.0 \pm 2.8 ^b	23.0 \pm 0.5 ^{a,2}	19.3 \pm 4.9 ^a
20°C	1	7.3 \pm 3.3	8.0 \pm 1.9	7.1 \pm 1.9	8.7 \pm 3.3	6.3 \pm 0.4 ¹	7.3 \pm 2.8
	8	9.7 \pm 2.2	8.7 \pm 0.4	10.0 \pm 3.7	9.0 \pm 2.9	7.4 \pm 1.8 ¹²	9.3 \pm 1.6
	24	9.0 \pm 1.4	8.3 \pm 3.6	11.7 \pm 3.0	9.2 \pm 2.5	10.1 \pm 2.3 ²	11.4 \pm 3.2
4°C	1	8.2 \pm 1.8	10.3 \pm 4.1	6.4 \pm 3.2	8.2 \pm 1.6	6.1 \pm 1.4	7.7 \pm 2.9
	8	10.3 \pm 4.8	11.5 \pm 4.6	10.3 \pm 3.2	10.5 \pm 8.7	8.0 \pm 1.3	10.0 \pm 3.5
	24	8.9 \pm 2.7	10.5 \pm 1.2	9.7 \pm 0.8	9.2 \pm 1.5	7.4 \pm 1.2	9.7 \pm 2.8
-196°C	1	14.2 \pm 3.0 ¹	14.7 \pm 2.4 ¹	13.7 \pm 1.5 ¹	12.6 \pm 1.6 ¹	11.9 \pm 1.5 ¹	12.7 \pm 1.1 ¹
	8	15.3 \pm 4.8 ¹	13.9 \pm 4.7 ¹	15.3 \pm 2.0 ¹	17.5 \pm 4.9 ¹	15.7 \pm 2.2 ¹	14.3 \pm 3.9 ¹
	12	39.2 \pm 2.9 ^{a,2}	52.3 \pm 2.3 ^{b,2}	37.5 \pm 3.4 ^{a,2}	44.3 \pm 2.3 ^{a,2}	41.2 \pm 2.2 ^{a,2}	27.1 \pm 2.4 ^{c,2}

^{abc} Diferentes letras en la misma fila y categoría (37, 20, 4, -196°C) denota diferencias significativas ($p < 0.05$)

¹²³ Diferentes números (superíndice) dentro de la misma columna y categoría (37, 20, 4, -196°C) denota diferencias significativas ($p < 0.05$)

El porcentaje de morfoanomalías espermáticas (Tabla 4.2.5.) fue inferior al 10% en todos los machos (rango: 2-10%), sin observarse diferencias significativas a lo largo de todo el período experimental, ni entre temperaturas de conservación. Asimismo, los porcentajes de morfoanomalías de las muestras SI y PS fueron prácticamente similares.

Tabla 4.2.5. Porcentajes (media \pm SEM) de morfoanomalías a lo largo del período experimental para semen fresco (37, 20°C), refrigerado (4°C) y congelado-descongelado.

T ^a	Horas	Machos					
		1	2	3	4	5	Pool
37°C	1	2.5 \pm 2.1	3.0 \pm 2.2	2.9 \pm 2.2	2.9 \pm 1.5	2.0 \pm 1.4	3.1 \pm 1.2
	8	3.0 \pm 1.4	3.5 \pm 1.4	3.6 \pm 0.3	2.6 \pm 0.7	2.4 \pm 1.1	3.5 \pm 1.1
	24	2.9 \pm 1.7	4.0 \pm 2.1	2.9 \pm 0.7	3.7 \pm 2.8	3.8 \pm 1.7	3.0 \pm 1.0
20°C	1	1.8 \pm 0.4	1.8 \pm 1.2	3.7 \pm 0.9	2.8 \pm 0.7	3.0 \pm 0.9	2.2 \pm 0.9
	8	2.3 \pm 1.2	2.5 \pm 0.4	4.0 \pm 2.0	2.6 \pm 2.2	3.3 \pm 0.7	3.0 \pm 1.2
	24	1.9 \pm 2.1	2.1 \pm 2.0	3.9 \pm 0.8	2.7 \pm 1.8	3.2 \pm 2.1	3.3 \pm 1.6
4°C	1	2.8 \pm 0.8	2.4 \pm 0.5	3.9 \pm 2.3	3.3 \pm 0.8	3.3 \pm 0.8	2.9 \pm 1.1
	8	2.3 \pm 1.5	3.0 \pm 1.2	3.8 \pm 2.0	4.2 \pm 1.5	4.1 \pm 1.2	3.3 \pm 1.4
	24	2.8 \pm 0.4	2.4 \pm 0.9	3.0 \pm 0.8	3.9 \pm 0.8	3.7 \pm 0.4	2.4 \pm 1.7
-196°C	1	3.2 \pm 0.4	2.7 \pm 0.8	3.0 \pm 2.8	3.4 \pm 0.9	3.2 \pm 1.2	2.5 \pm 0.4
	8	2.0 \pm 0.7	2.6 \pm 1.2	3.9 \pm 0.7	2.8 \pm 1.1	3.1 \pm 0.9	2.8 \pm 1.0
	12	3.1 \pm 1.0	2.9 \pm 0.4	4.0 \pm 1.3	3.7 \pm 1.2	3.5 \pm 1.4	2.5 \pm 1.0

Finalmente, la Tabla 4.2.6 muestra la tasa de fertilidad tras la inseminación artificial con semen fresco y semen congelado-descongelado. La tasa de gestación y la fertilidad a término fueron muy similares en los grupos SIF y SPF (73.3% vs 76.7% y 70.0% vs 73.3% para SIF y SPF, respectivamente), sin mostrar diferencias en prolificidad y con un porcentaje similar de

partos múltiples (85.7%, 18/21 vs 90.0%, 20/22; SIF vs SPF respectivamente) Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en las tasas de fertilidad de cabras inseminadas con semen congelado-descongelado (SIC y SPC), presentando valores medios aproximadamente del 50%; además, la prolificidad fue muy parecida entre grupos experimentales, mostrando un valor muy cercano al obtenido con semen fresco.

Tabla 4.2.6. Tasa de gestación, fertilidad a término y prolificidad tras inseminación artificial con semen fresco y congelado-descongelado procesado de forma individual o en *pool*

	Semen fresco		Seme congelado-descongelado	
	SIF ¹	SPF ²	SIC ³	SPC ⁴
Fertilidad día 35 (%)	73.3 ^a (22/30)	76.7 ^a (23/30)	46.7 ^b (14/30)	53.3 ^b (16/30)
Fertilidad a término (%)	70.0 ^a (21/30)	73.3 ^a (22/30)	46.7 ^b (14/30)	50.0 ^b (15/30)
Prolificidad	1.90 (40/21)	1.95 (43/22)	1.85 (26/14)	1.87 (28/15)

¹ Cabras inseminadas con semen fresco individual (SIF)

² Cabras inseminadas con semen fresco en *pool* (SPF)

³ Cabras inseminadas con semen congelado-descongelado procesado individualmente (SIC)

⁴ Cabras inseminadas con *pool* de semen congelado-descongelado (SPC)

^{ab} Diferentes letras (superíndice) en la misma fila denotan diferencias significativas ($p < 0.05$)

4.2.4. DISCUSIÓN

Este estudio ha contrastado la viabilidad del semen caprino tras diferentes protocolos de procesado, mostrando que la conservación a 20 y 4°C no altera la calidad seminal durante las primeras 24 horas; sin embargo, la conservación del semen a 37°C causa un dramático descenso en la viabilidad seminal desde las 12 horas en adelante. Además, este estudio pretendía definir si al realizar un *pool* de semen de varios donantes, la calidad seminal y la consecuente fertilidad se veían modificadas; los resultados *in vivo* e *in vitro* revelaron que al mezclar semen, los parámetros seminales o las tasas de fertilidad no se ven modificados significativamente, comparado con los resultados obtenidos tras procesar el semen de manera individual.

Al analizar los resultados de motilidad espermática progresiva, no se encontraron diferencias significativas entre las muestras conservadas a 20 y a 4°C, manteniendo los valores medios superiores al 60%, en cuatro de los cinco machos, durante las primeras 24 horas. Nuestros resultados fueron superiores a los obtenidos por otros autores donde se utilizaron diluyentes a base de leche y sin la adición de yema de huevo (Paulenz y cols., 2005; Salvador y cols., 2005; Mara y cols., 2007); estos estudios registraron un ligero declive en la motilidad a medida que avanza el tiempo (24 horas), concluyendo que la aplicabilidad de este diluyente en condiciones de campo puede ser limitada (Paulenz y cols., 2005). Respecto a las muestras de semen preservadas a 37°C, presentaban una considerable reducción de la motilidad tras 12 horas de incubación, mostrando valores medios inferiores al 25% en todas las muestras. La baja longevidad observada en las muestras conservadas a 37°C parece ser consecuencia de un rápido agotamiento metabólico de los espermatozoides, disminuyendo de esta forma la motilidad espermática, a medida que se incrementa el tiempo de conservación (Leboeuf y cols., 2000). Finalmente, tras la congelación-descongelación, los valores medios obtenidos coinciden con los rangos observados por otros autores, donde la motilidad fue definida justo tras la descongelación y atemperamiento de las muestras (Cabrera y cols., 2005; Hidalgo y cols., 2007; Batista y cols., 2009); sin embargo, distintos autores han sugerido que la valoración de la motilidad progresiva tras la incubación del mismo (37°C) es un método más fiable para valorar la calidad seminal *in vitro* que la valoración justo tras la descongelación (Roth y cols., 1999; Dorado y cols., 2007). De esta manera, en el semen congelado-descongelado no se detectaron apenas modificaciones durante las dos primeras horas de incubación (37°C), pero a las 8 horas de incubación, la

motilidad progresiva disminuyó drásticamente en todas las muestras. Estos resultados parecen indicar que el semen parece permanecer viable solo durante 4-6 horas tras la descongelación, siendo éste el periodo límite para obtener tasas razonables de fertilidad.

El porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos permaneció prácticamente inalterado durante el período de incubación en las muestras conservadas a 20 y 4°C. Nuestros resultados son consistentes con aquellos obtenidos en diversos estudios en los que se conservó el semen a 4-5°C (Roca y cols., 1997) o a 20°C (Paulenz y cols., 2005) con diluyentes a base de yema de huevo; sin embargo, en aquellos estudios donde el medio de dilución era a base de leche, se confirmó que la proporción de acrosomas alterados aumentaban tras las primeras 24 horas de preservación (Salvador y cols., 2006). Con respecto al semen congelado y descongelado, observamos un aumento notable de las acrosomías tras las primeras 8 horas de incubación, con valores medios muy parecidos entre machos y en cada período. Estos resultados son comparables con aquellos obtenidos en diferentes razas caprinas, para muestras de semen congeladas-descongeladas y conservadas con diluyentes a base de leche (Dorado y cols., 2007; Hidalgo y cols., 2007) o a base de TRIS (Leboeuf y cols., 2000; Chang-Yong y cols., 2006; Batista y cols., 2009). Por otro lado, el porcentaje de morfoanomalías no experimentó variaciones a lo largo del período de incubación, y no se observaron diferencias entre los cuatro protocolos de conservación testados; estos resultados coinciden con diferentes estudios que muestran proporciones de morfoanomalías poco variables tras su conservación a 4-5°C (Roca y cols., 1997; Paulenz y cols., 2005) o tras la congelación (Singh y cols., 1995; Dorado y cols., 2007; Batista y cols., 2009). Por lo tanto, se puede asumir que el protocolo de preservación y el tiempo (horas) de incubación favorecen, en mayor medida, el desarrollo de alteraciones en la integridad estructural del acrosoma, más que el desarrollo de otras morfoanomalías espermáticas.

Con respecto a las experiencias *in vivo*, la tasa de fertilidad tras la inseminación artificial con semen fresco estuvo entorno al 70%, sin encontrar diferencias significativas entre los grupos SIF y SPF. Nuestros resultados son comparables con aquellos obtenidos por diferentes autores tras realizar inseminación artificial con semen conservado a 20°C (Paulenz y cols., 2005) y 5°C (Roca y cols., 1997) y ligeramente inferiores a los obtenidos tras inseminación artificial con semen fresco y diluido (Leboeuf y cols., 2000, 2003a). Con semen congelado-descongelado, los

índices de fertilidad observados en nuestro estudio (46.7 % y 50.0%, SIC y SPC, respectivamente) quedan entre los descritos para diferentes razas caprinas (Ritar y cols., 1990; Karatzas y cols., 1997; Salvador y cols., 2005; Dorado y cols., 2007; Batista y cols., 2009), si bien bastante alejados del 70% de tasa de nacimientos descrito por Leboeuf y cols. (2000, 2003b) tras realizar inseminación transcervical, con semen congelado-descongelado.

Otro propósito de nuestro estudio fue comparar la calidad seminal de muestras individuales y de muestras tras realizar un *pool*. Los resultados *in vitro* no mostraron variaciones en ninguno de los parámetros estudiados (motilidad espermática, morfoanomalías y acrosomías) independientemente del protocolo de conservación. Además, la tasa de gestación tras realizar inseminación artificial con semen fresco o congelado-descongelado no fue diferente entre muestras individuales y las muestras procedentes del *pool* de eyaculados. Diferentes estudios han demostrado que no existen diferencias significativas en los índices de fertilidad tras inseminación artificial con semen líquido conservado (Paulenz y cols., 2005) o semen congelado-descongelado, de diferentes machos cabríos (Salvador y cols., 2005). Por su parte, Gacitua y Arav (2005) obtuvieron una tasa de fertilidad similar tras realizar inseminación artificial con semen congelado-descongelado procedente de machos individuales o tras realizar un *pool* de sus eyaculados. Esta similar tasa de fertilidad que se obtiene, con independencia de su procedencia (muestras individuales o *pool*), puede explicarse por la selección que realizamos de las muestras seminales antes de llevar a cabo la inseminación, de tal forma que todas las hembras fueron inseminadas con al menos 120×10^6 espermatozoides móviles. A este respecto, Salvador y cols. (2005) propusieron que la influencia de los machos sobre el índice de prolificidad podría verse atenuada por el hecho de que el semen congelado-descongelado es evaluado antes de ser usado para inseminación y que solo las pajuelas con una calidad mínima fueron usadas para este fin.

