

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS**



**“EFECTO DEL RETIRO DE PLASMA SEMINAL EN LA CALIDAD
ESPERMÁTICA DE SEMEN CAPRINO CONGELADO USANDO DIFERENTES
CRIOPRESERVADORES”**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS VETERINARIAS**

PRESENTA

VÍCTOR ABRAHÁN SALGADO BELTRÁN

DIRECTOR DE TESIS

DR. Víctor Manuel González Vizcarra

CO-DIRECTOR DE TESIS

DR. Martin Francisco Montaña Gómez

ASESORES

DRA. Olga Maritza Manríquez Núñez

Dr. Rafael Villa Angulo

MEXICALI, B.C. MÉXICO

AGOSTO 2016

Efecto del retiro de plasma seminal en la calidad espermática de semen caprino congelado usando diferentes criopreservadores. Tesis presentada por Víctor Abrahán Salgado Beltrán, como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité mencionado a continuación:

**Dr. Víctor Manuel González Vizcarra
Director de Tesis**

**Dr. Martín Francisco Montaña Gómez
Co-Director de Tesis**

**Dra. Olga Maritza Manríquez Núñez
Asesor**

**Dr. Rafael Villa Angulo
Asesor**

AGRADECIMIENTOS

Primeramente doy gracias a Dios por la culminación de ésta tesis de maestría, le doy las gracias al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California por hacerme participe de este proyecto. Así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante esta etapa. Agradezco a mi tutor el Dr. Víctor Manuel González Vizcarra por el apoyo incondicional que siempre ha demostrado hacia mi persona. A la Dra. Maritza Manríquez por el apoyo brindado como coordinadora del programa de Maestría en Ciencias Veterinarias. A mi comité de tesis por su valioso apoyo y asesoramiento durante este periodo.

A mis padres que siempre me han apoyado en todas las decisiones que he tomado, por creer en mí, en mis ideales y en las metas que me voy poniendo a lo largo de este camino llamado vida.

A mis amigos y compañeros de equipo de trabajo; Emilio, Armando, Jesús y Julio, consiente estoy de la ayuda que me brindaron durante este proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres que siempre han estado en los momentos buenos y malos, gracias por apoyarme a la distancia y nunca hacerme sentir solo, por estar ahí en los tiempos de enfermedad al pie del cañón conmigo. Hoy culmino ésta tesis para obtener el grado de Maestría y sean conscientes que todo lo que realizo lo hago para que se sientan orgullosos de mí, así como yo lo estoy que sean mis padres.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto que tiene el retiro del plasma seminal sobre la calidad espermática del semen caprino. Para la congelación del semen se asignaron 4 tratamientos, T1 Optydil[®] con semen completo, T2 Andromed[®] con semen completo, T3 Optydil[®] con semen sin líquido seminal, T4 Andromed[®] con semen sin líquido seminal. Esto debido a que diversas publicaciones mencionan que la enzima causante de la muerte espermática que reacciona con la yema de huevo está presente en el líquido seminal. Para cada uno de los tratamientos se realizaron las siguientes pruebas; Motilidad porcentual al descongelado de nitrógeno líquido, Prueba de termoresistencia a 37 grados, Prueba de resistencia a 4 grados y Prueba de eosina/nigrosina para conteo de espermatozoides vivos y muertos. Se puede observar que si hay diferencia estadística al momento de realizar la congelación de semen caprino con muestras completas y sin plasma seminal, obteniendo valores más estables los tratamientos a los cuales se les retiró el plasma seminal.

Palabras clave: Plasma seminal, Criopreservacion, Semen caprino, Lavado seminal.

ABSTRACT

The aim of this study was evaluate the effect of seminal plasma retirement on espermatic quality in goat semen. For semen frozing were assigned 4 treatments: T1 Optydil[®] with full semen, T2 Andromed[®] with full semen, T3 Optydil[®] with semen without seminal fluid and T4 Andromed[®] with semen without seminal fluid. This assignation of treatments is because there are some publications that mention the enzyme present in seminal causes espermatic death when it reaction with egg yolk. For each treatment the following test were performed: Porcentual motility at defrost, heat resistance at 37 and 4 degrees, eosine and negrosine test for counting live and dead sperm. It can be observed a statistic difference in the momento of semen freezing with full samples and without seminal plasma, obtaining more stable which treatments are the seminal plasma removal.

Key words: Seminal plasma, Cryopreservation, Goat semen, Sperm washing

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	2
REVISIÓN DE LITERATURA	4
<i>Conservación del semen</i>	4
<i>Influencia del ambiente sobre la calidad del semen</i>	5
<i>Diferencias básicas entre el semen caprino con otros rumiantes</i>	6
<i>Diluyentes del semen</i>	7
<i>Yema de huevo</i>	7
<i>Leche descremada</i>	8
<i>Triladyl</i>	9
<i>Skim milk extender</i>	9
<i>Biladyl</i>	9
<i>Aloe vera</i>	9
<i>Agua de coco</i>	10
<i>Crioprotectores del semen</i>	10
HIPOTESIS	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Descripción del área de estudio	14
Descripción de la población	14
Recolección del semen	15
Evaluación del semen	15
Motilidad Masal	16
Motilidad Porcentual	16
Asignación de tratamientos	17
Modelo Estadístico	17
RESULTADOS Y DISCUSIONES	19
LITERATURA CITADA	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Motilidad porcentual de las muestras después de ser descongeladas de nitrógeno líquido _____	19
Figura 2 Motilidad porcentual e las muestras en la prueba de termoresistencia a los 37 grados centígrados _____	21
Figura 3 Motilidad masal de las muestras en la prueba de resistencia a 4 grados centígrados _____	23
Figura 4 Porcentaje de espermatozoides vivos de las muestras sometidas a la prueba de Eosina/Nigrosina, evaluadas a 37 grados centifrados, 4 grados centifrados y descongeladas de nitrógeno líquido _____	25

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Calendario de toma de muestras _____	15
Cuadro 2 Pruebas de igualdad de medias para todos los posibles pares de vectores _____	20
Cuadro 3 Prueba de Wilcoxon Signed Rank Test de todos los posibles vectores de diferencias para termoresistencia a 37 grados centígrados _____	22
Cuadro 4 Prueba de Wilcoxon Signed Rank Test de todos los posibles vectores de diferencias para preservación de semen cuatro grados centígrados. _____	23
Cuadro 5 Prueba de Wilcoxon Signed Rank Test de todos los posibles vectores de diferencias para prueba de Eosina/Nigrosina. _____	25

INTRODUCCIÓN

Los caprinos constituyen la ganadería típica de las zonas áridas y semiáridas, consideradas marginales para otro tipo de ganado. Su capacidad de adaptación le permite sobrevivir en regiones de baja productividad forrajera.

