



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL**  
**UNIDAD DE REPRODUCCIÓN Y OBSTETRICIA**

**TESIS DOCTORAL**

**“RESPUESTA A LA CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN  
DEL ESPERMA DE MACHO CABRÍO”**

*Jesús Manuel Dorado Martín*

*Córdoba, Julio de 2003.*

**UNIVERSIDAD DE CORDOBA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL**  
**UNIDAD DE REPRODUCCIÓN Y OBSTETRICIA**

“RESPUESTA A LA CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN  
DEL ESPERMA DE MACHO CABRÍO”

Memoria presentada por el Licenciado  
Jesús Manuel Dorado Martín para optar  
al grado de Doctor en Veterinaria.

**Año 2003.**

**UNIDAD DE REPRODUCCIÓN Y OBSTETRICIA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**UNIVERSIDAD DE CORDOBA**

**DRA. INMACULADA RODRÍGUEZ ARTÍLES**, Profesora Titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad de Córdoba

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada: “**RESPUESTA A LA CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN DEL ESPERMA DE MACHO CABRÍO**”, de la que es autor el Licenciado en Veterinaria **D. Jesús Manuel Dorado Martín**, ha sido realizada en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Córdoba, bajo mi dirección y asesoramiento, se considera finalizada y puede ser presentada para su mantenimiento y defensa pública ante el Tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo en Córdoba a 11 de junio de 2003.

Fdo: Dra. Inmaculada Rodríguez Artíles.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora de tesis, la Doctora Dña. Inmaculada Rodríguez Artiles por confiar en mí desde el principio e iniciarme en el mundo de la investigación, por su ayuda y dedicación durante todos estos años. Porque este trabajo de investigación no se habría llevado a cabo sin su apoyo incondicional.

Al Doctor D. Carlos C. Pérez Marín por su inestimable apoyo y sus valiosos consejos que me ayudaron siempre a superar los momentos difíciles.

A D. Manuel Hidalgo Prieto por todos estos años de trabajo en común, por su apoyo diario y colaboración desinteresada. Por la amistad que nos une después de estos años.

A mis compañeros de Departamento Isaac y Pepe por su ayuda inestimable y colaboración continua.

Al Doctor D. Manuel Sánchez Rodríguez como Presidente de ACRIFLOR por haber puesto a mi disposición los animales necesarios para el desarrollo de este trabajo.

A D. Daniel López Baldán veterinario de ACRIFLOR y a Luis, Antonio y Pablo empleados del CIDG de la Diputación Provincial de Córdoba por su inestimable colaboración.

Y a todos aquellos que en algún momento tomaron parte en este trabajo, ¡muchas gracias!.

A mi familia.

A Carmen.

## ÍNDICES

## ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	20
2	OBJETIVOS.....	24
3	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	26
3.1	FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN ESPERMÁTICA DEL MACHO CABRÍO . .....	27
3.2	PRUEBAS DE VALORACIÓN DE LA CALIDAD DEL ESPERMA .....	29
3.3	CONGELACIÓN DEL ESPERMA .....	35
	3.3.1 Ventajas e inconvenientes de la congelación de esperma .....	35
	3.3.2 Factores que influyen en la congelabilidad del esperma de macho cabrío.	36
	3.3.3 Método de congelación y descongelación.....	42
	3.3.3.1 Diluyentes empleados en la congelación-descongelación del esperma caprino .....	42
	3.3.3.2 Papel de la yema de huevo en la congelación del esperma caprino ...	43
	3.3.3.3 Efecto de la separación del plasma seminal sobre el grado de congelabilidad del esperma caprino .....	44
	3.3.3.4 Adición de antibióticos a las soluciones diluyoconservadoras.....	47
	3.3.3.5 Características de las dosis para espermatización manual.....	48
	3.3.3.6 Adición de crioprotectores a los diluyentes del esperma caprino .....	49
	3.3.3.7 Proceso de equilibrado .....	52
	3.3.3.8 Método de envasado .....	53
	3.3.3.9 Proceso de congelación .....	53
	3.3.3.10 Proceso de descongelación .....	54
	3.3.4 Valoración del esperma congelado-descongelado.....	56
3.4	ESPERMATIZACIÓN MANUAL (EM) CON ESPERMA CONGELADO-DESCONGELADO	57
4	MATERIAL Y MÉTODOS .....	62
4.1	MATERIAL .....	63
	4.1.1 Animales.....	63
	4.1.1.1 Machos .....	64

4.1.1.2	Hembras.....	64
4.1.2	Instalaciones .....	64
4.1.3	Recogida de esperma.....	65
4.1.4	Valoración espermática .....	65
4.1.5	Dilución, procesado y refrigeración del esperma .....	66
4.1.6	Envasado.....	68
4.1.7	Congelación-descongelación.....	69
4.1.8	Almacenamiento y mantenimiento del banco de esperma .....	70
4.1.9	Espermatización Manual (EM).....	70
4.1.9.1	Inducción y sincronización celos.....	70
4.1.9.2	Espermatización manual vía cervical: .....	70
4.1.10	Diagnóstico ecográfico de gestación.....	71
4.1.11	Estudio estadístico .....	71
4.1.11.1	Hardware. ....	71
4.1.11.2	Software.....	72
4.2	MÉTODOS .....	73
4.2.1	Entrenamiento y selección de los donantes de esperma.....	73
4.2.2	Recolección de esperma .....	74
4.2.3	Valoración del esperma .....	74
4.2.3.1	Valoración macroscópica .....	75
4.2.3.2	Valoración microscópica .....	75
4.2.3.2.1	Valoración del movimiento .....	75
4.2.3.2.1.1	Preparación y almacenamiento de los diluyentes.....	75
4.2.3.2.1.2	Método de valoración del movimiento.....	75
4.2.3.2.2	Concentración.....	76
4.2.3.2.3	Morfología espermática.....	77
4.2.3.2.3.1	Morfología en esperma precongelado .....	77
4.2.3.2.3.2	A partir del esperma congelado-descongelado.....	77
4.2.3.2.4	Integridad de acrosoma.....	77