En la especie porcina, al mezclar semen de diferentes verracos, se ha demostrado un incremento de diferentes parámetros reproductivos comparado con los obtenidos con el uso de dosis homoespermicas (Godet y cols., 1996; Haugan y cols., 2005). Además, se ha definido que verracos con calidades similares en su semen fresco, muestran diferencias tras su congelación y descongelación; en consecuencia, los verracos podrían ser considerados como “buenos congeladores” o “malos congeladores” (Holt y cols., 2005; Hernández y cols., 2007). En nuestro

estudio, tras congelar y descongelar las muestras, no se observaron diferencias entre muestras individuales y las heterospérmicas. La explicación de este hecho puede residir en que cuatro de los cinco machos utilizados podrían catalogarse como “buenos congeladores”, y tras realizar el *pool*, el semen heterospérmico no aumentase la calidad seminal de manera significativa. Por otro lado, en la especie porcina, cuando se lleva a cabo la inseminación artificial con semen procesado de manera individual y de alta calidad, no se observan diferencias significativas en las tasas de fertilidad comparado cuando se utiliza semen heterospérmico (Haugan y cols., 2007). Nuestros resultados no revelan diferencias en las tasas de fertilidad tras realizar inseminaciones con semen fresco procesado de manera individual o tras realizar un *pool*; de cualquier manera, haría falta seguir investigando este campo para poder confirmar los hallazgos obtenidos.

Los resultados de este estudio demuestran que el semen conservado en un medio a base de yema de huevo puede ser conservado a 20 y 4°C, sin mostrar diferencias relevantes en la calidad seminal durante las primeras 24 horas. Además, en nuestro laboratorio hemos realizado otra serie de experiencias (resultados no recogidos en el presente estudio) que han confirmado que las muestras de semen conservadas a 20 y 4°C mantienen valores prácticamente similares de motilidad progresiva (>50%), hasta las 96 horas de incubación. Por otro lado, en la presente experiencia no hemos constatado una mejoría de la calidad seminal tras procesar muestras heterospérmicas cuando lo comparamos con muestras de machos individuales, mostrando resultados similares en cada uno de los protocolos de conservación (37, 20, 4 y -196°C), en el periodo de preservación testado (24 horas). De cualquier manera, sería interesante confirmar si en periodos de incubación más prolongados, las muestras seminales (individuales o en forma de *pool*) podrían experimentar diferencias en su viabilidad, dependiendo del protocolo de conservación usado. Además, se hace necesario desarrollar estudios específicos con objeto de evaluar la calidad del semen conservado a 4 y 20°C, para luego ser sometido a incubación a 37°C durante diferentes periodos de tiempo. Del mismo modo, otra posible línea de investigación podría orientarse a evaluar la longevidad del semen congelado-descongelado, de tal forma que una vez el semen fuese descongelado, en lugar de ser preservado a 37°C (como se realiza de manera tradicional), fuese conservado a 20 y 4°C, con objeto de evaluar si de esta manera se podría incrementar el periodo de viabilidad espermática (longevidad) tras la descongelación.

EXPERIENCIA III

4.3. EXPERIENCIA III. VIABILIDAD ESPERMÁTICA EN MUESTRAS DE SEMEN CAPRINO CONSERVADAS EN UN CONTENEDOR DE TRANSPORTE (VAPORES DE NITRÓGENO LÍQUIDO)

4.3.1. INTRODUCCIÓN

El envío de semen congelado, a corta o larga distancia, se ha convertido en una práctica muy común con las nuevas técnicas de reproducción asistida (Hendricks y cols., 2010). Sin embargo, en los últimos años, el movimiento de criocontenedores con nitrógeno líquido se ha vuelto más complejo, debido a su catalogación como material peligroso, sujeto a una estricta regulación; en consecuencia, el transporte aéreo de muestras seminales precisa de nuevos protocolos (Bielanski, 2005a).

En la actualidad, los contenedores de transporte seco (vapores de nitrógeno líquido) son capaces de conservar, durante unos pocos días, una fase de vapor aproximadamente a -150°C en la cámara de almacenamiento, sin riesgo alguno a que se derrame nitrógeno líquido durante el transporte (Bielanski, 2005a; Hendricks y cols., 2010). Los contenedores de transporte se han utilizado para congelar pajuelas de semen de distintas especies animales, como bovino (Bielanski, 2005b), peces (Nascimento y cols., 2010) y animales salvajes (Roth y cols., 1999). Sin embargo, muy pocos estudios han demostrado la efectividad de estos contenedores para preservar las muestras seminales durante cortos períodos de tiempo (Carolsfeld y cols., 2003; Nascimento y cols., 2010), y no se ha desarrollado ninguna investigación para determinar si la calidad seminal sufre alguna modificación durante el tiempo de conservación en estos contenedores de transporte seco.

En macho cabrío, la refrigeración seminal permite el mantenimiento de niveles aceptables de calidad seminal durante 3-5 días (Salvador y cols., 2006; Batista y cols., 2011). Esta conservación a corto plazo es, normalmente, suficiente para llevar a cabo el transporte de muestras de semen desde los distintos laboratorios localizados a largas distancias, hasta su lugar final de utilización (Hendricks y cols., 2010). Sin embargo, en muchos casos, las muestras enviadas pueden sufrir retrasos o contratiempos que pueden significar una pérdida considerable de la calidad seminal. En distintas áreas geográficas, como es el caso de las Islas Canarias, el envío a larga distancia de semen congelado se convierte en una tarea muy complicada o incluso

imposible. Además, cada vez con mayor frecuencia, muchos clínicos realizan inseminación artificial con semen congelado procedente de laboratorios o centros de referencia, pero en la mayoría de las ocasiones, los clínicos carecen de contenedores de nitrógeno para conservar este semen indefinidamente.

El objetivo de este estudio pretende evaluar la eficacia de los contenedores de transporte para la conservación de semen caprino a corto plazo, estudiando la influencia del tiempo de conservación sobre la calidad seminal

4.3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.3.2.1. Animales

Seis machos cabríos de la raza Majorera, en perfecto estado de salud, con edades comprendidas entre 4 y 6 años, fueron usados como donantes de semen. El estudio fue llevado a cabo en la granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas (Islas Canarias, España, 28°N, 23°O). Los machos se encontraban emplazados (corral colectivo), alimentados y con un plan sanitario similar al que se ha descrito con anterioridad. Todo el trabajo experimental se llevó a cabo respetando las leyes españolas de bienestar animal y de experimentación con animales vivos. Antes del inicio del experimento, la realización de un examen ecográfico confirmó que tanto los testículos como las glándulas reproductivas, se encontraban sin ningún tipo de anomalías o alteración.

4.3.2.2. Recogida seminal

Hacia el final de la estación reproductiva (Diciembre), se recogió semen de cada macho, una vez a la semana, durante 3 semanas seguidas, mediante una vagina artificial. Inmediatamente después de su recogida y antes de hacer un *pool* con los distintos eyaculados, éstos fueron depositados en un baño María a 37°C y se recogieron alícuotas de cada uno para valorar la calidad seminal.

4.3.2.3. Evaluación y procesado seminal

Las muestras seminales fueron evaluadas para determinar el volumen eyaculado, la concentración espermática, así como los porcentajes de espermatozoides móviles, de acrosomías y de morfoanomalías. Las evaluaciones se realizaron de manera similar a lo descrito

en la parte general de material y métodos; brevemente, el volumen se determinó directamente en el tubo graduado de recogida, la concentración espermática se estimó mediante espectrofotometría (Spermacue®), la motilidad espermática (porcentaje total de espermatozoides móviles, espermatozoides con movilidad rápida) se analizó mediante un sistema automatizado de análisis espermático (CASA), mientras los porcentajes de espermatozoides con morfología anormal y con acrosoma intacto, se evaluaron mediante la técnica de tinción Spermac®, para un mínimo de 200 células espermáticas por muestra.

Tras el correspondiente análisis, se seleccionaron solo las muestras individuales que presentaban una concentración seminal $>2000 \times 10^6$ espermatozoides/ml, una motilidad espermática progresiva $>70\%$, un porcentaje de acrosomías $<20\%$, mientras el porcentaje de espermatozoides con morfología normal debía ser superior al 90% .

El procesado seminal se llevó a cabo de manera similar a lo descrito por Batista y cols. (2011). Los eyaculados fueron diluidos en solución de lavado a 37°C y centrifugados dos veces a $700 \times g$ durante 15 minutos (temperatura ambiente). En este momento, se retiraba el sobrenadante, y los sedimentos seminales eran mezclados y luego diluidos (1:3) en un diluyente a base de TRIS, glucosa y yema de huevo (Tabla 4). A continuación, se determinaba la concentración y el volumen se ajustaba (a temperatura ambiente) para obtener una concentración final de 800×10^6 espermatozoides/ml. Antes de comenzar con la refrigeración, se realizó una nueva dilución añadiendo, en tres fases separadas 10 minutos entre sí, el segundo diluyente (Tabla 4) o fracción glicerolada ($20-22^{\circ}\text{C}$) en un volumen similar al primer diluyente, obteniéndose una concentración final de 400×10^6 espermatozoides/ml. El semen fue envasado en pajuelas de 0.5 ml, para ser depositadas en un recipiente con agua ($20-25^{\circ}\text{C}$), siendo enfriadas en un refrigerador desde temperatura ambiente hasta los 5°C en un periodo de 2 horas y luego se mantuvieron a esta temperatura durante 3 horas más (período de equilibrado), antes de comenzar el proceso de congelación.

4.3.2.4. Congelación seminal, almacenamiento y descongelación

Tras el equilibrado, las pajuelas se situaron en una rampa de congelación, en el interior de una caja de poliestireno, quedando suspendidas a 4 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido, y permanecieron en vapores de nitrógeno líquido durante 15 minutos; finalmente, las pajuelas

fueron sumergidas y conservadas en nitrógeno líquido (NL). Un total de 180 pajuelas fueron conservadas en NL, que se obtuvieron tras tres protocolos diferentes de congelación.

Aproximadamente treinta días tras la congelación (Figura V), la mitad de las pajuelas fueron transferidas del contenedor de nitrógeno líquido (-196°C) a un contenedor de transporte de NL, totalmente cargado, pero sin líquido en su cámara de almacenamiento. El contenedor de transporte seco había sido previamente rellenado de NL, y una vez que la temperatura en la cámara de almacenamiento alcanzó la temperatura de -160°C, el NL residual fue retirado. Durante el periodo experimental, no se añadió más NL al contenedor de transporte. Las pajuelas fueron depositadas de forma vertical en la cámara de almacenamiento del contenedor, en tubos plásticos, quedando almacenados en vapores de nitrógeno (protocolo DS) durante 7 días. De igual manera, un grupo control de pajuelas se mantenía en nitrógeno líquido (protocolo NL) durante un período similar de almacenamiento.

La descongelación se llevó a cabo a los 1, 2, 3, 5 y 7 días tras transferir las pajuelas al contenedor de transporte seco. Las pajuelas almacenadas en el contenedor de transporte fueron extraídas directamente y se sumergieron inmediatamente en un baño de agua a 37°C durante 30 segundos, luego, el semen era vertido en 1 ml de PBS a 37°C; todas las muestras fueron conservadas a esta temperatura durante el resto del experimento. El protocolo de descongelación fue similar para las pajuelas conservadas en el contenedor de nitrógeno líquido. Tras la descongelación, dentro de cada protocolo, las pajuelas fueron mezcladas entre sí y luego se determinó el porcentaje total de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides con movimiento rápido, porcentaje de acrosomías y morfoanomalías. El número total de pajuelas evaluadas cada día y para cada protocolo de almacenamiento (LN, DS) fue de 18.

4.3.2.5. Características del contenedor de transporte seco

El contenedor de transporte seco era del modelo MVE SC2/v1 (capacidad de 1.5 litros de nitrógeno líquido, y capacidad para 88 pajuelas de 0.5 ml). Este recipiente presenta un absorbente hidrofóbico (silicona coloidal tratada) envuelta en una membrana, también de material absorbente hidropónico, retenido por un metal aislante. La membrana absorbe la totalidad del nitrógeno líquido, permitiendo que se mantenga una fase de vapor, de al menos -150°C, en la cámara de almacenamiento (Bielanski, 2005a). Antes de empezar el experimento,

la temperatura del interior del contenedor fue verificada en numerosas ocasiones. Una sonda (638 Pt, Crison Instruments, Barcelona) se colocó dentro de las pajuelas (llenas con semen y diluyentes de congelación), situadas en un cánister en el fondo del contenedor de transporte, y la temperatura fue registrada. La temperatura se controló una vez al día, todos los días durante una semana, confirmando que siempre oscilaba entre -150 y -160°C. El tiempo empleado en controlar la temperatura fue aproximadamente unos 2 minutos.