El ambiente es un factor que influye sobre el potencial genético de los individuos determinando el período reproductivo y la intensidad del mismo. En cada especie, existen diferencias muy importantes entre razas en su respuesta sexual al fotoperíodo, observándose una gran variabilidad en cuanto a la duración y las fechas de inicio y finalización de la actividad reproductiva tanto para hembras como para machos.

La limitación en la utilización de sementales está sujeta a su disponibilidad para el corto periodo de la época reproductiva, la dispersión geográfica de los hatos, el número de machos disponibles, la libido y la producción seminal.

Una técnica que reduce significativamente estos inconvenientes para el mejoramiento genético es la inseminación artificial con semen congelado, con esta técnica se logra utilizar machos superiores genéticamente hablando y amplía su difusión a gran escala.

JUSTIFICACIÓN

La inseminación con semen fresco y/o refrigerado es la técnica de elección cuando los machos se encuentran en el establecimiento o en un radio cercano (cooperativas de productores de la región compartiendo el uso de reproductores). En estos casos, la inseminación vaginal (fresco) o intracervical (refrigerado) sobre celo natural o sincronizado, permiten obtener altas tasas de gestación (>60%) y no requieren equipamiento costoso o entrenamiento sofisticado (Leboeuf et al., 2000).

El congelamiento de semen permite una serie de ventajas adicionales, entre las que se destacan la posibilidad de usar el semen fuera de la estación reproductiva, la extensión de la vida reproductiva de machos sobresalientes más allá de su vida y la posibilidad de comercialización de semen (nacional e internacional). Sin embargo, el uso de semen congelado en caprinos tiene algunos obstáculos respecto de otras especies mayores como los bovinos. En primer lugar está el hecho de que el plasma seminal caprino contiene una lipasa producida por las glándulas bulbouretrales, que interactúa con la leche y/o yema de huevo produciendo sustancias tóxicas para el espermatozoide (Leboeuf et al., 2000).

La calidad del semen congelado disminuye con respecto a la del semen fresco o refrigerado, por una parte porque en general un 50 % de los espermatozoides no sobreviven al proceso de criopreservación (Curry, 2000) y porque durante el proceso de congelación los espermatozoides van a sufrir daños tanto bioquímicos (ralentización metabólica) como estructurales (cambios en la estructura de las bicapas lipídicas de las membranas tanto plasmáticas como de los orgánulos), que finalmente van a afectar a la funcionalidad de los

espermatozoides alterando su capacidad de fertilización. Estos daños se deben principalmente a cambios osmóticos y a la formación de hielo intracelular (Holt, 2000).

En el caso de los caprinos, la presencia de una fosfolipasa A en el plasma seminal, proveniente de las glándulas bulbouretrales, cataliza la hidrólisis de las lecitinas. Esto da como resultado la liberación de lisolecitinas y ácidos grasos al medio de dilución, los cuales resultan tóxicos para los espermatozoides se llamó a este compuesto “factor coagulador” (FC), debido al efecto que produce sobre la YH (yema de huevo) (Chauhan, 1990).

REVISIÓN DE LITERATURA

Conservación del semen

La inseminación con semen fresco y/o refrigerado es la técnica de elección cuando los machos se encuentran en el establecimiento o en un radio cercano (cooperativas de productores de la región compartiendo el uso de reproductores). En estos casos, la inseminación vaginal (fresco) o intracervical (refrigerado) sobre celo natural o sincronizado, permiten obtener altas tasas de gestación (>60%) y no requieren equipamiento costoso o entrenamiento sofisticado (Leboeuf et al., 2000).

El congelamiento de semen permite una serie de ventajas adicionales, entre las que se destacan la posibilidad de usar el semen fuera de la estación reproductiva, la extensión de la vida reproductiva de machos sobresalientes más allá de su vida y la posibilidad de comercialización de semen (nacional e internacional). Sin embargo, el uso de semen congelado en caprinos tiene algunos obstáculos respecto de otras especies mayores como los bovinos. En primer lugar está el hecho de que el plasma seminal caprino contiene una lipasa producida por las glándulas bulbouretrales, que interactúa con la leche y/o yema de huevo produciendo sustancias tóxicas para el espermatozoide (Leboeuf et al., 2000).

La calidad del semen congelado disminuye con respecto a la del semen fresco o refrigerado, por una parte porque en general un 50 % de los espermatozoides no sobreviven al proceso de crioconservación (Curry, 2000) y porque durante el proceso de congelación los espermatozoides van a sufrir

daños tanto bioquímicos (ralentización metabólica) como estructurales (cambios en la estructura de las bicapas lipídicas de las membranas tanto plasmáticas como de los orgánulos), que finalmente van a afectar a la funcionalidad de los espermatozoides alterando su capacidad de fertilización. Estos daños se deben principalmente a cambios osmóticos y a la formación de hielo intracelular (Holt, 2000).

Los lípidos de las membranas, pasan de un estado de líquido a gel (forma rígida), siendo la temperatura de cambio de fase específica para cada una de las familias de lípidos. De esta forma, conforme se va produciendo el descenso de temperatura se van a ir formando agregados lipídicos de la misma familia, que van a alterar la asociación de los lípidos con las proteínas de membrana. Además, se forman huecos dando lugar a un desequilibrio iónico. Todo esto se traduce en un acúmulo de daños celulares durante todo el proceso de criopreservación que conlleva a una disminución de la fertilidad del semen congelado (Medeiros et al., 2002).

A los efectos de evitar daño espermático, al menos 2 estrategias han sido utilizadas con éxito: la centrifugación del eyaculado para eliminar el plasma seminal previo al uso de diluyentes convencionales (20% yema de huevo); el uso de diluyente con bajo porcentaje de yema (2%) aunque estos diluyentes pueden resultar en insuficiente protección de membranas durante la refrigeración (Evans and Maxwell, 1987; Chemineau y Cognie, 1991; Leboeuf et al., 2000).

Influencia del ambiente sobre la calidad del semen

El ambiente es un factor que influye sobre el potencial genético de los individuos determinando el período reproductivo y la intensidad del mismo (Chemineau, 1992). En cada especie, existen diferencias muy importantes entre

razas en su respuesta sexual al fotoperíodo, observándose una gran variabilidad en cuanto a la duración y las fechas de inicio y finalización de la actividad reproductiva tanto para hembras como los machos (Martínez Rojero et al., 2005)

De tal manera que existirían respuestas diferenciales del eje hipotálamo-hipófisis a los cambios lumínicos, que determinarían las diferencias en la longitud e intensidad de la estación reproductiva de las distintas razas (Fernández Abella, 1993).