4.2.4	Congelación del esperma.....	78
4.2.4.1	Preparación y almacenamiento de los diluyentes.....	78
4.2.4.2	Método de congelación. Separación del plasma seminal mediante centrifugación.....	79
4.2.4.2.1	Preparación y almacenamiento del diluyente de centrifugación ..	79
4.2.4.2.2	Método de centrifugación.....	79
4.2.4.3	Cálculo de las dosis.....	79
4.2.4.4	Equilibrado.....	80
4.2.4.5	Etiquetado.....	80
4.2.4.6	Envasado y Sellado.....	80
4.2.4.7	Congelación.....	80
4.2.4.8	Almacenamiento.....	80
4.2.5	Descongelación.....	81
4.2.6	Creación y mantenimiento del banco de esperma.....	81
4.2.7	Espermatización manual (EM).....	82
4.2.7.1	Selección de las hembras.....	82
4.2.7.2	Tratamiento de inducción y sincronización de celos.....	82
4.2.7.3	Control de salida a celo.....	83
4.2.7.4	Técnica de espermatización manual vía cervical.....	83
4.2.7.5	Diagnóstico ecográfico de gestación.....	83
4.2.7.6	Control de parideras.....	84
4.2.8	Determinación de la temperatura ambiental y fotoperiodo.....	84
4.2.9	Tratamiento estadístico de los datos.....	84
5	RESULTADOS.....	85
5.1	RESULTADOS DEL PROGRAMA DE ENTRENAMIENTO Y SELECCIÓN DE LOS DONANTES DE ESPERMA.....	86

5.2	RESULTADOS OBTENIDOS EN LA VALORACIÓN DEL ESPERMA FRESCO .....	87
	5.2.1 Volumen eyaculado .....	87
	5.2.2 Concentración espermática.....	90
	5.2.3 Movimiento espermático .....	93
	5.2.4 Morfología espermática.....	97
	5.2.5 Integridad de acrosoma.....	100
	5.2.6 Correlación entre los parámetros espermáticos estudiados .....	103
5.3	RESULTADOS OBTENIDOS EN LA VALORACIÓN DEL ESPERMA CONGELADO-DESCONGELADO .....	105
	5.3.1 Movimiento post-descongelación.....	105
	5.3.2 Resultados de morfología espermática a la descongelación.....	118
	5.3.3 Resultados de integridad de acrosoma a la descongelación .....	125
	5.3.4 Correlación entre los distintos parámetros espermáticos a la descongelación.....	130
5.4	RESULTADOS DE LA ESPERMATIZACIÓN MANUAL (EM) .....	132
	5.4.1 Resultados obtenidos durante el periodo de control de salida a celo .....	132
	5.4.2 Espermatación manual vía cervical .....	134
	5.4.2.1 Dosis empleadas .....	134
	5.4.2.2 Técnica de EM.....	134
	5.4.3 Diagnóstico ecográfico de gestación .....	135
	5.4.4 Fertilidad.....	135
	5.4.5 Control de parideras .....	137
6	DISCUSIÓN.....	138
6.1	PROGRAMA DE ENTRENAMIENTO Y SELECCIÓN DE LOS DONANTES DE ESPERMA	139
6.2	INFLUENCIA DE LA ESTACIÓN Y FACTORES CLIMÁTICOS SOBRE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DEL ESPERMA.....	139
6.3	CONGELABILIDAD DEL ESPERMA .....	146
6.4	CAPACIDAD FECUNDANTE DEL ESPERMA CONGELADO-DESCONGELADO .....	155
7	CONCLUSIONES.....	160
8	RESUMEN .....	162

9	SUMMARY .....	164
10	BIBLIOGRAFÍA .....	166
11	ABREVIATURAS .....	184
12	ANEXO 1 .....	186
13	ANEXO 2 .....	192

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Temperatura ambiental media, máxima y mínima, pluviometría y horas de luz según la estación de año. ....	63
Tabla 2. Resultados del programa de entrenamiento y selección de los donantes de esperma.....	86
Tabla 3. Volumen medio eyaculado (VE) durante el periodo de estudio por cada macho .....	87
Tabla 4. Volumen medio eyaculado (VE) durante las distintas estaciones del año por ambos machos . ....	88
Tabla 5. Concentración espermática media (C) durante el periodo de estudio para cada macho . ....	90
Tabla 6. Concentración espermática media (C) en cada estación del año por ambos machos.....	91
Tabla 7. MT y MRP medios durante el periodo de estudio para cada macho.....	94
Tabla 8. MT y MRP medios durante las distintas estaciones del año por ambos machos .....	94
Tabla 9. Morfología espermática (N) durante el periodo de estudio para cada macho..	97
Tabla 10. Morfología espermática en cada estación del año por ambos machos.....	97
Tabla 11. Integridad de acrosoma (I) durante el periodo de estudio por cada macho..	100
Tabla 12. Integridad de acrosoma (I) en cada estación del año por ambos machos....	100
Tabla 13. Índices de correlación entre los parámetros seminales y de éstos con el individuo (macho), estación, mes, fotoperiodo (FP) y temperatura ambiental media (T <sup>a</sup> ). ....	104
Tabla 14. Resultados del porcentaje de MT obtenido en la valoración de esperma precongelado y descongelado para cada macho y diluyente . ....	106
Tabla 15. Resultados del movimiento rápido progresivo medio obtenido en la valoración de esperma precongelado y descongelado durante los catorce meses de estudio para cada macho y diluyente . ....	106
Tabla 16. Respuesta del movimiento espermático a la congelación-descongelación según la estación del año por individuo y diluyente .....	109