4.3.2.6. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como media \pm SEM (error estándar de la media). Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) usando el procedimiento de modelo lineal general del SSPS10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). El modelo lineal incluyó el efecto de almacenamiento seminal (dos protocolos) y el tiempo de almacenamiento (1, 2, 3, 5 y 7 días). Las variables expresadas en porcentajes (motilidad, morfoanomalías y acrosomías) fueron analizadas tras la transformación en arcosenos. Las diferencias entre medias fueron analizadas por el test de Duncan. Los valores fueron considerados estadísticamente diferentes cuando $p < 0.05$.

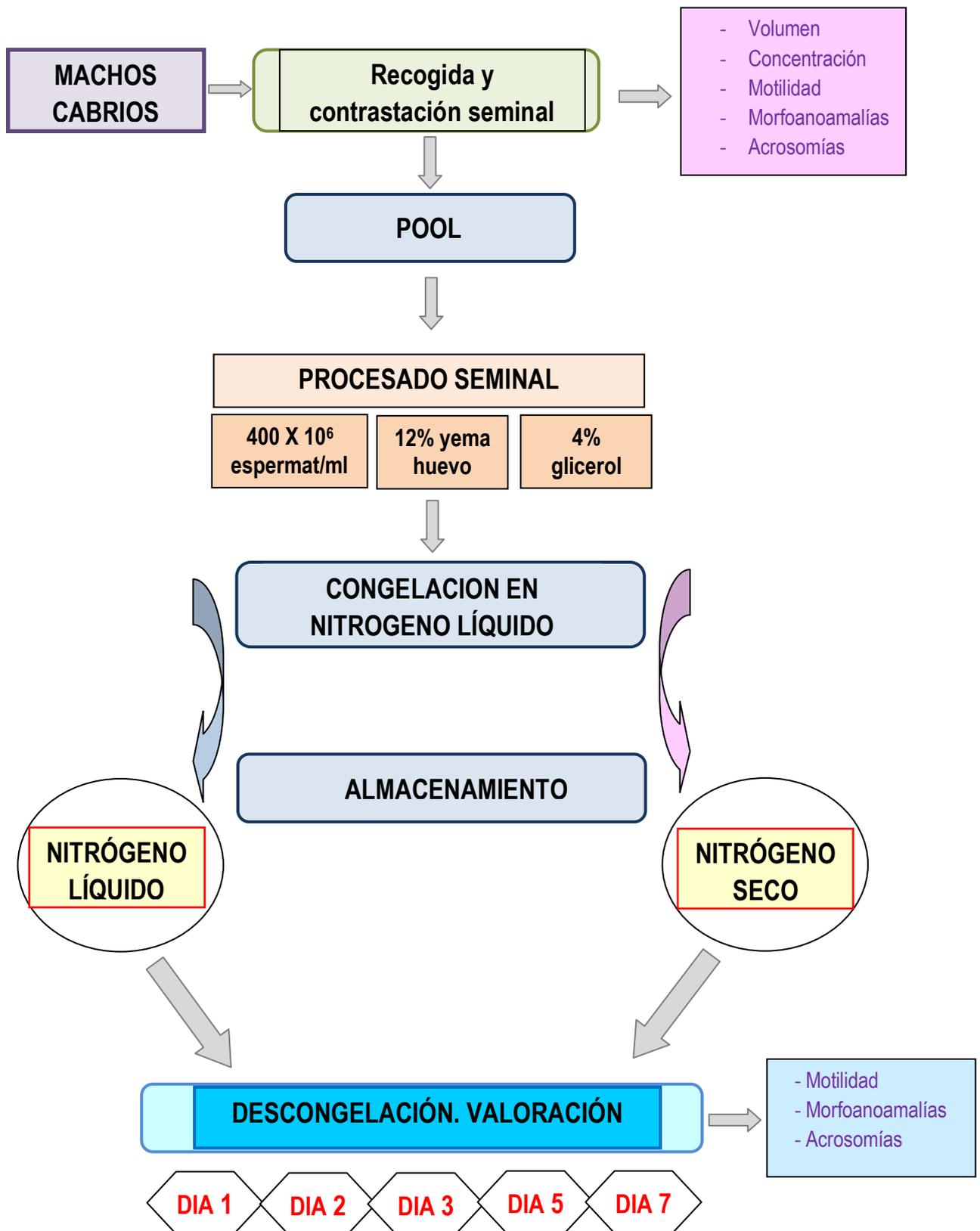


Figura V. Plan experimental de la experiencia 3

4.3.3. RESULTADOS

La Tabla 4.3.1. muestra las características seminales del semen fresco. La concentración espermática total fue prácticamente similar entre machos, mientras la motilidad espermática total y progresiva fue superior al 90 y 85%, respectivamente y no se observaron diferencias significativas entre los distintos machos. Finalmente, el porcentaje de espermatozoides con morfoanomalías fue inferior al 5% en todos los machos y el porcentaje de acrosomías se situó entre el 8 y el 13%, con un valor medio de acrosomas intactos cercano al 90%.

Tabla 4.3.1. Media \pm SEM de concentración espermática, porcentaje de espermatozoides móviles, motilidad progresiva, morfoanomalías y porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto en semen fresco de los machos donantes (n=6)

Concentración espermática ¹	Espermatozoides móviles (%)	Motilidad progresiva (%)	Morfoanomalías (%)	Acrosomas intactos (%)
42.5 \pm 2.5	90.4 \pm 2.5	86.0 \pm 3.0	3.0 \pm 0.7	88.9 \pm 5.4

¹: Concentración espermática expresada en $\times 10^8$ espermatozoides/ml

Las características de motilidad espermática en cada grupo experimental se muestran en la Tabla 4.3.2. Las dosis seminales conservadas en nitrógeno líquido (NL) no mostraron diferencias significativas en los porcentajes de espermatozoides móviles (rango valores medios: 60-70%) y motilidad progresiva (rango: 50-57%) durante el período experimental. Sin embargo, las dosis seminales conservadas en DS mostraron unos valores significativamente inferiores de movilidad espermática ($p < 0.01$) tras 5 y 7 días de conservación, llegando a alcanzar, tras 7 días de almacenamiento, valores medios inferiores al 20% y 13%, para motilidad total y motilidad progresiva respectivamente. Además, cuando ambos protocolos fueron comparados, no se encontraron diferencias significativas durante los 3 primeros días de conservación, pero sí se detectaron valores significativamente mayores ($p < 0.01$) de motilidad espermática para las muestras conservadas en NL comparado con los conservados en DS, tras 5 y 7 días de almacenamiento.

Tabla 4.3.2. Porcentajes (media \pm SEM) de espermatozoides móviles totales y motilidad progresiva (espermatozoides con movimiento rápido) en semen congelado-descongelado conservado en nitrógeno líquido y contenedor de transporte seco

Días de conservación	Espermatozoides móviles totales		Motilidad progresiva	
	NL	DS	NL	DS
1	70.1 \pm 4.5	66.7 \pm 2.9 ^a	57.4 \pm 2.9	55.4 \pm 3.2 ^a
2	62.4 \pm 1.8	62.2 \pm 3.6 ^a	51.6 \pm 3.0	49.9 \pm 3.7 ^a
3	64.7 \pm 3.0	58.9 \pm 3.8 ^a	55.4 \pm 2.9	50.0 \pm 2.3 ^a
5	60.1 \pm 1.5 ¹	44.2 \pm 1.7 ^{b,2}	52.0 \pm 2.1 ¹	32.1 \pm 1.9 ^{b,2}
7	62.3 \pm 4.8 ¹	19.1 \pm 4.3 ^{c,2}	50.2 \pm 3.1 ¹	12.3 \pm 4.6 ^{c,2}

NL: congelación en nitrógeno líquido; DS: congelación en nitrógeno líquido y conservación en contenedor de transporte.

^{abc} Diferentes letras en la misma columna denotan diferencias significativas ($p < 0.01$); ¹²: Diferentes números en la misma fila denota diferencias significativas ($p < 0.01$).

El porcentaje de morfoanomalías y de acrosomas intactos de las muestras seminales se muestran en la Tabla 4.3.3. El porcentaje de células anormales fue bajo en todas las muestras (rango: 0.0-10.0%) a lo largo del periodo experimental, tanto en las muestras conservadas en NL como en DS, y no se encontraron diferencias significativas cuando ambos protocolos fueron evaluados. El tipo de morfoanomalías más frecuente en ambos protocolos y en los diferentes periodos evaluados fue el que afectaba a la cola espermática.

Con respecto a la proporción de acrosomas dañados, se comprobó que la integridad acrosómica presentaba valores medios que se mantenían prácticamente inalterados en las muestras almacenadas en LN; un comportamiento similar se detectó durante los primeros tres días de almacenamiento en DS, sin embargo, tras 5 días de conservación en DS, el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos experimentaron un notable descenso ($p < 0.01$) comparado con el semen conservado durante los 3 primeros días. Finalmente, cuando se compararon ambos protocolos (NL vs DS), se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) tras 5 y 7 días de conservación, mostrando valores notablemente inferiores tras 7 días de conservación en DS.

Tabla 4.3.3. Porcentajes (media \pm SEM) de espermatozoides con morfoanomalías y de espermatozoides con acrosomas intactos en semen congelado y descongelado, conservado en nitrógeno líquido y contenedor de transporte seco.

Días de conservación	Morfoanomalías		Espermatozoides con acrosomas intactos	
	NL	DS	NL	DS
1	4.0 \pm 0.9	5.2 \pm 1.2	69.2 \pm 2.7	68.0 \pm 1.5 ^a
2	3.4 \pm 0.6	4.4 \pm 1.4	66.6 \pm 1.1	71.4 \pm 1.8 ^a
3	4.0 \pm 0.7	5.2 \pm 1.5	69.0 \pm 2.4	72.2 \pm 2.0 ^a
5	4.9 \pm 0.8	4.2 \pm 1.0	72.7 \pm 1.9 ¹	55.8 \pm 3.2 ^{b,2}
7	3.8 \pm 1.2	3.7 \pm 0.3	68.3 \pm 2.8 ¹	36.8 \pm 0.9 ^{c,2}

NL: congelación en nitrógeno líquido; DS: congelación en nitrógeno líquido y conservación en contenedor de transporte.

^{abc} Diferentes letras en la misma columna denotan diferencias significativas ($p < 0.01$); ¹²: Diferentes números en la misma fila denota diferencias significativas ($p < 0.01$).

4.3.4. DISCUSIÓN

En esta experiencia, la motilidad espermática y la integridad de la membrana acrosómica post-descongelación del semen congelado y conservado en nitrógeno líquido presentaron valores consistentes durante todo el periodo experimental, mostrando resultados similares a los observados en otras razas caprinas (Sirat y cols., 1996; Dorado y cols., 2007). Sin embargo, las muestras seminales conservadas en el contenedor de transporte (vapores de nitrógeno líquido) solo mantuvieron valores equivalentes de motilidad e integridad acrosómica durante los primeros tres días de conservación, para posteriormente manifestar un notable descenso en sus valores. El porcentaje de espermatozoides con morfoanomalías tras la descongelación no mostró diferencias significativas entre ambos protocolos durante el período evaluado, presentando valores medios comparables con los registrados en estudios previos desarrollados en la misma raza (Batista y cols., 2011).

En macho cabrío, la motilidad espermática del semen fresco solo permanece en niveles elevados durante unas pocas horas, a no ser que sea diluido para reducir la actividad metabólica y se descienda su temperatura (Leboeuf y cols., 2000). Distintos estudios confirman que la refrigeración del semen genera una disminución de la calidad seminal, que se traduce en un descenso de la motilidad y la integridad estructural, acompañado de un declive en la supervivencia dentro del tracto reproductor femenino (Leboeuf y cols., 2000; Salvador y cols., 2006). De esta forma, se ha contrastado que la motilidad espermática y la integridad del acrosoma en las muestras seminales caprinas (Tuli y Holtz, 1995) mantienen valores aceptables hasta los 3 días tras la conservación a 4-5°C; sin embargo, a partir de este momento, muestran una gran variabilidad, para terminar perdiendo por completo la capacidad fertilizante tras 6 días de conservación (Leboeuf y cols., 2000; Salvador y cols., 2006). En nuestro estudio, la viabilidad espermática se mantuvo en niveles similares durante los 3 primeros días de almacenamiento en DS, empezando a descender los valores a partir del quinto día; por su parte, la calidad de las muestras conservadas en nitrógeno líquido no manifestó ningún tipo de alteración a lo largo del periodo de estudio. Este diferente comportamiento registrado entre ambos protocolos, podría obedecer a que el semen de macho cabrío sea más sensible a una manipulación continuada cuando se conserva en DS que cuando es conservado en nitrógeno líquido. De esta forma, una excesiva manipulación de las pajuelas en el protocolo DS podría haber modificado la calidad

seminal aunque la temperatura en el interior de la cámara de almacenamiento del DS no registrase cambios sustanciales.

Hasta el momento, ningún estudio había evaluado la viabilidad espermática de las muestras conservadas en vapores de nitrógeno líquido en animales domésticos. El único estudio asimilable al nuestro (Carolsfeld y cols., 2003) se desarrolló utilizando semen de peces, evaluando la motilidad espermática de muestras conservadas en vapores de nitrógeno líquido; este estudio mostraba que la motilidad espermática registrada en dosis congeladas-descongeladas se situaba en un rango entre el 5 y el 85%, tras 7 días de conservación en el contenedor de transporte seco. Por otro lado, diferentes estudios desarrollados en las especies caprina y canina (Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2009) han propuesto un protocolo de criopreservación alternativo, mediante la utilización de ultracongeladores donde las muestras eran conservadas entre -140 y -150°C, temperaturas similares a las registradas en el contenedor de transporte. Nuestros resultados podrían ser comparables con los obtenidos con el uso de ultracongeladores de -152°C, donde la motilidad espermática y los porcentajes de morfoanomalías y acrosomías no mostraron cambios a lo largo del período de conservación. Por lo tanto, podría asumirse que la conservación del semen en un ambiente de vapores de nitrógeno líquido no modifica la viabilidad espermática durante, al menos, los 3 primeros días de almacenamiento.