La duración de la temporada de apareamiento, la libido y el comportamiento sexual y social son codificados por los factores genéticos y se modifican por la acción de los factores externos como el fotoperíodo, disponibilidad de alimento, temperatura, régimen pluvial y humedad. Existen numerosos antecedentes que demuestran una importante variación de la actividad reproductiva entre genotipos, en particular la libido. Esta variación implica que los aspectos reproductivos no pueden extrapolarse entre las distintas razas y que deben ser evaluados para cada sistema de producción (Pérez y Mateos, 1995)

Diferencias básicas entre el semen caprino con otros rumiantes

En el caso de los caprinos, la presencia de una fosfolipasa A en el plasma seminal, proveniente de las glándulas bulbouretrales, cataliza la hidrólisis de las lecitinas. Esto da como resultado la liberación de lisolecitinas y ácidos grasos al medio de dilución, los cuales resultan tóxicos para los espermatozoides se llamó a este compuesto “factor coagulador” (FC), debido al efecto que produce sobre la “yema de huevo” YH (Chauhan, 1990).

Cuando se usa la yema de huevo la lipasa “Egg Yolk Coagulating Enzyme” EYCE; cataliza la hidrólisis de la lecitina en ácidos grasos y lisolecitina (sustancia tóxica para los espermatozoides), causando una mayor fusogenicidad de las membranas, favoreciendo la inducción de la reacción acrosómica y la condensación de la cromatina.

Esto deriva en un mayor porcentaje de espermatozoides reaccionados y por tanto, con menor capacidad fecundante. Por otro lado, cuando en el medio de congelación se incluye la leche descremada una lipasa del plasma seminal cataliza la hidrólisis de los triglicéridos de la membrana plasmática y de la leche, dando lugar a ácidos grasos libres (como el oleico) que son muy tóxicos para los espermatozoides (Purdy, 2005).

Diluyentes del semen

Diluyente es una solución acuosa que nos permite incrementar el volumen del eyaculado, preservar las características del semen y mantener el nivel de fertilidad (Gadea, 2003).

Los diluyentes más utilizados son la combinación de leche descremada, glucosa y glicerol, y Tris, glucosa, ácido cítrico, yema y glicerol. (Ritar y Salamon, 1991).

Yema de huevo

La yema de huevo (YH) se utiliza ampliamente para la dilución del semen de diferentes especies. En bovinos constituye un clásico, dado el alto nivel de “factores de protección espermática” que se le atribuyen. Este efecto protector sería debido a la presencia de lipoproteínas, lecitinas y glucosa; lo que permitiría el mantenimiento de la viscosidad del semen, formaría un barniz

protector alrededor de los espermatozoides y proveería de nutrientes a los mismos (De la Vega, 1991).

6

Aparentemente, la acción de este FC se intensificaría con el paso del tiempo, por lo que la toxicidad no se manifiesta de inmediato sino que se produce en el transcurso del proceso. En tanto, el semen obtenido mediante electroeyaculación tendría un mayor contenido de FC esto seguramente por la menor concentración seminal en las muestras logradas por esta vía, determinada por la mayor secreción de las glándulas anexas. Así mismo, el contenido de FC durante la época reproductiva sería mayor que el resto del año (Evans, 1990).

Leche descremada

La leche descremada (LD) es otro compuesto clásico en la preparación de diluyentes para semen, considerado como uno de los que mayor perspectiva tendría para ser utilizado en caprinos. Se indica que el eyaculado caprino puede ser diluido directamente en leche descremada, previamente calentada en un baño de María a punto de ebullición durante 15 minutos y enfriada a temperatura ambiente. Este paso es necesario para inhibir la lactenina, presente en la leche y que resulta tóxica para los espermatozoides, cumplido el mismo se podría utilizar la leche sin inconvenientes. El proceso de calentamiento, además, promueve el desdoblamiento de la lactosa a glucosa y galactosa, que los espermatozoides pueden utilizar como fuente energética de mayor disponibilidad (Gómez, 1990).

Triladyl

Triladyl® es un buffer que contiene TRIS, Ácido cítrico, azúcar, Glicerina, agua purísima y antibióticos, de acuerdo a la Directiva 88/407 de la UE (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina). Triladyl® CSS no contiene antibióticos. Sin embargo, se dispone de un Cocktail de antibióticos en polvo (REF: 13500/0005), adecuado para el procesamiento de semen en dilución de 1 paso, de acuerdo a la norma CSS (Janett et al.,2005).

Skim milk extender

Fabricado en Alemania por la compañía Minitube. Es una solución de leche y antibióticos, concentrada para preparar un litro de diluyente para semen fresco (Catalogo Minitube. 2002).

Biladyl

Fabricado en Alemania por Minitube este es para preparación en dos pasos, está constituido por una fracción A y una B (con glicerol) y una C con antibióticos (Catalogo Minitube. 2002).

Aloe vera

Se ha propuesto que el gel aloe vera (*Aloe barbadensis*) promueve los procesos de cicatrización y regeneración celular, emoliente, antiinflamatorio, regenerador de tejidos, antibiótico, laxante y hasta inductor del estro y ovulación. Se mostró que 40 % de gel de aloe vera en combinación con 54 % de citrato de sodio al 3 %, obtuvo 49.5 % de motilidad progresiva al

descongelamiento y tasas satisfactorias de fertilidad con inseminación intrauterina, situándolo como un buen diluyente para semen ovino (Jiménez et al., 1995).

Agua de coco

Está compuesta de soluciones ácidas naturales y estériles, conteniendo sales, proteínas, vitaminas y minerales. En la fase de maduración inicial, esto es, el fruto verde (*Cocos nucifera*) con seis 16 meses de edad, el agua presenta osmolaridad entorno de 500 miliosmoles y pH 4.5. Silva (1990) evaluó in vitro el semen de ovinos, después de realizada la recolección, cada eyaculación fue dividida en dos porcentajes iguales, siendo una diluida en agua de coco con osmolaridad y pH corregidos y la otra fue diluida en leche en polvo glucosado, concluyendo que los diluyentes utilizados demostraron eficiencia como medio de dilución para semen de ovinos (Nunes y Fernández, 2001).

Crioprotectores del semen

Durante el proceso de crioconservación del semen, los espermatozoides son sometidos a condiciones de estrés (osmótico, mecánico y descenso de la temperatura; que van a derivar en una serie de cambios estructurales y funcionales que, en último término, van a producir una disminución de la calidad de los espermatozoides tras la descongelación. Estos daños se pueden minimizar haciendo uso de sustancias crioprotectoras y seleccionando los rangos y descensos de temperatura adecuados para cada especie. En los últimos años se ha conseguido minimizar los daños en los espermatozoides mediante la modificación de su membrana plasmática (Holt, 2000).