Tabla 17. Respuesta del movimiento espermático a la congelación-descongelación según la estación del año por individuo y diluyente .....	109
Tabla 18. Resultados de los porcentajes de morfología espermática obtenidos antes y después de congelar para cada macho y diluyente .....	118
Tabla 19. Porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales a la pre congelación y descongelación según la estación del año por individuo y diluyente .	121
Tabla 20. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro a la pre congelación y descongelación según la estación del año por individuo y diluyente .....	121
Tabla 21. Resultados de integridad de acrosoma obtenidos en la valoración de esperma pre congelado y descongelado para cada macho y diluyente .....	125
Tabla 22. Índices de correlación entre parámetros seminales a la descongelación y de éstos con el individuo, estación, mes, diluyente, fotoperiodo y temperatura ambiental media. ....	131
Tabla 23. Resultados de salida a celo de las cabras sincronizadas con esponjas vaginales de 45 mg de FGA durante 11 días y una dosis de eCG y Cloprostenol el día 9. ....	132
Tabla 24. Resultados de fertilidad (%) obtenidos durante el estudio en cada macho. .	136
Tabla 25. Resultados de fertilidad (%) obtenidos durante el estudio para cada diluyente. ....	136
Tabla 26: Ficha de entrenamiento para el salto en vagina artificial. ....	187
Tabla 27: Ficha de trabajo para la valoración de la morfología espermática y de la integridad de acrosoma. ....	188
Tabla 28: Ficha de trabajo para la congelación de esperma. ....	189
Tabla 29: Ficha de trabajo para la descongelación de esperma. ....	190
Tabla 30: Ficha de trabajo para el control de salida a celo. ....	191
Tabla 31: Datos referentes al tratamiento de sincronización de las hembras: Aplicación de esponjas vaginales de 45 mg FGA.(Intervet®) durante 11 días. ....	193
Tabla 32: Control de salida a celo tras la retirada de las esponja vaginales. ....	194
Tabla 33: Características de las dosis de esperma congelado-descongelado empleadas en la espermatización manual vía cervical de las cabras sincronizadas y resultados del diagnóstico de gestación a los 25 días. ....	196

Tabla 34: Datos referentes a las espermatizaciones manuales realizadas con esperma congelado y resultados del diagnóstico de gestación a los 25 días. ....	199
Tabla 35: Resultados de los partos de las cabras espermatizadas con esperma congelado y duración de la gestación. ....	202

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución del volumen medio eyaculado (VE) durante los catorce meses de estudio por ambos machos (VE1; VE2). .....	88
Figura 2. Evolución del volumen eyaculado medio (VE) por ambos machos frente al fotoperiodo (FP). .....	89
Figura 3. Evolución del volumen eyaculado medio (VE) frente a la temperatura ambiental media ( $T^a$ ). .....	90
Figura 4. Evolución de la concentración espermática media (C) durante los catorce meses de estudio por ambos machos (C1; C2). .....	91
Figura 5. Evolución de la concentración espermática media (C) por ambos machos frente al fotoperiodo (FP). .....	92
Figura 6. Evolución de la concentración espermática media (C) por ambos machos frente a la temperatura ambiental media ( $T^a$ ). .....	93
Figura 7. Evolución de MT y MRP por ambos machos durante el estudio. ....	95
Figura 8. Evolución de MT y MRP por ambos machos frente al fotoperiodo (FP). .....	96
Figura 9. Evolución de MT y MRP por ambos machos frente a la temperatura ambiental media ( $T^a$ ). .....	96
Figura 10. Evolución de la morfología espermática media (N) e individual en cada macho (N1; N2). .....	98
Figura 11. Evolución de la morfología espermática media (N) por ambos machos frente al fotoperiodo (FP). .....	99
Figura 12. Evolución de la morfología espermática media (N) por ambos machos frente a la temperatura ambiental media ( $T^a$ ). .....	99
Figura 13. Evolución de la integridad de acrosoma media (I) e individual en cada macho (I1; I2). .....	101
Figura 14. Evolución de la integridad de acrosoma por ambos machos frente al fotoperiodo (FP). .....	102
Figura 15. Evolución de la integridad de acrosoma por ambos machos frente a la temperatura ambiental media ( $T^a$ ). .....	102

Figura 16. MTD medio para cada macho según el diluyente de congelación (T= Tris; L=lácteo).....	107
Figura 17. Valores de movimiento rápido progresivo medio a la descongelación (MRPD) obtenidos en cada individuo, según el diluyentes (T= diluyente Tris; L= diluyente lácteo). .....	107
Figura 18. Movimiento total medio observados a la descongelación (MTD) en cada estación por individuo. ....	110
Figura 19. Movimiento rápido progresivo medio observado a la descongelación (MRPD) en cada estación por individuo. ....	110
Figura 20. Movimiento total medio observado a la descongelación (MTD) en cada estación por diluyente(T= Tris; L=lácteo).....	112
Figura 21. Movimiento rápido progresivo medio observado a la descongelación (MRPD) en cada estación por diluyente (T= diluyente Tris; L= diluyente lácteo).....	112
Figura 22. Variación del movimiento total medio a la descongelación (MTD) respecto a la media en cada uno de los machos estudiados durante los 14 meses de estudio. ....	113
Figura 23. Movimiento total medio observado a la descongelación (MTD) para cada diluyente respecto a la media, durante los 14 meses de estudio.....	113
Figura 24. Variación del movimiento rápido progresivo medio a la descongelación (MRPD) respecto a la media en cada uno de los machos estudiados durante los 14 meses de estudio. ....	114
Figura 25. Movimiento rápido progresivo medio observado a la descongelación (MRPD) para cada diluyente respecto a la media. ....	115
Figura 26. Evolución del movimiento total medio observado a la descongelación (MTD) respecto al fotoperiodo por ambos machos. ....	116
Figura 27. Evolución del movimiento rápido progresivo medio a la descongelación (MRPD) respecto al fotoperiodo durante el estudio por ambos machos.....	116
Figura 28. Movimiento total medio observado a la descongelación (MTD), respecto a la temperatura ambiental media.....	117
Figura 29. Movimiento rápido progresivo medio observado a la descongelación (MRPD) durante el estudio, respecto a la temperatura media ambiental. ....	117