Se encuentra generalmente asumido que la calidad seminal muestra una mayor viabilidad y longevidad cuando el semen es refrigerado comparado con semen congelado-descongelado (Leboeuf y cols., 2000). De cualquier manera, la viabilidad del semen refrigerado decrece a lo largo del tiempo, de tal manera que aproximadamente tras los 5 primeros días de almacenamiento a 5°C, las características del semen refrigerado podrían considerarse equivalentes a las obtenidas con semen congelado-descongelado. Por otro lado, es necesario tener en cuenta que el transporte de semen refrigerado puede verse afectado por diferentes factores tales como la necesidad de una infraestructura específica, el mantenimiento apropiado de la temperatura de refrigeración y evitar la contaminación de la muestra (Roth y cols., 1999). En este sentido, diferentes estudios han confirmado que los vapores de nitrógeno líquido previenen la transmisión bacteriana y vírica entre muestras seminales localizadas en el interior del contenedor de transporte (Bielanski, 2005a,b) y la temperatura en el interior del contenedor

de transporte se mantiene prácticamente inalterada durante un mínimo de 7 a 8 días. De esta forma, el transporte de semen mediante contenedores de transporte podría convertirse en una alternativa viable frente al uso del semen refrigerado, sobre todo cuando el transporte de las muestras podría prolongarse por encima de los 2-3 días.

En conclusión, bajo las circunstancias descritas en este estudio, la eficacia del contenedor de transporte (vapores de nitrógeno líquido) para conservar las pajuelas de semen caprino durante un corto período de tiempo (3 días con niveles aceptables) ha quedado completamente confirmada. No obstante, sería muy interesante realizar una nueva experiencia donde se reduzca la manipulación de las pajuelas almacenadas en el contenedor de transporte, para comprobar si la viabilidad de las muestras se prolonga por encima de los valores registrados en el presente estudio. Del mismo modo, se hace necesario desarrollar ensayos de fertilidad de las muestras conservadas durante varios días en el contenedor de transporte seco, y compararlos con la tasa de fertilidad que se obtendría tras inseminar con semen refrigerado durante diferentes días, así como con semen congelado-descongelado y almacenado en nitrógeno líquido.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Experimento 1: Utilización de los ultracongeladores de -152°C para la preservación del semen en la especie caprina (raza Majorera)

1. No se detectan diferencias entre ambas técnicas de congelación (nitrógeno líquido vs ultracongelador de -152°C), presentando resultados similares en la calidad espermática *in vitro* durante todo el período experimental.
2. El almacenamiento a largo plazo (1 año) de semen caprino no altera su calidad post-descongelación, con independencia del protocolo de criopreservación utilizado.
3. El efecto de la variabilidad individual (en machos de raza Majorera) sobre la calidad seminal post-descongelación, resulta más evidente en la motilidad espermática que sobre los porcentajes de espermatozoides anormales y de acrosomías.
4. Las muestras de semen caprino (raza Majorera) conservadas en ultracongeladores de -152°C permanecen fértiles hasta 6 meses tras la criopreservación.
5. El estado reproductivo de la cabra (múltipara vs nulípara) influye marcadamente sobre la fertilidad, con independencia del método de crioconservación empleado (nitrógeno líquido o ultracongelador de -152°C).
6. En base a los resultados *in vitro* de calidad seminal post-descongelación y los ensayos de fertilidad, los ultracongeladores de -152°C representan un procedimiento alternativo a la congelación en nitrógeno líquido, para la preservación de muestras seminales caprinas.

Experimento 2: Influencia de la temperatura de conservación y del pool seminal sobre la calidad espermática en los machos cabríos de raza Majorera

7. El semen caprino conservado a 37°C sufre un marcado detrimento a partir de las 12 horas, limitando su grado de aplicación a partir de ese momento.

8. La conservación de semen caprino a 20 y 4°C, en un diluyente a base de Tris-glucosa-yema no altera la calidad seminal durante las primeras 24 horas.
9. Tras la descongelación, el semen parece permanecer viable solo durante 4-6 horas, siendo éste el periodo límite para obtener tasas razonables de fertilidad.
10. El porcentaje de morfoanomalías es el parámetro espermático post-descongelación que menos modificaciones experimenta, con independencia del protocolo de preservación evaluado (37, 20, 4 y -196°C).
11. Cuando el semen se procesa en forma de *pool* en lugar de individualmente, no se registran modificaciones en la calidad seminal post-descongelación, mostrando resultados similares en el periodo de preservación testado (24 horas), para cada uno de los protocolos de conservación evaluados (37, 20, 4 y -196°C).
12. Con independencia del procesado seminal (de forma individual o en forma de *pool*), la tasa de fertilidad registrada tras inseminar con semen fresco o congelado-descongelado no manifiesta variaciones en la raza caprina Majorera.

Experiencia III: Viabilidad espermática en muestras de semen caprino conservadas en un contenedor de transporte (vapores de nitrógeno líquido)

13. La temperatura en el interior del contenedor de transporte (vapores de nitrógeno líquido) se mantiene prácticamente inalterable durante un mínimo de 7 días.
14. El semen caprino conservado en contenedores de transporte mantiene niveles aceptables de motilidad espermática, integridad acrosómica y espermatozoides normales durante, al menos, 3 días.
15. En las condiciones descritas en el estudio, la aplicabilidad del semen preservado en contenedores de transporte quedaría limitada a un breve periodo de tiempo (inferior a 5 días).

6. RESUMEN

6. RESUMEN

En la **primera experiencia**, el semen de cinco machos cabríos de la raza Majorera se recogió mediante vagina artificial y se sometió a un proceso de dilución, hasta alcanzar una concentración final de 200×10^6 espermatozoides/dosis, en un diluyente con un 4% de glicerol y un 12% de yema de huevo. Una vez finalizado el periodo de equilibrado, las pajuelas (0.5 ml) fueron sometidas a dos procedimientos diferentes de congelación: (NL) las pajuelas fueron congeladas y conservadas en nitrógeno líquido; (ULF) las pajuelas fueron congeladas y conservadas en ultracongelador de -152°C . Finalmente, las pajuelas se descongelaron, y se determinó la calidad seminal (motilidad espermática, porcentaje de espermatozoides con integridad acrosómica y porcentaje de morfoanomalías) para diferentes tiempos de conservación (1, 30, 90 y 365 días de crio-conservación).

Por otro lado, en una segunda fase de la primera experiencia, 150 cabras de la raza Majorera fueron asignadas a cuatro grupos experimentales: para los grupos NL-1 (n=40) y NL-6 (n=35), las cabras fueron inseminadas de forma transcervical con semen congelado-descongelado que había permanecido conservado en nitrógeno líquido durante 1 y 6 meses, respectivamente; en los grupos ULF-1 (n=40) y ULF-6 (n=35), las cabras fueron inseminadas de forma transcervical con semen congelado-descongelado que había permanecido almacenado en ultracongeladores de -152°C durante 1 y 6 meses, respectivamente. Mediante ultrasonografía trasabdominal se determinó la tasa de gestación, mientras que la fertilidad a término y la prolificidad fueron registrados en el momento del parto.

Los resultados *in vitro* demostraron que el protocolo de congelación no influye sobre la calidad espermática, con valores similares hasta un año tras la congelación; asimismo, no se observó influencia del tiempo de conservación sobre la calidad seminal. En cuanto a la tasa de nacimientos, no se detectaron diferencias significativas entre grupos experimentales (43.6%, 38.5%, 42.8% y 40.0% para los grupos NL-1, ULF-1, NL-6 y ULF-6 respectivamente). Por otro lado, en todos los grupos experimentales, la fertilidad a término y la prolificidad fueron significativamente mayores ($p < 0.01$) en cabras multíparas que en cabras nulíparas. Por lo tanto, los resultados *in vitro* y los parámetros de fertilidad confirmaron la eficacia de la técnica ULF para la congelación y almacenamiento de semen caprino.

En la **segunda experiencia**, se pretendía evaluar el efecto de distintas temperaturas de conservación del semen y la influencia de mezclar semen de varios machos sobre la viabilidad espermática. En una primera fase del experimento, las muestras seminales (n=30) de cinco machos cabríos de la raza Majorera fueron procesadas de forma individual (SI) y tras la primera dilución (a base de TRIS y yema de huevo), se extrajo una alícuota de cada muestra para hacer un *pool* (PS). Tras esto, las muestras (SI y PS) fueron preservadas como semen fresco (37 y 20°C), refrigerado (4°C) y congelado (dilución final: 400 x 10⁶ espermatozoides/ml, 12% yema de huevo, 4% glicerol). Se definieron los parámetros de motilidad espermática, porcentaje de morfoanomalías y de acrosomas intactos, a lo largo de 24 horas de preservación. La preservación seminal a 20 y 4°C no modificaba la calidad espermática durante las 24 primeras horas, pero la conservación a 37°C provocó un evidente descenso en la motilidad espermática a partir de las 12 horas; asimismo, la longevidad del semen congelado-descongelado se limitó a 4-6 horas. Finalmente, no se observaron diferencias en los parámetros seminales cuando el PS se comparó con el semen individual en ninguno de los protocolos estudiados.

En la segunda fase del experimento, 120 cabras de la raza Majorera se asignaron en cuatro grupos experimentales: (1) grupo SIF (n=30), las hembras fueron inseminadas con semen fresco, procesado de manera individual; (2) grupo SIC (n=30), las hembras fueron inseminadas con semen congelado-descongelado, procesado de manera individual; (3) grupo SPF (n=30), las hembras fueron inseminadas con semen fresco, procesado en forma de *pool*; (4) grupo SPC (n=30), las hembras fueron inseminadas con semen congelado-descongelado, procesado en forma de *pool*. Las inseminaciones se realizaron de manera transcervical y las hembras fueron inseminadas con un mínimo de 120 x 10⁶ espermatozoides móviles. El índice de nacimientos fue muy similar entre los grupos SIF y SPF (70.0% y 73.7% respectivamente), y no se observaron diferencias significativas de fertilidad entre los grupos SIC y SPC (46.7% y 50.0%, respectivamente); asimismo, la prolificidad mostró valores muy uniformes entre los cuatro protocolos evaluados (1.90, 1.95, 1.85 y 1.87; grupos SIF, SPF, SIC y SPC, respectivamente).

Los resultados de este estudio confirmaron que las muestras seminales pueden ser conservadas satisfactoriamente durante 24 horas a 20 y 4°C. Además, al mezclar el semen de diferentes machos, los parámetros seminales no se ven modificados significativamente en comparación con las muestras de machos individuales, ni parece tener reflejo sobre la fertilidad.

En la **tercera experiencia**, se valoró la eficacia de un contenedor de transporte (vapores de nitrógeno líquido) para la conservación de semen caprino. Se recogió semen de 6 machos cabríos de la raza Majorera, y una vez procesado (dilución final: 400×10^6 espermatozoides/ml, 12% yema de huevo, 4% glicerol), el semen fue equilibrado (4°C) y las pajuelas se congelaron y conservaron en nitrógeno líquido (NL). Treinta días tras la congelación, la mitad de las pajuelas fueron transferidas, desde el NL al contenedor de transporte seco (DS). Posteriormente, se llevó a cabo la descongelación, los días 1, 2, 3, 5 y 7 días tras transferir las pajuelas al DS, determinando el porcentaje de espermatozoides móviles, espermatozoides con acrosoma intacto y morfoanomalías.

En ambos protocolos (NL y DS), las muestras de semen mostraron niveles equivalentes de motilidad progresiva (entre el 50 y el 60%) y en el porcentaje de acrosomas intactos (alrededor del 70%), durante los primeros 3 días de almacenamiento. Sin embargo, a partir del día 5 de almacenamiento, se observó un notable descenso de la calidad seminal en las pajuelas conservadas en DS, mostrando un notable descenso de la viabilidad seminal tras 7 días de conservación (12.3% y 36.8%, motilidad progresiva e integridad acrosómica, respectivamente). Por lo tanto, en las condiciones descritas en este estudio, la calidad seminal del semen caprino conservado en un contenedor de transporte (vapores de nitrógeno líquido), solo se mantiene en niveles aceptables durante los 3 primeros días de conservación; en consecuencia, sus aplicaciones prácticas podrían verse más limitadas.

7. ABSTRACT

7. ABSTRACT

In the **first experiment**, the semen of five Majorera bucks was collected and processed to reach a final concentration of 200×10^6 spermatozoa/straw, with the extender containing 4% of glycerol and 12% of egg yolk. Two freezing techniques were assessed: (LN) straws were frozen and stored in liquid nitrogen and (ULF) straws were frozen and stored in the ultra-low freezer at -152°C . Semen quality (sperm motility, acrosome integrity and abnormal sperm cells percentages) was determined for different storage times (1, 30, 90 and 365 days of cryopreservation).