Los crioprotectores no permeables, no van a atravesar la membrana plasmática y se van a quedar en el espacio extracelular, modificando la membrana plasmática o disminuyendo la temperatura de congelación del

medio. Estudios recientes sugieren que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentes en la yema de huevo y las micelas de las caseínas y la lactosa presente en la leche descremada, son las principales responsables de disminuir los daños por enfriamiento y congelación ya que secuestran proteínas (BSP)* presentes en el plasma seminal que tras la eyaculación inducen la pérdida de colesterol y fosfolípidos de las membranas plasmáticas. En condiciones naturales, estas proteínas favorecen la capacitación en el tracto reproductivo de la hembra, pero durante el proceso de crioconservación va a derivar en un mayor porcentaje de espermatozoides con la membrana dañada (Bergeron y Manjunath, 2006).

Por otro lado, los crioprotectores permeables actúan disminuyendo la formación de hielo intracelular mediante la deshidratación de los espermatozoides, por mecanismos de difusión simple del agua desde el medio intracelular al extracelular por diferencias de presión osmótica. Además, los crioprotectores permeables provocan una reorganización de los lípidos y proteínas de membrana aumentando la fluidez de la misma y favoreciendo el paso de agua y por tanto, la deshidratación celular (Purdy, 2005).

En los protocolos de congelación de ganado caprino como crioprotector no permeable se suele incluir la yema de huevo en un 20 % con lavado del plasma seminal o en un 1,5 % sin lavado del plasma seminal (Salamon y Ritar, 1982).

Las lesiones celulares producidas por la congelación-descongelación del agua intracelular pueden reducirse mediante la incorporación de agentes crioprotectores. En general se trata de moléculas que atraviesan velozmente la membrana plasmática, acomplejan agua intracelular y disminuyen en tamaño y número los cristales de hielo. Se llevan a cabo ensayos con propanodiol, etilenglicol, sorbitol, manitol, inositol, adonitol, DMSO, prolina, glicina, glicerol y otros con distintos resultados (Aisen, 2004).

El glicerol es el crioprotector permeable más comúnmente utilizado a una concentración óptima entre 4 y 7 %. Asimismo, en caprino para la congelación en caja de poliestireno expandido, se recomienda una altura de 3 - 5 cm sobre vapor de nitrógeno líquido durante 4 - 8 minutos (Purdy, 2005).

La membrana plasmática de los espermatozoides juega un papel muy importante en el mantenimiento de la estructura y funcionalidad celular, y constituye una de las estructuras más dañadas durante la congelación. Existen diferencias entre especies en cuanto a termorresistencia, debidas principalmente a diferencias bioquímicas en el ratio colesterol/fosfolípidos y ratio ácidos grasos poliinsaturados/saturados en la composición de sus membranas, siendo lo ideal un ratio elevado de colesterol/fosfolípidos y un ratio bajo en poliinsaturados/saturados, como se indica en la introducción. Por otra parte, durante la crioconservación la membrana plasmática de los espermatozoides sufre cambios muy similares al estadio de la capacitación (Gillan et al., 1997).

HIPOTESIS

El retiro del plasma seminal del semen caprino presenta una mejor calidad espermática al descongelamiento de nitrógeno líquido.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar diferentes criopreservadores comerciales para la congelación de semen caprino con semen completo, sin líquido seminal y determinar con cuales obtienen mejores resultados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar criopreservadores comerciales para determinar con cual se obtienen mejor motilidad posterior al descongelado
- Congelar el semen con líquido seminal y evaluar resultados posterior a la descongelación
- Congelar semen sin líquido seminal y evaluar resultados posterior a la descongelación
- Realizar prueba de termo resistencia a 37 grados centígrados y evaluar la viabilidad del semen
- Realizar prueba de conservación seminal a 4 grados centígrados y evaluar la viabilidad del semen
- Realizar prueba de Eosina/Nigrosina para evaluar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el Centro de Reproducción Caprina y en el Laboratorio de Procesamiento de Semen e Inseminación Artificial del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali B.C. México. La ubicación geográfica del lugar es entre los paralelos 30° 51' y 32° 44' de latitud norte; los meridianos 114° 43' y 115° 51' de longitud oeste; altitud entre -3 y 1 900 m. El clima es muy seco muy cálido y cálido (51.62%), muy seco semicálido (34.70%), seco mediterráneo templado (3.59%), muy seco templado (9.17%), semifrío subhúmedo con lluvias en invierno (0.83%) y templado subhúmedo con lluvias en invierno (0.09%). Con una precipitación pluvial anual de menos de 100 - 400 mm. (INEGI,2015)

Descripción de la población

Se utilizaron 4 sementales caprinos, 2 F1 Murciano Granadin y 2 Criollos, los cuales se alojaron en corraletas individuales cuyas medidas son 3m de largo por 3 metros de ancho con una superficie de 9 m² por animal. El suministro de agua fue a libre acceso los cuales se les proporcionaron en bebederos individuales. La alimentación fue a base de alfalfa la cual se administró en dos periodos mañana/tarde, ofreciéndoles el 3% del peso vivo del animal, así como suplementación con bloques minerales.

Recolección del semen

Las muestras se tomaron siguiendo el sistema 2 veces por día/ dos veces por semana, de cada semental se obtuvo el eyaculado mediante el uso del electroeyaculador Electroyac V[®].

Semana 1	Días de Muestreo	Semana 2	Días de muestreo
Lunes	M ₁ -M ₂	Lunes	M ₁ -M ₂
Martes	D	Martes	D
Miércoles	D	Miércoles	D
Jueves	M ₁ -M ₂	Jueves	M ₁ -M ₂
Viernes	D	Viernes	D
Sábado	D	Sábado	D
domingo	D	Domingo	D

Cuadro 1 Calendario de toma de muestras

Evaluación del semen

La valoración del semen busca determinar la calidad del mismo, haciéndose una visualización macroscópica del volumen y color. La motilidad masal y porcentual se realiza a través de un microscopio.

Volumen: El volumen del semen se realiza utilizando un tubo de recolección graduado. El volumen de eyaculado oscila entre 0.8-1.5ml, que

varía según la especie, edad, raza, condición corporal, método de recolección, frecuencia de recolección y destreza del operador.

Aspecto: el aspecto se observara a simple vista. El semen eyaculado es un líquido denso, para poder ser aceptado deben presentar un aspecto blanco cremoso, ligeramente amarillento y debe estar libre de restos de orina y sangre.