Figura 30. Morfología espermática media observada a la descongelación (ND) en cada individuo, según el diluyente (T= diluyente Tris; L= diluyente lácteo).....	119
Figura31. Morfología espermática observada a la descongelación (ND) en cada estación por individuo. ....	119
Figura 32. Morfología espermática observada a la descongelación (ND) en cada estación por diluyente (T= diluyente Tris; L= diluyente lácteo).....	120
Figura 33. Variación de la morfología espermática media obtenida a la descongelación (ND) respecto a la media de cada macho. ....	122
Figura 34. Morfología espermática media obtenida a la descongelación (ND) para cada diluyente respecto a la media. ....	123
Figura 35. Evolución de la morfología espermática a la descongelación (ND) respecto al fotoperiodo durante el estudio por ambos machos. ....	123
Figura 36. Morfología espermática media observada a la descongelación (ND) durante el estudio, respecto a la temperatura media ambiental. ....	124
Figura 37. Integridad de acrosoma observada a la descongelación (ID) en cada individuo, según el diluyente (T= diluyente Tris; L= diluyente lácteo).....	126
Figura 38. Integridad de acrosoma observada a la descongelación (ID) en cada estación por individuo. ....	127
Figura 39. Integridad de acrosoma observada a la descongelación (ID) en cada estación por diluyente (T= diluyente Tris; L= diluyente lácteo).....	127
Figura 40. Variación de la integridad de acrosoma a la descongelación (ID) respecto a la media en cada uno de los machos estudiados.....	128
Figura 41. Integridad de acrosoma apreciada a la descongelación (ID) para cada diluyente respecto a la media. ....	129
Figura 42. Evolución de la integridad de acrosoma a la descongelación (ID) respecto al fotoperiodo durante el estudio por ambos machos. ....	129
Figura 43. Integridad de acrosoma observada a la descongelación (ID), respecto a la temperatura ambiental media.....	130
Figura 44. Distribución del celo inducido y sincronizado con 11 días de esponjas vaginales .....	133
de 45 mg de FGA (n= 42).....	133

Figura 45. Resultados del diagnóstico de gestación por ecografía vía rectal.....	135
Figura 46. Valores medios de fertilidad obtenidos en cada macho (1; 2) según el diluyente de congelación empleado (T= diluyente Tris; L= diluyente lácteo).....	137
Figura 47. Frecuencia de partos.....	137

# **1 INTRODUCCIÓN**

Los antecedentes de la espermatización manual (EM) de los animales domésticos datan de 1780, cuando Spallanzani consiguió, el nacimiento de una camada normal, depositando esperma fresco directamente en el útero de una perra en celo. Posteriormente, se desarrolla y extiende por todas las latitudes, siendo uno de los claros ejemplos de la utilidad de la investigación en la práctica, hasta el punto de convertirse en una importante técnica reproductiva, que entre otras tiene las siguientes ventajas:

- Empleando esperma de sementales de alto valor genético, permite realizar programas de selección y mejora de razas.
- Se reducen los riesgos de difundir enfermedades sexuales debido, entre otros, al control sanitario del donante de esperma y la adición de antibióticos al mismo.
- Se superan las distancias mediante el transporte del esperma diluido y conservado, reduciendo el coste y riesgo en el transporte de los animales.
- Posibilita que determinados individuos infértiles puedan tener descendencia.

Sin embargo, la EM del ganado caprino en España se ha realizado de forma experimental hasta finales de la década de los 90, tanto con esperma refrigerado como congelado-descongelado (Vázquez y col., 1998), y es a partir de este momento en el que se organizan grupos de investigación con el fin de poner en marcha la metodología de la EM en esta especie (Tapia y Herrera, 1995; Carrizosa y col., 1997; Lorenzo y col., 1997).

La conservación del esperma en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  ha permitido preservar por tiempo indefinido la viabilidad del mismo facilitando entre otros, la mejora de la sanidad, optimización en el uso de sementales, aceleración de programas de mejora genética, homogeneidad en las producciones, disponibilidad de registros genealógicos, control de reproductores y conservación de recursos zoogenéticos (BOE nº 279/97). No obstante, el proceso de congelación-descongelación altera la calidad del movimiento y velocidad del espermatozoide (Kayser y col., 1992; Pérez y col., 1997), que hoy en día se cuantifican de forma objetiva y precisa, mediante sistemas de análisis de imagen computerizados (Tuli y col., 1992); asimismo, produce desestabilización de

la membrana plasmática del espermatozoide, y activa la reacción acrosómica, habiéndose indicado una influencia positiva de los diluyentes en mantener la estabilidad de la misma (Blanch y col., 1988). La reacción del acrosoma es un fenómeno fisiológico imprescindible para la fecundación (Mann y Lutwak-Mann, 1981), que conlleva entre otros cambios, la rotura del capuchón cefálico y liberación del contenido acrosómico (Das y Rajkonwar, 1994), pero también es un proceso degenerativo, que se puede producir por muerte celular, agentes físicos y químicos entre otros. La aplicación de soluciones salinas junto a microscopía de contraste de fases (Weitze, 1977; Söderquist y col., 1997), técnicas de tinción (Varner y col., 1987; Vázquez y col., 1992) o fluorocromos específicos (Woelders, 1991; Johnson y col., 1996), son algunos de los métodos utilizados para estudiar la integridad del acrosoma, existiendo técnicas laboratoriales muy sensibles y precisas para valorarlo como son la fluorescencia y citometría de flujo.