Thereafter, 150 Majorera goats were assigned to four experimental groups: for groups LN-1 (n=40) and LN-6 (n=35), the goats were transcervically inseminated with frozen-thawed semen stored for 1 and 6 months in liquid nitrogen, respectively, while for groups ULF-1 (n=40) and ULF-6 (n=35), the goats were transcervically inseminated with frozen-thawed semen stored for 1 and 6 months in a ultra-low freezer at -152°C , respectively. The pregnancy rate was determined by transabdominal ultrasound scanning; in addition, the kidding rate and prolificacy were recorded at parturition.

In vitro results showed that the freezing protocol is not affect sperm quality with similar values for up to 1 year of cryopreservation. The kidding rates were not significantly different between experimental groups (43.6%, 38.5%, 42.8% and 40.0% for groups LN-1, ULF-1, LN-6 and ULF-6, respectively). In all experimental groups, the kidding rate and prolificacy were significantly higher ($p < 0.01$) in multiparous than in nulliparous goats. Therefore, the *in vitro* results and fertility trials confirmed the efficiency of the ULF technique for storage of goat semen.

The **second experiment** assessed the effect of different semen storage temperatures and the influence of semen pooling in semen viability. In the first phase, semen samples (n=30) of five Majorera bucks were individually processed (IS) and after the first dilution (Tris-yolk extender), semen-diluted aliquots from each male were pooled (PS). Thereafter, semen samples (IS and PS) were preserved as fresh semen (37 and 20°C), chilled semen (4°C) and frozen semen. Sperm motility and the percentage of abnormal sperm cells and intact membrane acrosomes were defined. Semen preservation at 20°C and 4°C did not modify the quality of

spermatozoa for the first 24 hours, but the conservation at 37°C caused a dramatic fall in the semen motility from 12 h onwards. Furthermore, the longevity of frozen-thawed semen was limited to 4-6 h. No differences were observed in semen parameters when pooled semen was compared with semen from individual males in any of the preservation protocols assessed.

On the other hand, 120 goats were distributed in four experimental groups: in group FIS (fresh individual semen, n=30) and group FTIS (frozen-thawed individual semen, n=30), does were transcervically inseminated with fresh semen and frozen-thawed semen from each individual male, respectively, and in group FPS (fresh pooled semen, n=30) and group FTPS (frozen-thawed pooled semen, n= 30), goats were transcervically inseminated with fresh pooled semen and frozen-thawed pooled semen, respectively. The kidding rate was very close in the FIS and FPS groups (70.0% and 73.7%, respectively) and no significant differences were observed in the fertility rate between FTIS and FTPS. The results of this study confirmed that semen samples may be preserved satisfactorily for 24 h both at 20 and 4°C. In addition, the mixture of semen of different bucks did not significantly modify the semen parameters when compared with semen from individual males.

Finally, the **third experiment** assessed the efficacy of a dry shipper to preserve caprine semen samples. Semen was collected from six Majorera bucks, and after processing (final concentration of 200×10^6 spermatozoa/straw, 4% of glycerol, 12% of egg yolk), the semen was equilibrated and then semen straws were frozen and stored in liquid nitrogen (LN). Thirty days after freezing, half of the frozen straws were transferred from LN to a dry shipper (DS). Then, thawing was performed at 1, 2, 3, 5 and 7 days and the percentages of motile spermatozoa, acrosome intact spermatozoa and abnormal spermatozoa were determined.

Buck semen samples showed equivalent levels of progressive motility (between 50 and 60%) and intact acrosome membrane (around 70%) during the first three days of storage in both procedures; however, from the fifth day of storage onwards, a notable decrease in semen quality was observed in the samples preserved in DS, showing a dramatic fall in the semen viability after 7 days of preservation (12.3% and 36.8%, progressive fast spermatozoa and acrosome integrity, respectively). However, under the circumstances reported in this study, the sperm quality of buck samples preserved in the in dry shipper only held during the first three days of storage, and therefore, its practical application could be more limited.

8. BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. **Abecia JA, Forcada MF (2001):** Nutrición y Reproducción. En la Alimentación del Ganado Ovino (1). *Monografías de Actualidad, Ovis* 76: 13-14.
2. **Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A (2011):** Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Vet Clin N Am-Food A* 27: 67-79.
3. **Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A (2012):** Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 130: 173-179.
4. **Ahmad N, Noakes DE (1995):** A clinical and ultrasonographic study of the testes and related structures of goats and rams after unilateral vasectomy. *Vet Rec* 137: 112-117.
5. **Álamo D, Batista M, González F, Rodríguez N, Cruz G, Cabrera F, Gracia A (2005):** Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology* 63: 72-82.
6. **Alberts B, Jonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002):** Molecular biology of the cell. 4^a Ed. Garland Science, Nueva York, pp.105-135.
7. **Ali BH, Mustafa AI (1986):** Semen characteristics of Nubian goats in the Sudan. *Anim Reprod Sci* 12: 63-68.
8. **Althouse GC, Kuster CE, Clark SG, Weisiger RM (2000):** Field investigation of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology* 53: 1167-1176.
9. **Amir D, Pines M, Gacitua H, Ron M (1986):** The seasonal pattern of testosterone secretion in fin cross rams in Israel. *Anim Reprod Sci* 10: 245-250.
10. **Andersen K, Aamdal J, Fougner JA (1973):** Intrauterine and deep cervical insemination with frozen semen in sheep. *Zuchthygiene* 8: 113-118.
11. **Anel E, Alvarez M, Kaabi M, Boixo JC, Paz P, Anel L (1998):** Influencia de la adición de algunos antibióticos en las características del semen descongelado de morueco. *Producción ovina y caprina* XXIII: 513-515.
12. **Arav A, Zeron Y, Shturman H, Gacitua H (2002):** Successful pregnancies in cows following double freezing of large volumen of semen. *Reprod Nutr Dev* 42: 583-586.
13. **Asdell SA (1964):** Patterns of Mammalian Reproduction (2^a ed.). Cornell University Press, San Diego, pp. 211-213
14. **Azawi OI, Dahash SY, Juma FT (1993):** Effect of different diluents on Shami goat semen. *Small Ruminant Res* 9: 347-352.
15. **Bag S, Joshi A, Naqvi SM, Mittal JP (2004):** Effect of post-thawing incubation on sperm kinematics and acrosomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-size French straws. *Theriogenology* 62: 415-424.
16. **Baird DT, Scaramuzzi RJ (1976):** Changes in the secretion of ovarian steroids and pituitary luteinizing hormone in the peri-ovulatory period in the ewe: the effect of progesterone. *J Endocrinol* 70: 237-245.
17. **Barbas J, Mascarenhas R (2009):** Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 10: 49-62.

18. **Baril G, Leboeuf B, Saumande J (1993):** Synchronization of estrus in goats: the relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology* 40: 621–628.
19. **Barrios B, Péres-Pe R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA (2000):** Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod* 63: 1531-1537.
20. **Barth AD, Oko RJ (1989):** Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Ed. Ames. IA, Iowa State Univ. Press.
21. **Bartlewski PM, Aravindakshan J, Beard AP, Nelson ML, Batista-Arteaga M, Cook SJ, Rawlings NC (2004):** Effects of medroxyprogesterone acetate (MAP) on ovarian antral follicle development, gonadotrophin secretion and response to ovulation induction with gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in seasonally anoestrus ewes. *Anim Reprod Sci* 80: 63-75.
22. **Batista M, Cabrera F, González F, Lorenzo M, Fresno MR, Calero P, Gracia A (1999):** Características reproductivas de la Agrupación Caprina Canaria. *Ovis* 62: 23-33.
23. **Batista M, Calero P, Rodríguez F, González F, Cabrera F, Gracia A (2002):** Structural changes in the testes and epididymides of bucks 16 weeks after bilateral vasectomy. *Vet Rec* 151 740-741.
24. **Batista M, Álamo D, González F, Cruz M, Gracia A (2006):** Influence of the freezing technique (nitrogen liquid vs ultrafreezer of -152°C) and male-to-male variation over the semen quality in Canarian Mastiff breed dogs. *Reprod Domest Anim* 41: 423–428.
25. **Batista M, Niño T, Álamo D, Castro N, Santana M, González F, Cabrera F, Gracia A (2009):** Successful artificial insemination using semen frozen and stored by an ultrafreezer in the Majorera goat breed. *Theriogenology* 7: 1307–1315.
26. **Batista M, Niño T, Santana M, Álamo D, Castro N, Reyes R, González F, Cabrera F, Gracia A (2011):** Influence of the preservation temperature (37°C, 20°C, 4°C, -196°C) and the mixing of semen over sperm quality of Majorera bucks. *Reprod Domest Anim* 46: 281–288.
27. **Batista M, Santana M, Niño T, Álamo D, Cabrera F, González F, Gracia A (2012):** Sperm viability of canine and caprine semen samples preserved in a dry shipper. *Anim Reprod Sci* 130: 105-110.
28. **Bazer FW, Spencer TE, Ott TL (1996):** Placenta interferons. *Am J Reprod Immunol* 35: 297-308.
29. **Berkley PM (1982):** Pregnancy testing of goat using ultrasonic. Cit.: Hesselink JW, Taverne MAM (2001) Ultrasonography of the uterus of the goat. *Vet Quart* 2: 10-23.
30. **Bernard A (1994):** Pregnancy diagnosis in goats. *Kleinviehzuchter* 42: 1135-1138.
31. **Bielanski A (2005a):** Experimental microbial contamination and disinfection of dry (vapour) shipper dewars designed for short-term storage and transportation of cryopreserved germplasm and other biological specimens. *Theriogenology* 63: 1946–1957.
32. **Bielanski A (2005b):** Non-transmission of bacterial and viral microbes to embryos and semen stored in the vapour phase of liquid nitrogen in dry shippers. *Criobiology* 50: 206–210.
33. **BonDurant RH, Alwan S, Boland MP (1986):** Detection of haemagglutinating antibodies to a soluble HAP gonadotrophin in superovulated heifers. *Vet Rec* 119: 157-158.
34. **Bono G, Cairolì F, Tamanini C, Abrate L (1983):** Progesterone, estrogen, LH, FSH and prolactin concentrations in plasma during the estrous cycle in goat. *Reprod Nutr Dev* 23: 217-222.

35. **Borgohain AC, Rajkonwar CK, Deka BC (1983):** Sperm abnormalities in buck. *Ind J Anim Sci* 53: 909-911.
36. **Bretzlaff KN (1993):** Development of hydrometra in a ewe flock after ultrasonography for determination of pregnancy. *J Am Vet Med Assoc* 203: 122-125.
37. **Bretzlaff KN, Weston PG, Hixon JE, Ott RS (1988):** Plasma luteinizing hormone and progesterone concentrations in goats with oestrous cycles of normal or short duration after prostaglandin F_{2α} administration during diestrus or pregnancy. *Am J Vet Res* 49: 939-943.
38. **Bretzlaff KN, Romano E (2001):** Advance reproductive techniques in goats. *Vet Clin N Am-Food A* 17: 421-434.
39. **Byrne GP, Lonergan P, Wade M, Duffy P, Donovan A, Hanrahan JP, Boland MP (2000):** Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim Reprod Sci* 62: 265-275.
40. **Buttle HL, Morant SV (1986):** The pattern of luteinizing hormone secretion during pregnancy in goats. *Anim Reprod Sci* 11: 129-137
41. **Cabrera F, González F, Batista M, Calero P, Medrano A, Gracia A (2005):** The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of Canary buck (*Capra hircus*). *Reprod Domest Anim*, 40: 191–195.
42. **Camp JC, Wildt DE, Horward PK, Stuart LD, Chakraborty PK (1983):** Ovarian activity during normal and abnormal length estrous cycles in the goat. *Biol Reprod* 28: 673-681.
43. **Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni E, Harvey BJ (2003):** Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J Fish Biol* 63: 472–489.
44. **Castro N, Capote J, Martin D, Argüello A (2006):** The influence of dietary conjugated linoleic acid on blood serum and calostrum immunoglobulin G concentration in female goats before and after parturition. *J Anim Physiol An N* 90:429-431.
45. **Cerbito WA, Natural NG, Aglibut FB, Sato K (1995):** Evidence of ovulation in goats (*capra hircus*) with short estrous cycle and its occurrence in the tropics. *Theriogenology* 43: 803-812.
46. **Chang-Yong C, Jung-Gon K, Sang-Rae C, Dong-Soo S, Young- Keun K, Balasubramanian S (2006):** Influence of seasons, extenders, slow and rapid freezing on seminal characters in Korean native bucks. *Reprod Domest Anim* 41: 55–60.
47. **Chaplin VM, Holdsworth RJ (1982):** Oestrone sulphate in goat's milk. *Vet Rec* 111: 224.
48. **Chauhan MS, Anand SR (1990):** Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Theriogenology* 34: 1003-1013.
49. **Chemineau P (1983):** Effect on oestrus and ovulation of exposing Creole goats to the male at three times of the year. *J Reprod Fertil* 67: 65-72.
50. **Chemineau P (1985):** Effects of progestagen of buck-induced short ovarian cycles in the Creole meat goat. *Anim Reprod Sci* 9: 87-94.
51. **Chemineau P (1986):** Sexual behavior and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. I. Female estrus behaviour and ovarian activity. *Reprod Nutr Dev* 26: 441-452.
52. **Chemineau P (1987):** Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrus cycles in anovulatory goats, a review. *Livest Prod Sci* 17: 135-147.