Motilidad Masal

La Motilidad Masal es el resultado de la concentración espermática, el porcentaje de células con movimientos progresivos y velocidad de movimiento de los espermatozoides.

Una vez homogenizada la muestra por agitación del tubo, se toman 10 microlitros de semen con una pipeta y se coloca sobre un portaobjetos atemperado en la platina eléctrica y sin cubreobjetos. La observación se realiza con semen sin diluir en el microscopio con el objetivo de 10X. se observa la calidad seminal por la velocidad con que se hacen y deshacen las ondas. La motilidad se estima por el vigor del movimiento de las ondas en una escala del 0 al 5 (0 mínimo y 5 máximo).

Motilidad Porcentual

La motilidad Porcentual, es el resultado de la evaluación del movimiento progresivo del espermatozoide y de los cambios en su motilidad. Para su valoración se coloca en un portaobjetos atemperado una muestra de 10 microlitros de semen diluido y se le coloca un portaobjetos encima. La muestra

se observara al microscopio con el objetivo de 45X. éste determina en una escala del 0 al 100%.

Asignación de tratamientos

Para la presente investigación los tratamientos a evaluar se distribuyeron de la siguiente manera; T1 Optydil[®] con semen completo, T2 Andromed[®] con semen completo, T3 Optydil[®] con semen sin líquido seminal, T4 Andromed[®] con semen sin líquido seminal. Esto debido a que diversas publicaciones mencionan que la enzima causante de la muerte espermática que reacciona con la yema de huevo está presente en el líquido seminal. Del semen obtenido de los cuatro sementales se realizó un poll, posterior se dividió en 4 muestras para su asignación de tratamientos.

Las muestras que fueron utilizadas para congelar semen sin líquido seminal fueron centrifugadas a 800 RPM por 20 minutos, en una centrifuga Garver Electrige[®] sin la función de atemperar. Se utilizaron tubos falcón graduados de 10 ml para colocar las muestras, una vez concluido el tiempo de centrifugado se retiró el sobrenadante por decantación y se procedió a realizar la dilución con su criopreservador correspondiente, ya fuese Andromed[®] u Optydil[®].

Modelo Estadístico

Las muestras de semen obtenido fueron Criopreservadas con 2 diferentes medios comerciales, Andromed[®] y Optidyl[®]. Los resultados obtenidos de la valoración seminal mencionados anteriormente fueron comparados para determinar cuál es el criopreservador que mejor se adapta a las condiciones del

entorno y así poder emitir un juicio ya que actualmente no se cuentan con estudios realizados en el área, puesto que en los caprinos no está definido un protocolo de crío preservación. Para la prueba de evaluación de motilidad al descongelado se utilizó una prueba de igualdad de varianzas con una prueba F, posteriormente los datos fueron analizados con una prueba T de igualdad de medias. Para las pruebas posteriores se optó por usar Prueba de Wilcoxon Signed Rank Test de todos los posibles vectores de diferencias.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

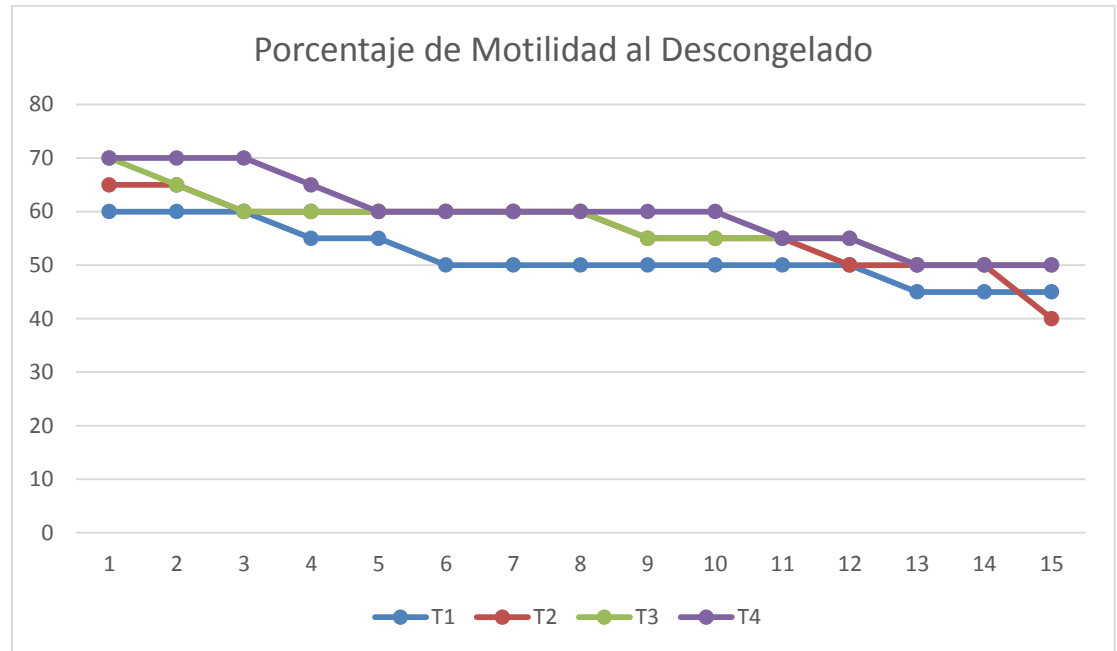


Figura 1 Motilidad porcentual de las muestras después de ser descongeladas de nitrógeno líquido

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos de la motilidad porcentual al descongelado de las muestras de nitrógeno líquido se optó por primero realizar una prueba de igualdad de varianzas con una prueba F, posteriormente los datos fueron analizados con una prueba T de igualdad de medias, donde se encontraron los siguientes resultados.