La entrada de España en la Unión Europea, abre nuevas perspectivas de trabajo en el campo de la caprinotecnia, sobre todo porque esta especie es capaz de aprovechar terrenos marginales incapaces de sostener otro tipo de ganadería, lo que la convierte en la especie de elección para muchas zonas del territorio español. Por esto, Andalucía ha sido una zona especialmente rica en diferentes razas de animales domésticos y a diferencia de otras razas autóctonas, la Florida no ha presentado en los últimos tiempos un proceso de deterioro (Camacho y col., 1990), debido a su gran potencial productivo lechero y elevada rusticidad para los sistemas de producción tradicionales. Esta raza andaluza descrita y estudiada por Sánchez (1988) y Sánchez y col. (1990 y 1992) cuenta con un censo aproximado de 3.500 reproductoras (Libro Genealógico ACRIFLOR, 2003). Sin embargo, cabe destacar una considerable falta de conocimientos en el ámbito reproductivo, tanto del macho como de la hembra, y en particular en estudios sobre la producción y calidad del esperma que permitan establecer de una forma objetiva y precisa el periodo óptimo de la actividad reproductiva del macho de la raza Florida.

Los conocimientos reproductivos actuales sobre la cabra Florida se han centrado principalmente en la hembra, mediante la observación de los períodos de cubrición y

concentración de parideras (Sánchez y col., 1995) y respuesta a tratamientos de inducción y sincronización de celos (Dorado y col., 2002c). Sobre el macho existen estudios realizados que reflejan el efecto de la estacionalidad sobre los parámetros reproductivos del mismo, como el tamaño testicular (Dorado y col., 2002a y b; Rodríguez y col., 2003), producción y calidad del esperma (Hidalgo y col., 2002 y 2003; Dorado y col., 2003). Por otra parte, existen trabajos realizados en otras razas y latitudes que reflejan el efecto de la estacionalidad sobre la congelabilidad del esperma (longevidad del movimiento, morfología espermática e integridad de acrosoma entre otros).

## **2 OBJETIVOS**

Con el presente trabajo pretendemos profundizar en el conocimiento de la respuesta a la congelación-descongelación del esperma del macho cabrío de la raza Florida, a fin de reducir las limitaciones condicionadas por las características del esperma propios de la especie, y su respuesta a los métodos de diluyoconservación, con el fin de poder crear bancos de esperma congelado de los machos de mayor valor genético y aumentar así las posibilidades de difusión de la raza mediante la espermatización manual. Los objetivos específicos son los siguientes:

- Conocer de forma objetiva y precisa los parámetros espermáticos (producción y calidad del esperma) a lo largo del año.
- Valorar la influencia de la estación y factores climáticos (fotoperiodo y temperatura ambiental) sobre la producción y calidad del esperma; asimismo sobre la capacidad de congelación-descongelación, empleando dos diluyentes diferentes.
- Valorar *in vivo* la capacidad fertilizante del esperma congelado-descongelado, mediante espermatización manual de cabras sincronizadas con esponjas vaginales.

### **3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 Factores que influyen en la producción espermática del macho cabrío**

La actividad reproductiva de los pequeños rumiantes está influenciada, entre otros, por factores estacionales (Pelletier y col., 1988) como el fotoperiodo (Branca y Cappai, 1989; Delgadillo y col., 1991 y 1992; Delgadillo y Chemineau, 1992), cuya acción se produce a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal mediante la vía de la glándula pineal. Esta glándula recibe las variaciones en las horas de luz / día y actúa como mediador transformando los impulsos ópticos de la luz en descargas hormonales de melatonina. Durante los días cortos, la glándula pineal aumenta la síntesis y secreción de melatonina que actuaría a nivel del sistema nervioso central variando la pulsatilidad de la secreción de GnRH en el hipotálamo. Esto supone, en última instancia, un aumento de la secreción de gonadotropinas LH, lo que favorecerá el crecimiento testicular y la secreción de testosterona (Lincoln G.A., 1980; Chemineau y col., 1986). Por el contrario, cuando el fotoperiodo es ascendente, a través del mecanismo anteriormente citado se deprime la secreción de LH y en consecuencia el tamaño testicular y la secreción de testosterona (Miyamoto y col., 1987; Pelletier y col., 1988).

Sin embargo, la influencia del fotoperiodo depende a su vez de la localización geográfica, reduciéndose a medida que nos acercamos a los trópicos (Corteel, 1981; Chemineau, 1986; Thimonier y col., 1986; Ritar, 1993). Así pues, las variaciones en la producción espermática son más o menos marcadas, dependiendo de la latitud en la que se ubican nuestras razas autóctonas (Vázquez y col., 1998), por encima de los 40°, las variaciones estacionales son muy marcadas (Pérez, 1992; Karagiannidis y col., 2000), entre 30°-40° se aprecia mayor producción espermática en verano y otoño (Skalet y col., 1988; Roca y col., 1992b); sin embargo, la calidad seminal es aceptable durante todo el año (Roca y col., 1992a y b; Pérez y Mateos, 1996) en zonas situadas a menos de 30° de latitud, donde los machos no presentan variaciones estacionales en la producción de células espermáticas (Chemineau, 1986).