53. Chemineau P, Malpoux B, Pelletier J, Leboeuf B, Delgadillo JA, Deletang F, Pobel T, Brice G (1996): Use of melatonin implants and photoperiodic treatments to control seasonal reproduction in sheep and goats. *Prod Anim* 9: 45-60.
54. Chene N, Martal J, Charrier J (1988): Ovine chorionic somatomammotropin and foetal growth. *Reprod Nutr Dev* 28: 1707-1730.
55. Chentout M, El Amiri B, Sulon J, Beckers JF, Kirschvink N, Boulanouar B, Bister JL (2008): Pregnancy-associated glycoproteins secretion in North Moroccan goats. *Reprod Domest Anim* 43: 696-700.
56. Constantinescu GM (2001): Guide to Regional Ruminant Anatomy base on the dissection of the goat, Ed. Ames. IA, Iowa State Univ. Press, pp. 186-216.
57. Corteel JM (1975): Effect du 'lavage' sur la conservation des spermatozoids de bouc a base temperatura. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 15: 525-528.
58. Corteel JM (1976): Variations de la motilité et de la fécondance des spermatozoids de bouc. *Ann Zootech* 25: 567-571.
59. Corteel JM (1980): Effects of seminal plasma on the survival and fertility of spermatozoa kept *in vitro*. *Reprod Nutr Dev* 20: 1111-1123.
60. Corteel JM (1981): Collection, processing and artificial insemination of goat semen. In: Goat production, C Gall (Ed), Academic Press, Londres, pp. 171-191.
61. Corteel JM, González C, Nunes JF (1982): Research and development in the control of reproduction. *Proc III Int Conf Proc*, pp. 584-601.
62. Corteel JM, Leboeuf B, Baril G (1988): Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Ruminant Res* 1:19-33.
63. Cseh S, Faigl V, Amiridis GS (2012): Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Anim Reprod Sci* 130: 187-192.
64. Currie WB, Gorewit RC, Michel FJ (1988): Endocrine changes, with special emphasis on oestradiol-17 β , prolactin and oxytocin, before and during labour and delivery in goats. *J Reprod Fertil* 82: 299-308.
65. Currie WB, Card CE, Michel FJ, Ignatz G (1990): Purification partial caracterizacion, and development of a specific radioimmunoassay for goat placental lactogen. *J Reprod Fertil* 90: 25-36.
66. Dadoune JP (1993): Morphogenesis, organization and anomalies of the nucleus in human spermatozoa. *Pathol Biol* 41: 220-221.
67. Daudu CS (1984): Spermatozoa output, testicular sperm reserve and epididymal storage capacity of the Red Sokoto goats indigenous to northern Nigeria. *Theriogenology* 21: 317-324.
68. Dautier L (1966): Artificial insemination in the goat. En: Encyclopedia of Veterinary Medicine. Dalling (Editor). W. Green and Soon, Los Angeles, pp. 269-271.
69. Deka BC, Rao AR (1986): Effect of glycerol level in Tris-based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. *Theriogenology* 26: 231-240.
70. Delgadillo JA (2005): Anatomía y fisiología del tracto genital. En: Inseminación Artificial en Caprino. Ed. Trillas, 1ª Ed. Mexico DF, pp.15-20.

71. **Delgadillo JA, Leboeuf B, Chemineau P (1991):** Decrease in the seasonality of sexual behaviour and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology* 36: 755-770.
72. **Delgadillo JA, Leboeuf B, Chemineau P (1993):** Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles. *Reprod Nutr Dev* 33: 609-617.
73. **Denamur R (1974):** Luteotrophic factors in the sheep. *J Reprod Fert* 38: 251-259.
74. **Dhindsa DS, Metcalfe J, Resko JA (1981):** Oestrogen concentrations in systemic plasma of pregnant pygmy goats. *J Reprod Fert* 62: 99-103.
75. **Dorado J, Rodríguez I, Hidalgo M (2007):** Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two freezing extenders base on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology* 68: 168–177.
76. **Dorado J, Hidalgo M, Muñoz A, Rodríguez I (2009):** Assessment of goat freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Anim Reprod Sci* 112: 150–157.
77. **Dorado J, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M (2010):** The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Anim Reprod Sci* 121: 115-123.
78. **Dorn CG, Wolfe BA, Bessoudo T, Kraemer DC (1989):** Follicular detection in goats by ultrasonography. *Theriogenology* 31: 185.
79. **Drevious LO, Eriksson H (1966):** Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp Cell Res* 42: 136-156.
80. **Dunner S, Vazquez I (1991):** Effects de milieux de conservation a base de substances amino-organiques sur la qualite de la semence de bouc mesuree in vitro apres conservation a +15°C ou +5°C. *Arch Zootec* 40: 391-401.
81. **El-Alamy MA, Foote RH (2001):** Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Anim Reprod Sci* 63: 245-254.
82. **Eppleston J, SÁlamon S, Moore N, Evans G (1994):** The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Anim Reprod Sci* 36:211–25.
83. **Evans GE, Maxwell WMC (1987):** SÁlamon's Artificial insemination of Sheep and Goats. Ed. Butterworths. Sydney.
84. **Feliciano-Silva AED, Nunes JF, Riera GS (1992):** Características espermáticas relacionadas con la morfología escrotal en caprinos de la raza Moxoto en el Noreste del Brasil. *Terra Árida* 11: 121-126.
85. **Fiser PS, Fairfull RW (1984):** The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology* 21: 542-551.
86. **Fiser PS, Fairfull RW (1986):** Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity, and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa. *Theriogenology* 25: 473-484.
87. **Folch J, Roca M (1979):** Caracteres sexuales de los moruecos de la raza Ile de Frances y Fleischaff y su empleo en el cruce industrial. *ITEA* 37: 51-61.
88. **Forsyth IA (1986):** Variation among species in the endocrine control of mammary growth and function: the roles of prolactin, growth hormone, and placental lactogen. *J Dairy Sci* 69: 886-903.

89. **Fougner JA (1979):** Die intrauterine besamung der ziege mit tiefgefrorenem sperma. *Zuchthygiene* 14:104–10.
90. **Fournier-Delpech S, Colas G, Courot M (1979):** Epididymal sperm maturation in the ram: Motility, fertilizing ability and embryonic survival after uterine artificial insemination in ewe. *Annal Biol Anim Bioch Biophys* 19: 597-605.
91. **Fraser LR, Adeoya-Osiguwa SA (2001):** Fertilization promoting peptide-A posible regulation of sperm function in vivo. *Vitam Horm* 63: 1-28.
92. **Fredriksson G, Kindahl H, Edqvist LE (1984):** 11-ketotetranor PGF metabolites, a suitable indicator of measuring PG release during the normal oestrus cycle and early pregnancy in the goat. *Anim Reprod Sci* 23: 573-595.
93. **Freeman LC, Currie WB (1985):** Variation in the oxytocin content of caprine corpora lutea across the breeding season. *Theriogenology*, 23: 481-486.
94. **Gacitua H, Arav A (2005):** Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen. *Theriogenology* 63: 931–938.
95. **Garbayo JM, Remy B, Alabart JL, Folch J, Wattiez R, Falmagne P, Beckers JF (1998):** Isolation and partial characterization of a pregnancy-associated glycoprotein family from the goat placenta. *Biol Reprod* 58: 109-115.
96. **Garcia C (1984):** Test de endosmosis en ovino. *VII Jornadas Internacionales de Reproduccion Animal*. Murcia (España), pp.116
97. **Garde JJ, Ortiz N, García AJ, Gallego L, Landete-Castillejos T, López A (1998):** Postmortem assessment of sperm characteristics of the red deer during the breeding season. *Arch Androl* 41: 195-202
98. **Garner S, Hafez ESE (2000):** Espermatozoides y plasma seminal. En: Reproducción e Inseminación Artificial en animales. Hafez ESE y Hafez B (editores). 7ª Ed. Mc Graw Hill-InterAmericana, México, pp.45-115.
99. **Garrett PD (2001):** The Pelvis, Pelvic Viscera and External Genitalia. En: Guide to regional Ruminant Anatomy base on the dissection of the goat. Constantinescu GM (editor). Ed. Ames. IA, Iowa State Univ. Press, pp. 186-216.
100. **Gatti JL, Castella S, Dacheux H, Ecroyd S, Metayer S, Thimon V, Dacheux JL (2004):** Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci* 82: 321-339.
101. **Gebauer MR, Pickett BW, Komarek RJ, Gaunva WS (1970):** Motility of bovine spermatozoa extended in “defined” diluents. *J Dairy Sci* 53: 817-823.
102. **Gillan L, Evans G, Maxwell WM (1997):** Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 9: 481-487.
103. **Gillan L, Koetsch T, Maxwell W, Evans G (2008):** Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim Reprod Sci* 103: 201–214.
104. **Gilmore JA, Du J, Tao J, Peter AT, Critser JK (1996):** Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *J Reprod Fert* 107: 87-95.
105. **Gilmore JA, McGann LE, Ashworth E, Acker JP, Raath JP, Bush M, Critser JK (1998):** Fundamental cryobiology of selected African mammalian spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome resource banking. *Anim Reprod Sci* 53: 277-297.

106. Godet G, Mercat M, Runavot J (1996): Effect of heterospermic insemination on reproductive performance of the sow. *Reprod Domest Anim* 31: 313–315.
107. Gomes WR, Cole HH, Cupps PT (1984): Inseminación Artificial. En Reproducción de animales domésticos. Cole HH y Cupps PT (editores). Ed. Acribia, Zaragoza, pp. 215-239.
108. González A, Santiago-Moreno J, Cocero MJ, López-Sebastian A (2000): Effects of FSH comercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spain Merino ewe. *Theriogenology* 54: 1055-1064.
109. González F (1995): Caracterización del ciclo sexual y del crecimiento folicular terminal en la cabra de la Agrupación Caprina Canaria (variedad Majorera). Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
110. González F, Sulon J, Garbayo J, Batista M, Cabrera F, Calero P, Gracia A, Beckers J (1999): Early pregnancy diagnosis in goats by determination of pregnancy-associated glycoprotein concentrations in plasma samples. *Theriogenology* 52: 717-725.
111. González F, Sulon J, Calero P, Batista M, Gracia A, Beckers JF (2001): Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) detection in milk samples for pregnancy diagnosis in dairy goats. *Theriogenology* 56: 671-676.
112. González F, Cabrera F, Batista M, Rodríguez N, Álamo D, Sulon J, Beckers JF, Gracia A (2004): A comparison of diagnosis of pregnancy in the goat via transrectal ultrasound scanning, progesterone and pregnancy associated glycoprotein assay. *Theriogenology* 62: 1108-1115.
113. Goodman RL, Karsch FJ (1980): Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroid. *Endocrinology* 107: 1286-1290.
114. Gordon I (1996): Pregnancy testing and the control of parturition in goats En: Controlled Reproduction in Sheep and Goats. Ed. CAB International, Wallingford, Oxon, pp. 398-415.
115. Greyling JPC, Grobeelaar JAN (1983): Seasonal variation in semen quality of Boer and Angora goat rams using different collection techniques. *S Afr J Anim Sci* 13: 250-252.
116. Greyling JP, Van-Niekerk CH (1990): Ovulation in the Boer goat doe. *Small Ruminant Res* 3: 457-464.
117. Guilbault LA, Thatcher WW, Drost M, Hopkins SM (1985): Source of F series prostaglandins during the early postpartum period in cattle. *Biol Reprod* 31: 879-887.
118. Guillomot M, Renaud P, La Bonnardière C, Charpigny G (1998): Characterization of conceptus-produced goat interferon Y and analysis of its temporal and cellular distribution during early pregnancy. *J Reprod Fertil* 112: 149-156.
119. Guruprasad K, Blundell TL, Xie S, Green J, Szafranska B, Nagel RJ, McDowell K, Baker CB, Roberts RM (1996): Comparative modeling and analysis of amino-acid substitutions suggests that the family of pregnancy-associated glycoproteins includes both active and inactive aspartic proteinases. *Protein Eng* 9: 849-856.
120. Hackett AJ, Wolynetz MS (1982): Effectiveness of photoperiod stimulation on reproductive performance of sheep housed continuously indoors on an accelerated breeding schedule. *Can J Comp Med* 46: 400-404.
121. Haibel GK (1990): Use of ultrasonography in the reproductive management of sheep and goat herds. *Vet Clin N Am-Food A* 6: 597-613.

122. Haibel GK, Perkins NR (1989): Real-time ultrasonic biparietal diameter of second trimester Suffolk and Finn sheep fetuses and prediction of gestational age. *Theriogenology* 32: 863-869.
123. Haugan T, Reksen O, Gröhn T, Gaustad A, Hofmo P (2005): A retrospective study on effects of storage time of liquid boar semen on reproductive performance in Norwegian swine. *Theriogenology* 64: 891-901.
124. Haugan T, Gaustad A, Reksen O, Gröhn Y, Hofmo P (2007): Fertility results of artificial inseminations performed with liquid boar semen stored in X-cell vs BTS extender. *Reprod Domest Anim* 42: 94-99.
125. Hendricks KE, Penfold LM, Evenson DP, Kaproth MT, Hansen PJ (2010): Effects of airport careening X-irradiation on bovine sperm chromatin integrity and embryo development. *Theriogenology* 73: 267-272.
126. Hernández M, Roca J, Gil M, Vázquez J, Martínez E (2007): Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology* 67: 1436-1445.
127. Hesselink JW, Taverne MAM (1994): Ultrasonography of the uterus of the goat. *Vet Quart* 16: 41-45.
128. Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado JM (2006): Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology* 66: 996-1003.
129. Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado JM (2007): The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Anim Reprod Sci* 100: 61-72.
130. Holdsworth RJ, Davies J (1979): Measurement of progesterone in goat's milk: an early pregnancy test. *Vet Rec* 105: 535.
131. Holt W (1997): Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 9: 309-319.
132. Holt W, Medrano A, Thurston L, Watson P (2005): The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* 63: 370-382.
133. Homeida MA, Cooke RG (1989): Hormonal events at oxytocin-induced estrus in the goat. *Theriogenology* 32: 1007-1010.
134. Homeida MA, Khalafalla AE (1990): Effects of oxytocin and an oxytocin antagonist on testosterone secretion during the oestrus cycle of the goat (*Capra hircus*). *J Reprod Fertil* 89: 347-350.
135. Hulet CV, Shelton M (1984): Borregos y cabras. En: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Hafez ESE (editor). 4ª ed. Ed Interamericana McGraw-Hill, México, pp. 329-340.
136. Humblot P, De Montigny G, Jeanguyot N, Tetedoie F, Payen B, Thibier M, Sasser RG (1990): Pregnancy-specific protein B and progesterone concentration in French Alpine goats throughout gestation. *J Reprod Fertil* 89: 205-212.
137. Hunter RHF (1982): Técnicas para modificar el ciclo estral: Sincronización del estro con la cría programada. En: Fisiología y Tecnología de la Reproducción de la Hembra de los Animales Domésticos. Ed. Acribia, Zaragoza, pp. 33-45.
138. Illera M (1994): Capítulo 3: Ciclo reproductivo en la hembra: Foliculogénesis. En: Reproducción de Animales Domésticos. Ed. Aedos, Barcelona, pp. 59-97.