	Prueba F		Prueba T	
Pares	Est F	Valor P	Est T	Valor P
T1 vs T2	0.61497	0.3739	-2.1314	0.04197
T1 vs T3	0.8646	0.7894	-3.0241	0.00529
T1 vs T4	0.5693	0.3036	-3.5664	0.00132
T2 vs T3	1.406	0.5321	-0.59161	0.5589
T2 vs T4	0.92574	0.8873	-1.3414	0.1906
T3 vs T4	0.65842	0.4441	-0.86732	0.3931

Cuadro 2 Pruebas de igualdad de medias para todos los posibles pares de vectores

La comparación de medias de los tratamientos T1 Vs T2, T1 Vs T3, T1 Vs T4 arrojaron que hay diferencia estadística entre ellos, para la comparación de T2 Vs T3, T2 Vs T4 y T3 Vs T4 resultó que no hay diferencia estadística entre ellos. Por lo que observando el comportamiento de los datos podemos concluir que el semen congelado en nitrógeno líquido con Optydil[®] completo presenta estadísticamente menos preservación de porcentaje de motilidad que el Andromed[®] completo, Optydil[®] sin líquido seminal y Andromed[®] sin líquido seminal. Curry (2000) reportó porcentajes de sobrevivencia espermática del 50%, por lo que en el presente estudio se puede ver que se coincide con T1, sin embargo para T2, T3 y T4 se obtuvieron resultados superiores. Leboeuf y colaboradores (2000) publicó que en el líquido seminal del semen caprino está presente una enzima que provoca muerte espermática al reaccionar con criopreservadores a base de yema de huevo, sin embargo podemos observar que T1 fue semen completo congelado con Optydil y arrojó un promedio de 51.66% de motilidad al descongelado. De igual manera Pudry (2005) reportó datos similares a los de Leboeuf. Si se va usar Optydil[®] como criopreservador para congelar semen en nitrógeno líquido se recomienda eliminar el líquido seminal, pues preservará aún más la motilidad al descongelado. Estadísticamente las muestras congeladas en nitrógeno líquido con Optydil[®] sin líquido seminal, Andromed[®] completo y Andromed[®] sin líquido seminal presentan el mismo porcentaje de preservación de la motilidad al descongelado.

Prueba de Termoresistencia a 37 grados centígrados

Una vez congeladas las muestras en nitrógeno líquido a -167 grados centígrados fueron descongeladas a 37 grados por 60 segundos, posteriormente se evaluó la motilidad porcentual en microscopio con el objetivo de 45X, después las muestras fueron colocadas en una platina previamente atemperada a 37 grados, de donde se obtuvieron muestras para su evaluación a los 15, 30, 60 minutos posteriores al descongelado.

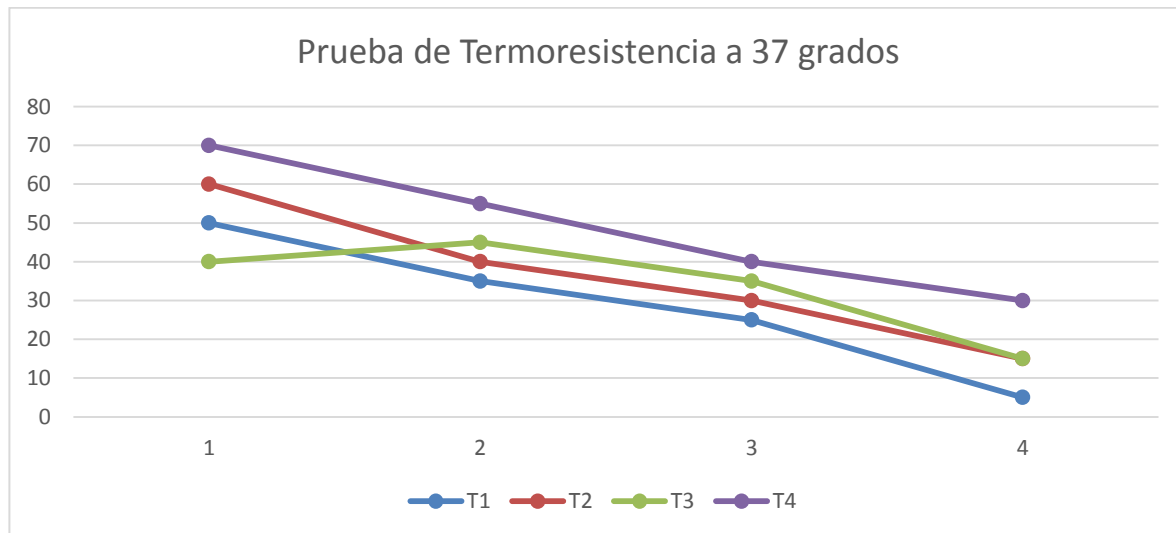


Figura 2 Motilidad porcentual e las muestras en la prueba de termoresistencia a los 37 grados centígrados

Para la prueba de termoresistencia a 37 grados centígrados se optó por evaluar los resultados con la prueba no paramétrica de Wilcoxon Signed Rank Test de todos los posibles vectores de diferencias, encontrando los siguientes resultados.

Pares de medias	Estadística V	Valor P
T1-T2	0	0.125
T1-T3	2.5	0.625
T1-T4	0	0.125
T2-T3	3	1
T2-T4	0	0.125
T3-T4	0	0.125

Cuadro 3 Prueba de Wilcoxon Signed Rank Test de todos los posibles vectores de diferencias para termoresistencia a 37 grados centígrados

Para la prueba de termoresistencia a 37 grados centígrados tanto Optydil[®] completo, Andromed[®] completo, Optydil[®] sin líquido seminal y Andromed[®] sin líquido seminal, estadísticamente producen el mismo resultado de preservación de la motilidad en la prueba. Dado los resultados de este ejercicio, si se debe elegir un criopreservador es recomendable utilizar T4 (Andromed[®] sin líquido seminal), debido a que aun que los cuatro producen estadísticamente el mismo resultado de la gráfica podemos ver que T4 fue el que produjo mejores resultados de evaluación de motilidad. Rodríguez y colaboradores (2008) reportaron que si el semen se va a utilizar en fresco no deben de pasar más de 3 horas, sin embargo nosotros podemos observar que para la presente investigación el semen no debe de sobrepasar los 30 minutos.

Prueba de Resistencia a 4 grados centígrados

Una vez recolectado el semen por medio del electro eyaculador Electrojac 5[®] las muestras fueron homogenizadas en un pool para eliminar el efecto macho, posteriormente se evaluó su motilidad masal y porcentual, una vez obtenido estos valores satisfactorios las muestras se dividieron para ser asignadas a cada tratamiento a evaluar. Primeramente se evaluaron los

tratamientos en fresco a 4 grados centígrados, posteriormente a 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas respectivamente.