En zonas de clima tropical o subtropical, donde las variaciones del fotoperíodo a lo largo del año no son tan marcadas, cobran mayor importancia otros componentes climáticos tales como la temperatura y la humedad relativa (Thimonier y col., 1986; Pérez y Mateos, 1996), y quizás también la disponibilidad de alimento (Walkden-Brown y col., 1993 y 1994; Pérez y Mateos, 1996), aunque la influencia directa de los mismos sobre los parámetros reproductivos de los pequeños rumiantes han sido poco estudiados. Parece por tanto que las razas de clima tropical al igual que las autóctonas de la Península Ibérica, muestran una actividad reproductiva constante a lo largo de todo el año (Galina y col., 1985 en la Mejicana; Chemineau, 1986 en Criolla; Cabrera y col., 1998a y b en la Agrupación Caprina Canaria), respondiendo de forma diferente a aquellas de países europeos de mayores latitudes.

En el ganado caprino también se ha evidenciado que tanto el comportamiento sexual como la calidad seminal varían en función de la edad y raza (Corteel, 1975c; Chemineau, 1986; Roca y col., 1991a; Vázquez y col., 1998), aunque la libido puede estar más condicionada por la estación del año que por la propia edad de los animales (Roca y col., 1991b), pudiéndose observar que el número de montas, así como de cópulas disminuyen durante semanas e incluso meses fuera de la estación reproductiva.

Según Corteel (1977), machos cabríos de raza Alpina en su hábitat natural producen espermatozoides de buena calidad hacia los 6 meses de edad, mientras que en otras razas y en otras latitudes esto ocurre con más edad (Shina y col., 1981 en Jamunapari; Bongso y col., 1982 en Malaya; Skalet y col., 1988; Chakraborty y col., 1989 en Nubiana). Roca y col. (1991a) en Murciano-Granadina, observan una producción espermática de buena calidad a partir de los 8-10 meses de edad, además de comprobar que a partir de dicha edad el incremento de la misma no provoca efecto alguno sobre la calidad seminal.

Para Pérez y Mateos (1996) y Karagiannidis y col. (2000), existen diferencias estadísticamente significativas en las características espermáticas entre razas, tanto cuantitativas (volumen eyaculado, concentración y número de espermatozoides por

eyaculado) como cualitativas (porcentaje de espermatozoides móviles, movimiento progresivo y porcentaje de anomalías); y varios autores concluyen que hay variabilidad individual en la producción espermática, existiendo además una interacción entre machos y estación, para los distintos parámetros seminales (Roca y col., 1992b; Pérez y Mateos, 1996; Cabrera y col., 1998a).

### **3.2 Pruebas de valoración de la calidad del esperma**

La viabilidad espermática siempre ha sido asociada con la fertilidad potencial que tiene una muestra de esperma (Uwland, 1984); sin embargo, las pruebas laboratoriales actuales no permiten determinar con exactitud la fertilidad de un macho, ni ofrecen una repetibilidad aceptable entre diferentes estudios (Graham y col., 1980). La capacidad fecundante del esperma es una función biológica extremadamente compleja, que puede verse afectada por múltiples factores como el movimiento y concentración espermática, reconocimiento celular, secreción y fusión de membranas, entre otras, por lo que para poder valorarla será necesario una integración de varios métodos laboratoriales.

Por otro lado, los resultados de estas pruebas suelen estar influidos por multitud de factores, entre los que destacamos la subjetividad de los ensayos, número de células analizadas (Graham y col., 1990), sesgo del observador, errores sistemáticos y variabilidad inter e intrapersonal (Boixo, 1994). Las modernas técnicas de automatización (analizadores de imagen computerizados) permiten reducir la variabilidad existente en la mayoría de las pruebas laboratoriales, pudiendo analizar de forma objetiva, rápida y precisa un gran número de células en un corto periodo de tiempo. Actualmente existen nuevas tecnologías como sondas citoquímicas, HOS-test, SPA-test, fluorescencia, estudios del ADN, etc, que permiten profundizar en el conocimiento de la calidad del esperma con relación a la fertilidad.

El eyaculado de macho cabrío, como el de morueco (Mann y Lutwak-Mann, 1981), es de escaso volumen (0.7-2 ml.), elevada concentración espermática ( $2-5 \times 10^9$  spz/ml.), alto porcentaje de espermatozoides móviles (70-90%) y bajo porcentaje de

anomalías (5-15%) (Evans y Maxwell, 1987; Chemineau y col., 1991; Roca y col., 1992a y b).

El cálculo del volumen eyaculado, junto con la concentración espermática, forman parte de la valoración macro y microscópica del esperma y son necesarios con el fin de preparar las dosis que se van a diluyoconservar (Boixo, 1994).

Según Vázquez y col. (1998), el volumen eyaculado varía en función del individuo, edad y raza. Además, varios autores han apreciado que, junto a otros parámetros espermáticos, como la concentración y el número de espermatozoides móviles por eyaculado, el volumen se ve influenciado más por la madurez sexual adquirida por los machos (Corteel, 1975c; Summermatter y Fuschini, 1995) que por el propio efecto de la estación (Cabrera y col., 1998a).

Por otra parte, la actividad sexual o la frecuencia de recogida de esperma causan alteración de la calidad seminal de los animales domésticos (Foote, 1978). Jennings y Mcweeney (1976) en morueco, observan que el volumen eyaculado, junto a la concentración y el número total de espermatozoides disminuyen significativamente tras eyaculados consecutivos. De la misma manera se comporta el macho cabrío según refieren varios autores (Ritar y col, 1992 en la raza Angora; Cabrera y col., 1998a en la Asociación Caprina Canaria). En ovino Kaya y col. (2002) detallan una disminución del movimiento progresivo en los eyaculados de machos sometidos a una intensa actividad sexual.