139. Iritani A, Nishikawa U, Fukuhara R (1961): Studies on the egg-yolk coagulating factor in goat sperm: I. localization of coagulating factors and decline of pH following coagulating. Proc. Silver Jubilee Lab. Anim. Husbandry, Kyoto, pp. 89–96.
140. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Kennedy W, Pérez-Pelaez M, Zaneveld LJ (1984): Comparison of glycerol and a zwitter ion buffer system as cryoprotective media for human spermatozoa. Effect on motility, penetration of zona-free hamster oocytes, and acrosin/proacrosin. *J Androl* 5: 1-7.
141. Jiménez-Rabadán P, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, del Olmo E, Pérez-Guzman MD, Bisbal A, Fernández-Santos MR, Garde JJ, Soler AJ (2012): Effect of semen collection method (artificial vagina vs electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. *Anim Reprod Sci* 132: 88-95.
142. Johnson L (1991): Spermatogenesis. En: Reproduction in Domestic Animals. Cupps PT (editor). 4ª Ed. Academic Press Inc., San Diego CA, pp.173-219.
143. Joseph M, Nai KP (1989): Effect of frequency of ejaculation on semen characteristics, libido and fertility in cross-bred bucks. *Indian J Anim Reprod* 10: 127-133.
144. Kaabi M, Paz P, Álvarez M, Anel E, Boixo JC, Rouissi H, Herraes P, Anel L (2003): Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 60: 1249-1259.
145. Kaabi M, Alvarez M, Anel E, Chamorro C, Boixo JC, Paz P (2006): Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: a postmortem study. *Theriogenology* 66: 1876–1883.
146. Karagiannidis A, Varsakeli S, Alexopoulos C, Amarantidis I (2000): Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Ruminant Res* 37: 125-130.
147. Karatzas G, Karagiannidis A, Varsakeli S, Brikas P (1997): Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology* 48: 1049-1059.
148. Karsch FJ, Bittman EL, Foster DL, Goodman RL, Igan SJ, Robinson JE (1984): Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Prog Horm Res* 40: 185-232.
149. Kilgour R (1985): Animal welfare considerations – pastoral animals. *New Zeal Vet J* 33: 54-57.
150. King GJ, Thatcher WW (1993): Pregnancy. En: Reproduction in Domestic Animals. King GJ (editor). Ed. Elsevier Science Publisher BV, Amsterdam, pp. 229-270.
151. Kornalijnslijper JE, Kemp B, Bevers MM, Van Oord HA, Taverne MA (1997): Plasma prolactin, growth hormone and progesterone concentration in pseudopregnant, hysterectomized and pregnant goats. *Anim Reprod Sci* 49: 169-178.
152. Kretser DM, Kerr JB (1994): The cytology of the testis. En: The physiology of Reproduction. Knobil E y Neill JD (editores). 2ª Ed Raven Press, New York, pp. 1177-1290.
153. Lavoit MC, Taverne MA (1989): The diagnosis of pregnancy and pseudopregnancy, and the determination of fetal numbers of goats, by means of real-time ultrasound scanning. En: Diagnostic Ultrasound and Animal Reproduction, Taverne MA y Willemsse AH (editores). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp. 89-96.
154. Leboeuf B, Restall B, SÁlamon S (2000): Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 62: 113–141.

155. Leboeuf B, Forgerit Y, Bernelas D, Pougard JL, Senty E, Driancourt MA (2003a): Efficacy of two types of vaginal sponges to control onset of oestrus, time of preovulatory LH peak and kidding rate in goats inseminated with variable numbers of spermatozoa. *Theriogenology* 60: 1371–1378.
156. Leboeuf B, Guillouet Ph, Batellier F, Bernelas D, Bonne J, Forgerit Y, Renaud G, Magistrini M (2003b): Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. *Theriogenology* 60: 867–877.
157. Leboeuf B, Delgadillo JA, Manfredi E, Piacere A, Clément V, Martin P, Pellicer M, Boué P, de Cremoux R (2008): Management of goat reproduction and insemination for genetic improvement in France. *Reprod Domest Anim* 43: 379-385.
158. Lima S, Vanini-de-Moraes G, Marques-Moreira HL, Fonseca-de Masedo-de A, Pego-de-Macedo LC (1994): Avaliação de épocas do ano as características do semen antes e após a congelação. *Revista UNIMAR* 16: 181-194.
159. Lindhal IL (1972): Early pregnancy detection in ewes by intrarectal reflection echo ultrasound. *J Anim Sci* 34: 772-775.
160. Llewelyn CA, Pierre J, Luchins AG, Munro CD (1993): Oestrus in the British White goat timing of plasma luteinizing hormone surge and changes in behavioral and vaginal traits in relationship to onset of Oestrus. *Br Vet J* 149: 171-182.
161. Loubser PG, Greyling JPC, Viljoen KS (1983a): Artificial insemination of Angora goat does with pelleted deep-frozen semen. *S Afr J Anim Sci* 13: 134-135.
162. Loubser PG, Niekerk-van CH (1983b): Seasonal changes in sexual activity and semen quality in the Angora ram. 2. Semen volume, quality and freezability. *S Afr J Anim Sci* 13: 161-163.
163. Lynch JJ, Hinch GN, Adams DB (1992): The reproductive behaviour of sheep. En: The Behaviour of Sheep. CAB international and CSIRO., Camberra, pp.96-125.
164. Lyngset O (1986): Studies on reproduction in goat. V. Pathological conditions and malformations of the genital organs of the goat. *Acta Vet Scand* 9: 364-375.
165. McCracken JA, Schramm W, Okulicz WC (1984): Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF₂α from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Anim Reprod Sci* 7: 31-55
166. Maeda KI, Mori Y, Sawasaky T, Kano Y (1984): Diurnal changes in peripheral melatonin concentration in goats and effects of light or dark interruption. *Jpn J Vet Sci* 46: 837-842.
167. Malpoux B, Vigié C, Skinner DC, Thiéry JC, Chemineau P (1997): Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Res Bull* 44: 431-438.
168. Mara L, Dattena M, Pilichi S, Sanna D, Branca A, Cappai P (2007): Effect of different diluents on goat semen fertility. *Anim Reprod Sci* 102: 152–157.
169. Martemucci G, Dálessandro AG (2011): Induction/synchronization of oestrus and ovulation in dairy goats with different short term treatments and fixed time intrauterine or exocervical insemination system. *Anim Reprod Sci* 126: 187-194.
170. Martin GB, Walkden-Brown SW (1995): Nutritional influences on reproduction in mature male cheep and goats. *J Reprod Fertil (Suppl)* 49: 437-449.
171. Martínez MF, Bosch P, Bosch RA (1998): Determination of early pregnancy and embryonic growth in goats by transrectal ultrasound scanning. *Theriogenology* 49: 1555-1565.

172. Maxwell WM, Landers AJ, Evans G (1995): Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology* 4: 1201-1210.
173. Medrano A, Cabrera F, González F, Batista M, Gracia A (2002): Is sperm cryopreservation at -150 degree C a feasible alternative? *Cryoletters* 23: 167-172.
174. Memon MA, Bretzlaff KN, Ott RS (1985): Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen thawed goat spermatozoa. *Am J Vet Res* 46: 473-475.
175. Memon MA, Bretzlaff KN, Ott RS (1986): Comparison of semen collection techniques in goats. *Theriogenology* 26: 823-827.
176. Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia FM, Audrey G (2011): Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender. *Anim Reprod Sci* 129: 44-49.
177. Menchaca A, Rubianes E (2007): Pregnancy rate obtained with short-term protocol for timed artificial insemination in goats. *Reprod Domest Anim* 42: 590-593.
178. Mendoza G, White IG, Chow P (1989): Studies of chemical components of Angora goat seminal plasma. *Theriogenology* 32: 455-466.
179. Meque LC (2004): Diseño de un diluyente de refrigeración seminal en la especie ovina. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
180. Metha VM, Patel AV, Nigam R, Jaiswal R, Patel DM (1991): Estrous behaviour and biochemical profile studies during first oestrus cycle of Surti and Marwari goats. *Indian J Anim Sci* 12: 58-63.
181. Mori Y, Kano Y (1984): Changes in plasma concentration of LH, progesterone and estradiol in relation to the occurrence of luteolysis, oestrus and time of ovulation in the Shiba goat (*Capra hircus*). *J Reprod Fertil* 72: 223-230.
182. Murray RD, Newstead R (1988): Determination of steroid hormones in goat's milk and plasma as an aid to pregnancy diagnosis using an ELISA. *Vet Rec* 122: 158-161.
183. Nascimento AF, Maria AN, Pessoa NO, Carvalho MA, Viveiros AT (2010): Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish piratinga (*Piaractus brachypomus*). *Anim Reprod Sci* 118: 324-329.
184. Nordstoga AB, Söderquist L, Ådnøy T, Farstad W, Paulenz H (2010): Vaginal deposition of frozen-thawed semen in Norwegian dairy goats: comparison of single and double insemination with equal total number of spermatozoa. *Theriogenology* 74: 895-900.
185. Nordstoga AB, Söderquist L, Ådnøy T, Paulenz H (2011): Fertility results after vaginal deposition of frozen-thawed buck semen diluted with two different extenders using one- or two-step procedures. *Reprod Domest Anim* 46: 82-86.
186. Okere C, Chiboka O, Montsma G (1986): Effect of frequent ejaculation of West African dwarf goat on semen characteristics. *Anim Reprod Sci* 11: 249-258.
187. Oliver LA (1995): Caracteres generales de las cabras Canarias. *Canarias Agraria* 27: 33-38.
188. Ollero M, Perez-Pe R, Muiño-Blanco T, Cebrian-Perez JA (1998): Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology* 37: 1-12.
189. Ott RS, Nelson DR, Hixon JE (1980): Fertility of goats following synchronization of estrus with prostaglandin in F2alpha. *Theriogenology* 13: 341-345.

190. Orsi AM, Mombrom De Carvalho I, Moreira JE, Valente MM, Guazzelli Filho J (1984): Morphology of the rete testis of the domestic goat (*Capra hircus*). *Anat Histol Embryol* 13: 42-49.
191. Pathiraja N, Oyedipe EO, Gyang EO, Obasi A (1991): Plasma progesterone levels during oestrous cycle and their relationship with the ovulation in red Sokoto (Maradi) goats. *Br Vet J* 147: 57-62.
192. Patil RV, Raja CK (1978): Effect of season on the semen characteristics of Malabari bucks. *Indian Vet J* 55: 761-766.
193. Paulenz H, Kommisrud E, Hofmo PO (2000): Effect of long term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. *Reprod Domest Anim* 35: 83-87.
194. Paulenz H, Söderquist L, Adnoy T, Soltun K, Saether PA, Fjellsoy KR (2005): Effect of cervical and vaginal insemination with liquid semen stored at room temperature on fertility of goats. *Anim Reprod Sci* 86: 109-117.
195. Peaker M (1978): Gestation period and litter size in the goat. *Br Vet J* 134: 379-383.
196. Pellicer MT (1996): Conservación del semen caprino. Interacción entre la secreción bulbouretral y el diluyente leche: identificación y mecanismo de acción de los componentes implicados en el deterioro espermático. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
197. Pérez B, Mateos E (1996): Effects of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malagueña breeds. *Small Ruminant Res* 22: 163-168.
198. Peskovatskov AP (1985): Artificial insemination of goats using frozen semen. *Ovtsevodstvo* 4: 19.
199. Peterson K, Kappen M, Ursem P, Nothling J, Colenbrander B, Gadella B (2007): Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. *Theriogenology* 67: 863-871.
200. Pineda MH (1989): Reproductive patterns of sheep and goat. En: Veterinary Endocrinology and Reproduction. Mc Donald (editor). 4ª ed. Ed. Lea & Febiger, Filadelfia, pp.428-447.
201. Pintado-Sanjuanbenito B, Pérez-Llano B (1992): Effect of glutaraldehyde concentration and fixative temperature on the number of spermatozoa with normal acrosomes in goat semen. *Theriogenology* 38: 527-533.
202. Powell MR, Kaps M, Lamberson WR, Keisler DH (1996): Use of melengestrol acetate-based treatments to induce and synchronize estrus in seasonally anestrous ewes. *J Anim Sci* 74: 2292-2302.
203. Pratt MS, Hopkins PS (1975): The diagnosis of pregnancy in sheep by abdominal palpation. *Aust Vet J* 36: 57-66.
204. Pursel VG, Johnson LA, Schulman LL (1973): Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J Anim Sci* 37: 528-531.
205. Ramalho-Santos J, Schatten G, Moreno RD (2002): Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 67: 1043-1051.
206. Refsal KR, Marteniuk JV, Williams CS, Nachreiner RF (1991): Concentrations of estrone sulfate in peripheral serum of pregnant goats: Relationships with gestation length, fetal number and the occurrence of fetal death in utero. *Theriogenology* 36: 449-461.
207. Restall BJ, Milton JYB, Klongyutti P, Kochapakdee S (1990): Pregnancy diagnosis in the Thai native goats. *Theriogenology* 34: 313-317.