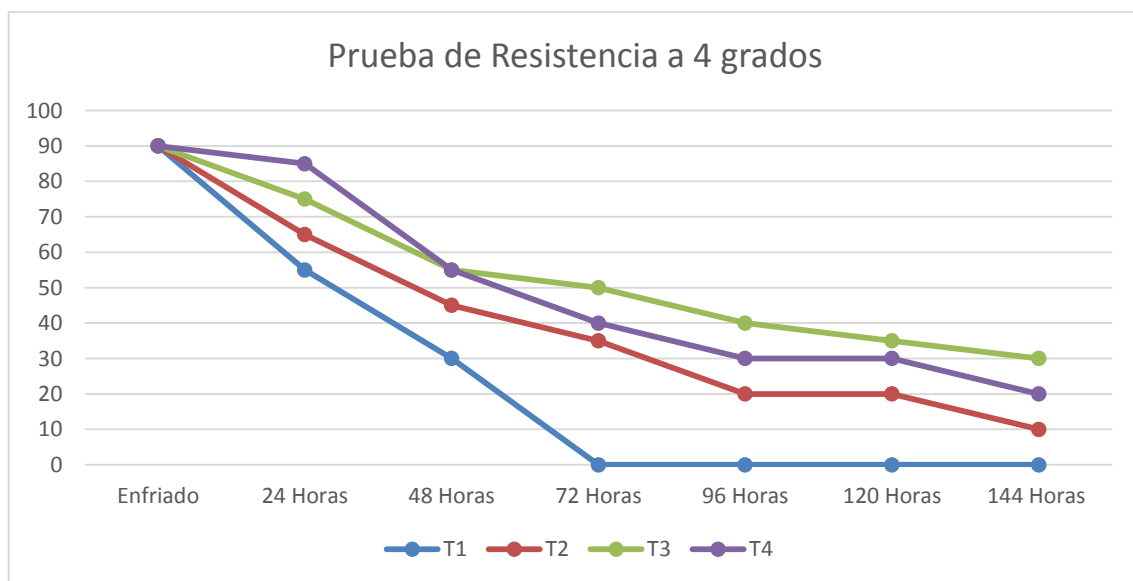


Figura 3 Motilidad masal de las muestras en la prueba de resistencia a 4 grados centígrados

Para la prueba de conservación de material seminal a 4 grados centígrados se optó por evaluar los resultados con la prueba de Wilcoxon Signed Rank Test de todos los posibles vectores de diferencias, encontrando los siguientes resultados.

Pares de Medias	Estadística V	Valor P
T1-T2	0	0.03125
T1-T3	0	0.03125
T1-T4	0	0.03125
T2-T3	0	0.03125
T2-T4	0	0.03125
T3-T4	11.5	0.375

Cuadro 4 Prueba de Wilcoxon Signed Rank Test de todos los posibles vectores de diferencias para preservación de semen cuatro grados centígrados.

A partir de estos resultados podemos concluir que Optydi[®] centrifugado y Andromed[®] centrifugado producen estadísticamente el mismo resultado. Optydil[®] centrifugado y Andromed[®] centrifugado, ambos producen mejores resultados que Optydi[®] completo y Andromed[®] completo. Optydil[®] completo y Andromed[®] completo no son recomendados para uso a 4 grados si el semen se va a utilizar después de 24 horas, para este caso se recomienda la congelación en nitrógeno líquido de las muestras. Rodríguez y colaboradores (2008) reportaron que si el semen se va utilizar en fresco no debe ser posterior a 24 horas coincidiendo con T1 y T2, sin embargo para T3 y T4 el semen puede ser utilizado hasta las 72 horas.

Si el semen se va utilizar refrigerado por no más de 24 horas posteriores a su colección y dilución, se puede utilizar cualquiera de los 4 tratamientos, sin embargo los tratamientos que más preservaron su motilidad fueron T3 (Optydil[®] centrifugado) y T4 (Andromed[®] centrifugado) siendo viables para su utilización hasta las 96 horas post colección y dilución.

Prueba de Eosina/Nigrosina

Una vez descongeladas las muestras de cada tratamiento fueron sometidas a la prueba de Eosina/Nigrosina para obtener el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos. La prueba consiste en colocar una muestra de semen sobre una solución de 50/50 de Eosina/Nigrosina, una vez homogenizada la muestra se procede hacer un barrido en el portaobjetos, se deja reposar la muestra para que se seque en una platina atemperada a 37 grados y se observa al microscopio en el objetivo de 45 X. Los espermatozoides que tomen coloración es indicativo que sufrieron daño en la membrana por lo cual han absorbido el colorante y están muertos. Los espermatozoides que no tomen coloración indican que su membrana está intacta por lo que están vivos.

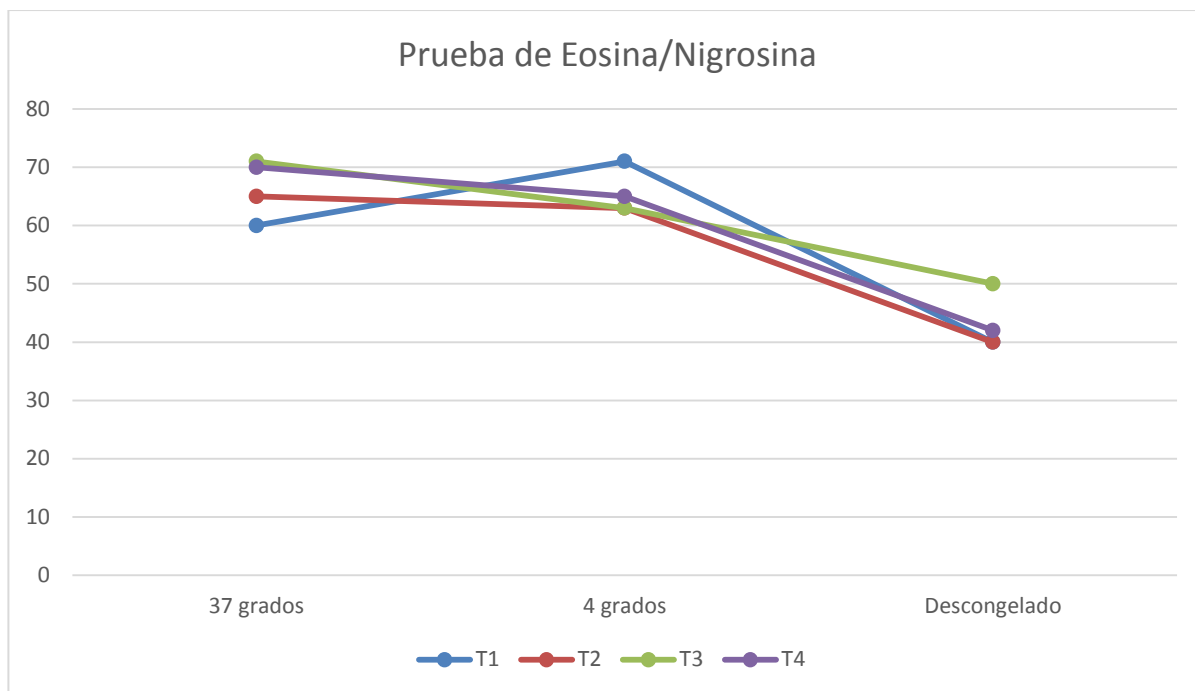


Figura 4 Porcentaje de espermatozoides vivos de las muestras sometidas a la prueba de Eosina/Nigrosina, evaluadas a 37 grados centígrados, 4 grados centígrados y descongeladas de nitrógeno líquido

Para la prueba de Eosina/Nigrosina la cual evalúa el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos se utilizó la prueba de Wilcoxon Signed Rank Test de todos los posibles vectores de diferencias, encontrando los siguientes resultados.