Actualmente, se considera que las pruebas laboratoriales que valoran el movimiento espermático proporcionan los datos más importantes a cerca de la calidad del esperma; sin embargo, están sujetas por un lado a la subjetividad de la prueba y, por otro, a la elevada sensibilidad de esta característica de los espermatozoides durante la manipulación necesaria para su valoración (Boixo, 1994). El movimiento espermático ha venido valorándose de forma subjetiva mediante la estimación visual microscópica del porcentaje de células móviles, mostrando una gran variabilidad en su correlación

con la fertilidad (Uwland, 1984). Debido a esto, varios autores señalan que otras pruebas laboratoriales como la capacidad de penetración del espermatozoide a través del mucus cervical o gel de poliacrilamida (Eggert-Kruse y col., 1993) en tubos capilares así como, la técnica de filtración en columna de Sephadex, desarrollada por Graham y col. (1976), tienen mayor importancia que las pruebas de motilidad por simple observación microscópica (Pace y col., 1981; Mole y Fitzgerald, 1990)

Sin embargo, hoy en día es posible determinar de forma objetiva y precisa este parámetro cinético mediante sistemas de análisis de imagen computerizados (Tuli y col., 1992), destinados a la cuantificación del movimiento y morfometría de los espermatozoides de las diferentes especies, permitiendo observar sobre la muestra tanto los parámetros clásicos como el porcentaje de espermatozoides móviles, así como calcular de forma automática nuevos parámetros relacionados con el movimiento, como la velocidad y angularidad del mismo, además de otros derivados, entre los que destacan la progresividad, velocidad en la trayectoria, linealidad, rectitud, desplazamiento lateral de la cabeza y frecuencia del batido del flagelo.

Entre estos nuevos parámetros cinéticos, hay dos que parecen destacar sobre los demás como principales indicadores del movimiento espermático, que son la velocidad progresiva y el desplazamiento lateral de la cabeza (Aitken, 1990); si bien, Anel y col. (1996) trabajando con esperma congelado-descongelado de morueco, observan diferencias significativas en los valores medios de progresividad, linealidad, rectitud y desplazamiento lateral de la cabeza entre el grupo de ovejas gestantes y no gestantes.

Las ventajas presentadas por estos equipos en la valoración del movimiento espermático son, por un lado, que disminuyen la subjetividad de la estimación visual, y, por otro, que permiten transformar una estimación cuantitativa en una cualitativa, ya que facilitan el análisis del tipo de movimiento (Palmer y Magistrini, 1992).

Sin embargo, en la bibliografía consultada se encuentran diferencias en cuanto al valor predictivo de los diferentes datos que ofrecen los analizadores de esperma entre

laboratorios, incluso cuando se utilizan sistemas idénticos, y que podrían deberse a las diferencias entre especies, así como la falta de estandarización del método de trabajo. Hasta la fecha no existen estudios sobre la caracterización del patrón de movimiento espermático para las distintas especies animales, lo que sería un paso importante para determinar aquellos parámetros cinéticos más relacionados con la fertilidad (Anel, 1999).

Varios autores señalan que el porcentaje de espermatozoides móviles está influenciado entre otros factores, por la madurez sexual (Corteel, 1975c; Summermatter y Fuschini, 1995), estación reproductiva (Corteel, 1975c y 1976) y porcentaje de morfoanomalías (Karagiannidis y col., 2000); sin embargo, Ritar y col. (1992), Summermatter y Fuschini (1995) y Cabrera y col. (1998a), no apreciaron una influencia significativa del número de eyaculados recolectados.

La concentración espermática es un parámetro importante a la hora de valorar la calidad de un eyaculado y preparar las dosis diluyocervadas, no siendo conveniente utilizar eyaculados cuya concentración sea inferior a  $2.5 \times 10^9$  espermatozoides/ml (Evans y Maxwell, 1987).

La concentración puede determinarse por métodos fotométricos o espectrofotométricos, siendo métodos indirectos que relacionan el grado de absorción de la luz que provocan los espermatozoides diluidos, mediante una curva de calibración determinada previamente por recuento microscópico en cámara. Asimismo, pueden realizarse recuentos muy precisos, aunque a mayor coste, con contadores de partículas (Coulter Counter); aunque, presenta grandes dificultades de adaptación para cada especie animal.

La técnica del hemocitómetro ha sido utilizada para determinar el número de partículas por unidad de volumen de un líquido, siendo el sistema más barato y empleado para determinar la concentración; aunque, se presenta como un método

laboratorial tedioso y con alta variabilidad frente a la espectrofotometría (Boixo y col., 1987).

Varios autores coinciden en que al igual que en otros parámetros espermáticos, la concentración muestra un patrón estacional (Cabrera y col., 1998a y b; Karagiannidis y col., 2000), pero no tan marcado como en el volumen eyaculado. Así, Cabrera y col. (1998a y b) en la Agrupación Caprina Canaria, observan que la concentración espermática muestra un perfil estacional con mínimos en otoño, pero sin llegar a comprometer la viabilidad de los eyaculados, incrementándose durante el invierno y la primavera.

La evaluación morfológica clásica, incluida la acrosomal (Saacke, 1984) así como la gota citoplasmática (Mann y Lutwak-Mann, 1981), ha sido utilizada durante años para estimar la calidad del esperma (Uwland, 1984).

Por diversos trabajos es conocida la correlación entre el porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales y la fertilidad de los animales domésticos, incluido el ganado caprino, y en este sentido Evans y Maxwell (1987) determinan que aquellos eyaculados de pequeños rumiantes que presenten entre un 15-20% de células espermáticas anormales mantendrán su capacidad fertilizante intacta.