208. Rigau T, Piedrafita J, Reverter A, Canal M, Rodríguez-Gil JE (1996): The rate of L-lactate production: A feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. *Anim Reprod Sci* 43: 161-172.
209. Ritar AJ, SÁlamos S (1982): Effects of seminal plasma and 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: 305-312.
210. Ritar AJ, SÁlamos S (1983): Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. *Aust J Biol Sci* 36: 49-59.
211. Ritar AJ, Maxwell WM, SÁlamos S (1984): Ovulation and LH secretion in the goat after intravaginal progestagen sponge-PMSG treatment. *J Reprod Fertil* 72: 559-563.
212. Ritar AJ, Ball PD, O'May PJ (1990): Artificial insemination of Cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. *Reprod Fertil Dev* 2: 377-384.
213. Ritar AJ, SÁlamos S (1991): Effect of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. *Small Ruminant Res* 4: 29-37.
214. Ritar AJ, Mendoza G, SÁlamos S, White IG (1992): Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (*Capra hircus*). *J Reprod Fert* 95: 97-102.
215. Ritar AJ, Ball PD (1993): The effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at a high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination. *Anim Reprod Sci* 31: 249-262.
216. Ritar AJ, Campet M (2000): Sperm survival during short-term storage and after cryopreservation of semen from striped trumpeter (*Latris Lineata*). *Theriogenology* 54: 467-480.
217. Roca J, Carrizosa JA, Campos I, Lafuente A, Vázquez JM, Martínez E (1997): Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Ruminant Res* 25: 147-153.
218. Roca J, Martínez E, Vázquez JM, Coy P (1992a): Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. *Anim Reprod Sci* 29: 225-262.
219. Roca J, Martínez E, Sánchez-Valverde MA, Ruiz S, Vázquez JM (1992b): Seasonal variations of semen quality in male goats: study of sperm abnormalities. *Theriogenology* 38: 115-125.
220. Roca J, Vázquez J, Gil M, Cuello C, Parrilla I, Martínez E (2006): Challenges in pig artificial insemination. *Reprod Domest Anim* 41: 43-53.
221. Rodríguez JG, Véliz FG, Flores JA, Duarte G, Vielma J, Malpoux B, Delgadillo JA (2002): La respuesta de las cabras al efecto macho no depende de la separación de los dos sexos, sino del comportamiento sexual del macho. *Memorias de la XVII Reunión Nacional sobre Caprinocultura*. Universidad Juárez de Estado de Durango, México, pp.176-189.
222. Romano JE (1994): Effects of different stimuli of service on estrus duration in dairy goats. *Theriogenology* 42: 875-879.
223. Roth T, Bush LM, Wildt DF, Weise RB (1999): Scimitar-horned Oryx (*Oryx dammah*) spermatozoa are functionally competent in a heterologous bovine in vitro fertilization system after cryopreservation on dry ice, in a dry shipper, or over liquid nitrogen vapour. *Biol Reprod* 60: 493-498.

- 224. Rubianes E, Menchaca A (2003):** The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Anim Reprod Sci* 78: 271-287.
- 225. Ruder CA, Stellflug JN, Dahmen JJ, Sasser RG (1988):** Detection of pregnancy in sheep by radioimmunoassay of sera for pregnancy-specific protein B. *Theriogenology* 29: 905-912.
- 226. Sabate J (2003):** Nut consumption and body weight. *Am J Clin Nutr* 78: 647-650.
- 227. SÁlamon S (1971):** Fertility of ram spermatozoa following pellet freezing on dry ice at -79 and -140 degrees C. *Aust J Biol Sci* 24: 183-185.
- 228. SÁlamon S, Ritar AJ (1982):** Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Aust J Biol Sci* 35: 295-303.
- 229. SÁlamon S, Maxwell WC (1995):** Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci* 37: 185-249.
- 230. Salhab SA, Zarkawi M, Wardeh MF, Al-Marsi MR, Kassem R (2003):** Characterization and evaluation of semen in growing Awassi ram lambs. *Trop Anim Health Prod* 35: 455-463.
- 231. Salvador I, Viudes-de-Castro MP, Bernacer J, Gómez EA, Silvestre MA (2005):** Factors affecting pregnancy rate in artificial insemination with frozen semen during non-breeding season in Murciano-Granadina goats: a field assay. *Reprod Domest Anim* 40: 526-529.
- 232. Salvador I, Yaniz J, Viudes-de-Castro MP, Gomez EA, Silvestre MA (2006):** Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5°C. *Theriogenology* 66: 974-981.
- 233. Sambraus HH, Wittman M (1993):** Observation of the birth and suckling behaviour of goats. *Tierärztliche Praxis* 17: 359-365.
- 234. Sawada T, Nakatani T, Tamada H, Mori J (1995):** Secretion of unconjugated estrone during pregnancy and around parturition in goats. *Theriogenology* 44: 281-286.
- 235. Setchell BP (1984):** The functions of the testis and epididymis in rams. En: Reproduction in Sheep. Lindsay DR y Pearce DT (Eds). Australian Academy of Science, Canberra, pp. 62-71.
- 236. Setchell BP (1991):** Male reproductive organs and semen. En: Reproduction in Domestic Animals. Cupps PT (Ed.). Academic Press Inc., San Diego CA, pp. 221-259.
- 237. Shelton M (1978):** Reproduction and breeding of goats. *J Dairy Sci* 61: 994-1010.
- 238. Singh MP, Sinha AK, Singh BK (1995):** Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology* 43: 1047-1053.
- 239. Sinha NK, Wani GM, Sahni KL (1981):** Effect of seasons and age on seminal attributes of Jamnapari bucks. *Indian Vet J* 58: 963-965.
- 240. Sinha MP, Sinha AK, Singh BK (1995):** Effect of methylxanthines on motility and fertility of frozen-thawed goat semen. *Theriogenology* 44: 907-914.
- 241. Sirat MP, Sinha AK, Singh BK, Prasad RL (1996):** Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology* 45: 405-416.
- 242. Skalet LH, Rodrigues HD, Goyal HO, Maloney MA, Vig MM, Noble RC (1988):** Effects of age and season on the type and occurrence of sperm abnormalities in Nubian bucks. *Am J Vet Res* 49: 1284-1289.
- 243. Smital J, De Sousa L, Mohsen A (2004):** Differences among breeds and manifestation of heterosis in AI boar sperm output. *Anim Reprod Sci* 80: 121-130.

- 244. Smith MC (1980):** Caprine reproduction. En: Current Therapy in Theriogenology. Morrow DA (editor). Ed WB Saunders. Philadelphia, pp. 975-977.
- 245. Smith MC (1986)** Anestrous, pseudopregnancy and cystic follicles. En: Current Therapy in Theriogenology. Morrow DA (editor). Ed WB Saunders. Philadelphia, pp. 586.
- 246. Soderquist L, Madrid-Bury N, Rodriguez-Martinez H (1997):** Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology* 48: 1115-1125.
- 247. Song DJ, Park CS, Choe SY (1984):** Estrous cycle length and period in Korean native goats. *Korean J Anim Sci* 26: 527-533.
- 248. Sousa NM, Garbayo JM, Figueiredo JR, Sulon J, Gonçalves PBD, Beckers JF (1999):** Pregnancy-associated glycoprotein and progesterone profiles during pregnancy and postpartum in native goats from the north-east of Brazil. *Small Ruminant Res* 32: 137-147.
- 249. Stellflug JN, Berardinelli JG (2002):** Ram mating behavior after long-term selection for reproductive rate in Rambouillet ewes. *J Anim Sci* 80: 2588-2593.
- 250. Taverne MAM (1984):** The use of linear-array real-time ecography in veterinary obstetric and gynecology. *Tijdschr Diergeneesk* 109: 494-506.
- 251. Thibier M, Pothelet D, Jeanguyot N, De Montigny G (1981):** Estrous behavior, progesterone in peripheral plasma and milk in dairy goats at onset of breeding season. *J Dairy Sci* 64: 513-519.
- 252. Tielgy AH, Fathalla M, Omar MA, Al-Dahash S (1982):** The clinical and morphological characteristics of the uterus of the goat during the period of involution. *Can Vet J* 23: 138-140.
- 253. Tuli RK, Schmidt-Baulain R, Holtz W (1991):** Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxalacetic transaminase in frozen semen from Boer goats. *Anim Reprod Sci* 25: 125-131.
- 254. Tuli RK, Holtz W (1992):** The effect of zwitterions buffers on the freezability of Boer goat semen. *Theriogenology* 37: 947-951.
- 255. Tuli RK, Holtz W (1994):** Effect of glicerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology* 42: 547-555.
- 256. Tuli RK, Holtz W (1995):** Effect of season on the freezability of Boer goat semen in the northern temperature zone. *Theriogenology* 43: 1359-1363.
- 257. Vandenberg JG (1994):** Pheromones and mammalian reproduction. En: Physiology of Reproduction. Knobil E y Neill JD (Eds). 2nd ed., Raven Press. Nueva York, pp. 343-358.
- 258. Waide Y, Niwa T, Asanuma R (1977):** Studies on the preservation of liquid and frozen semen of domestic animals: III. Viability and fertility of frozen goat spermatozoa. *Jpn J Anim Reprod* 23: 129-137.
- 259. Walkden-Brown SW, Restall BJ, Norton BW, Scaramuzzi, Martin GB (1994):** Effect of nutrition on seasonal patterns of LH, FSH and testosterone concentration, testicular mass, sebaceous gland volume and odour in Australian Cashmere goats. *J Reprod Fertil* 102: 351-360.
- 260. Walkden-Brown SW, Martin GB, Restall BJ (1999):** Role of male-female interaction in regulating reproduction in sheep and goats. *J Reprod Fertil (Suppl)* 54: 243-257.
- 261. Wango EO, Heap RB, Wooding FB (1991):** Progesterone and 5 beta-pregnandiol production by isolated fetal placental binucleate cells from sheep and goats. *J Endocrinol* 129: 283-289.

- 262. Wani NA, Wani GM, Mufti AM, Khan MZ (1998):** Ultrasonic pregnancy diagnosis in Gaddi goats. *Small Ruminant Res* 29: 239-240.
- 263. Watson PF (1981):** The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil* 62: 483-492.
- 264. Watson PF (1995):** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 7: 871-891.
- 265. Watson PF, Martin IC (1973):** The response of ram spermatozoa to preparations of egg yolk in semen diluents during storage at 5 or -196 degrees C. *Aust J Biol Sci* 26: 927-935.
- 266. Williams CSF (1986):** Pregnancy diagnosis in goat. En: Current Therapy in Theriogenology. Morrow DA (editor). Ed WB Saunders. Philadelphia, pp. 587-588.
- 267. Wooding FB (1992):** Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* 13: 101-113.
- 268. Wooding FB, Morgan G, Monaghan S, Hamon M, Heap RB (1996):** Functional specialization in the ruminant placenta: evidence for two populations of fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity. *Placenta* 17: 75-86.
- 269. Yanagimachi R (1994):** Mammalian fertilization. En: The Physiology of Reproduction. Knobil E y Neill JD (editores). 2ª Ed., Raven Press. New York, pp. 189-317.
- 270. Zarazaga LA, Gatica MC, Celi I, Guzman JL, Malpaux B (2009):** Effect of melatonin implants on sexual activity in Mediterranean goat females without separation from males. *Theriogenology* 72: 910-918.
- 271. Zarazaga LA, Gatica MC, Celi I, Guzman JL, Malpaux B (2011):** Artificial long days in addition to exogenous melatonin and daily contact with bucks stimulate the ovarian and oestrous activity in Mediterranean goat females. *Animal* 5: 1414-1419.
- 272. Zarazaga LA, Gatica MC, Celi I, Guzman JL (2012):** Reproductive performance is improved during seasonal anoestrus when female and male Murciano-Granadina goats receive melatonin implants and in Payoya goats when females are thus treated. *Reprod Domest Anim* 47: 436-442.
- 273. Zarrouk A, Engeland IV, Sulon J, Beckers JF (1999a):** Pregnancy-associated glycoprotein levels in pregnant goats inoculated with *Toxoplasma gondii* or *Listeria monocytogenes*: a retrospective study. *Theriogenology* 52: 1095-1104.
- 274. Zarrouk A, Engeland I, Sulon J, Beckers JF (1999b):** Determination of pregnancy-associated glycoprotein concentrations in goats (*Capra hircus*) with unsuccessful pregnancies: a retrospective study. *Theriogenology* 51: 1321-1331.
- 275. Zoli AP, Beckers JF, Wounters-Ballman P, Closset J, Falmagne P, Ectors F (1991):** Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Biol Reprod* 45: 1-10.
- 276. Zoli AP, Guilbault LA, Delahaut P, Ortiz WB, Beckers JF (1992):** Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biol Reprod* 46: 83-92.