Pares de Medias	Estadística V	Valor P
T1-T2	2	1
T1-T3	1	0.5
T1-T4	2	0.75
T2-T3	0	0.5
T2-T4	0	0.25
T3-T4	1	0.5

Cuadro 5 Prueba de Wilcoxon Signed Rank Test de todos los posibles vectores de diferencias para prueba de Eosina/Nigrosina.

Estadísticamente los cuatro tratamientos T1 (Optydil[®] completo), T2 (Andromed[®] completo), T3 (Optydil[®] sin líquido seminal) y T4 (Andromed[®] sin líquido seminal) producen el mismo resultado, sin embargo para estos datos en

particular Optydil[®] sin líquido seminal y Andromed[®] sin líquido seminal son más estables y se mantuvieron con el mayor porcentaje de espermatozoides vivos en los extremos. Rubio y colaboradores (2009) reportaron resultados similares a los obtenidos en este estudio en cuanto a porcentaje de espermatozoides vivos al descongelado de las muestras, siendo estas de origen bovino.

CONCLUSIÓN

Una vez analizados los datos podemos observar que el efecto del retiro del plasma seminal si infiere sobre la calidad espermática del semen caprino congelado en nitrógeno líquido, particularmente al momento de utilizar un criopreservador a base de yema de huevo, en el caso del criopreservador sin yema de huevo el efecto del retiro líquido seminal no es estadísticamente significativo.

Por lo que podemos concluir que si se va a utilizar un criopreservador a base de yema de huevo es recomendable realizar el retiro del plasma seminal para su posterior congelación. En el caso del crioprotector que no contiene yema de huevo estadísticamente es igual si se congela con o sin plasma seminal, sin embargo dado el comportamiento de los resultados, si tenemos que elegir uno, se recomienda el uso de Andromed[®] sin plasma seminal ya que presenta mejores valores a lo largo de las pruebas realizadas.

Con la prueba de Eosina/Nigrosina podemos comprobar los valores obtenidos de motilidad dentro de las otras evaluaciones con el conteo de espermatozoides vivos, donde nos arroja que estadísticamente los cuatro tratamientos son iguales, sin embargo, los tratamientos que se congelaron sin plasma seminal arrojan valores más estables y se mantuvieron con el mayor porcentaje de espermatozoides vivos en los extremos.

LITERATURA CITADA

- Aisen E. G., Reproduccion ovina y caprina (1ra Ed.). Inter medica S.A.I.C.I., Buenos Aires, Argentina.
- Bergeron A., Manjunath P., 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development* 73, 1338-1344.
- Catalogo Minitube para inseminación artificial en pequeños rumiantes. 2002.
- Chauhan M.S. and Ananad S. 1990. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Teriogenology* 34 (5): 1003-1013.
- Chemineau P, Cognie Y. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. Rome: FAO, 1991
- Chemineau, P. 1992. Medio ambiente y reproducción animal. *Rev Mundial Zootecn, FAO*, 77: 2-14.
- Curry M. R., 2000. Crypreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction* 5, 46-52
- De la Vega A.C. y Wilde O.R. 1991. Fundamentos biológicos de la criopreservación. *Rev.Arg. Prod. Animal* 11(2): 151-165.
- Evans G, Maxwell WM. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Sydney, Australia: Butterworths, 1987.
- Evans G. y Maxwell W.M. 1990. Inseminación artificial en ovejas y cabras. Acribia, Zaragoza. 192 p.

- Fernández Abella, D. 1993. Principios de fisiología reproductiva ovina. Agropecuaria Hemisferio Sur SRL. Universidad de la República. Uruguay. 247 pp.
- French M.H. 1970. Observaciones sobre cabras. FAO: Estudios Agropecuarios 80. 234 p.
- Gadea J., Spanish Journal of Agricultural research. 2003; 1 (2): pp. 17-27
- Gómez R.N., García C.J. y Gómez R.D. 1990. Efecto de tres niveles de fructuosa y cuatro niveles de glicerol en la motilidad postdescongelamiento de semen caprino. Memo. VI Reunión Nac. Sobre Caprinocultura (San Luis de Potosí). Ed. Ortíz Flores A. et al. Campo Exp. Zacatecas, México. p: 92-94.
- Holt W.V., 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology 53, 47-58.
- Janett F., Keo S., Bollwein H., Hässig M., Thun R. (2004): Comparison of AndroMed®, Bioxcell and Triladyl® extender for cryopreservation of bull semen. Conference on Physiology and Pathology of Reproduction; Zurich, February 2005.
- Jiménez, L., H. Sumano y G. Mateos. 1995. Uso de sábila (aloe vera) para el tratamiento de laceraciones y grietas en tetas de vacas lecheras. Veterinaria México. 26:271-272.
- Leboeuf, B, Restall B, Salamon, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Anim Reprod Sci, v.62, p.113-141, 2000.

- Martínez Rojero, R.D., Mastache Lagunas, A.A., Reyna Santamaría, L. y Valencia Méndez, J. 2005. Comportamiento reproductivo de tres razas caprinas bajo condiciones de trópico seco en Guerrero, México. *Vet Méx*, 36: 147- 157.
- Medeiros C.M.O., Forell F., Oliveira A.T.D., Rodrigues J.L., 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology* 57, 327-344.
- Nunes, J. F y D. R. P Fernández. 2001. *Biotécnicas de la Reproducción Caprina y Ovina*. Editorial Fortaleza. Ceará, Brasil. 105 pp.
- Pérez, B. and Mateos, E. 1995. Seasonal variations in plasma testosterone levels in Verata and Malagueña bucks. *Small Ruminant Res*, 15:155-162.
- Purdy P. H., 2005. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*
- Ritar A.J., Salamon S., 1982. Effects of plasma seminal and its removal and of egg yolk in the diluents on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* 35, 305-312
- Ritar A. J., Salamon S. 1991 Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. *Small Ruminant Research* 4: 29-37
- Rodríguez A. F., Ávila C. C. y Anchondo G. A., 2008. Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Agrociencia* 42: 399-406. 2008.

Rubio G. J. Quintero M. A. Y González V. D., 2009. Efecto de la criopreservacion sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XIX, N° 4, 382 – 389.