Algunas morfoanomalías concretas se han asociado con fertilidad reducida, como los núcleos anormales, espermatozoides decapitados, anormalidades de la pieza intermedia y colas dobladas o enrolladas en espiral, así como determinadas anomalías heredables. Asimismo, cualquier defecto morfológico debido a un proceso de maduración espermática incompleta (defectos en la cola o pequeñas diferencias geométricas en la cabeza), puede acarrear un movimiento aberrante que incapacite al espermatozoide para su progresión en el aparato genital femenino y posterior fecundación (Dresdner y Katz, 1981).

Conocido es el efecto que la estación del año tiene sobre la calidad espermática, provocando entre otros el aumento del porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales (Karagiannidis y col., 2000) y de acrosomas dañados. Estas variaciones estacionales están asociadas a cambios en las horas de luz y variaciones de temperatura (Corteel, 1981; Colas y col., 1986), apreciándose un incremento en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales durante los días largos (Colas, 1980 y Colas y col., 1986).

Roca y col. (1992a) en Murciano-Granadina, observan un incremento de las formas anormales desde los meses de enero hasta abril, acompañado de un aumento del porcentaje de acrosomas dañados desde enero a junio, coincidiendo con lo descrito por Skalet y col. (1988) y Pérez y Mateos (1996) en machos cabríos raza Nubiana y Verata respectivamente, así como por Colas (1980); Amir y col. (1986) y Colas y col. (1986) en moruecos.

Por otro lado, la temperatura ambiente elevada ha sido considerada como un importante factor detrimental de la calidad espermática de los rumiantes, así, en áreas de altas temperaturas generalmente se observa un incremento en la proporción de espermatozoides anormales (Colas, 1980; Corteel, 1981). Sin embargo, en estudios sobre la calidad espermática del macho Murciano-Granadino en la región Mediterránea, se ha observado que la calidad del esperma fue mejor durante la época más calurosa, lo que demuestra que no se encuentra afectada por las altas temperaturas en estas latitudes (Roca y col., 1992a).

En estudios previos, se ha demostrado la existencia de variación estacional en el diámetro testicular del macho cabrío de raza Murciano-Granadina, con valores mínimos durante el invierno (Roca y col., 1991b), acompañado de un descenso de la calidad espermática, reflejo no sólo del incremento de las horas de luz sino concomitante al descenso del tamaño testicular. La asociación de la calidad espermática con el diámetro testicular ha sido ya documentado en pequeños rumiantes (Lincoln G.A., 1987).

Varios autores han demostrado que la edad del macho ejerce una ligera influencia sobre la aparición de espermatozoides morfológicamente anormales en el esperma caprino (Skalet y col., 1988; Roca y col., 1992a). Por otra parte, Karagiannidis y col. (2000) concluyen que el porcentaje de espermatozoides anormales está influenciado por la condición del macho y por el tiempo de recogida. Al mismo tiempo, Strzezek y col. (1995) en cerdo y Kaya y col. (2002) en morueco, observan que la intensificación del ritmo de recogidas de esperma produce a su vez un incremento del número de espermatozoides morfológicamente anormales.

### **3.3 Congelación del esperma**

#### **3.3.1 Ventajas e inconvenientes de la congelación de esperma**

La diluyoconservación del esperma ya sea refrigerado o congelado-descongelado, es esencial para el desarrollo y la instauración de los programas de espermatización manual (EM) del ganado caprino. La refrigeración del esperma a temperaturas de +5°C y +15°C reduce las necesidades energéticas de los espermatozoides y permite por tanto prolongar la viabilidad de los mismos durante varios días, pero no así su poder fecundante que está restringido a escasas horas. Sin embargo, la congelación del esperma a temperaturas de -196°C, preserva las características espermáticas por tiempo indefinido, y su aplicación mediante EM incrementa el rendimiento reproductivo de los machos, además de mantener y difundir el material genético previamente seleccionado, aunque los índices de fecundidad del esperma a la descongelación, son más bajos que en el empleo del esperma refrigerado, (Memon y Ott, 1981; Chauhan y Anand, 1990) debido a las alteraciones que sufre la estructura y la funcionalidad de la membrana durante los procesos de congelación y descongelación (Parks y Graham, 1992).

Además de los cambios físicos de las membranas del espermatozoide durante el proceso de congelación-descongelación, la bajada rápida de la temperatura o “choque frío” se manifiesta por el aumento de la solubilidad de los gases (oxígeno doble y anhídrido carbónico triple) y de la viscosidad de los coloides así como por la salida de ciertas sustancias intracelulares de importancia vital y su paso al medio exterior (enzimas, lipoproteínas, ATP, potasio, fosfolípidos, etc).

Mediante el trabajo experimental, se han desarrollado teorías sobre los factores que pueden afectar a las células espermáticas, durante los procesos de congelación-descongelación, encontrando además de la deshidratación producida por la congelación y la concentración de solutos, que el principal problema es la formación de cristales de hielo intracelulares originados a partir del agua de constitución durante la fase del cambio de estado y que son los que producen daños irreversibles a nivel de la membrana plasmática cuando se invierte el proceso durante la descongelación (Weitze y Petzoldt, 1992). Según Mazur (1985), el daño celular se produce durante el proceso de congelación y descongelación, a temperaturas entre  $-15^{\circ}\text{C}$  y  $-60^{\circ}\text{C}$ , y no durante el almacenamiento en nitrógeno líquido. No obstante Pintado y Pérez (1992) aprecian diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro a la descongelación tras veinticuatro horas de almacenamiento; frente a uno, tres, seis y doce meses después de su congelación.

Barrios y col. (1998) mediante el empleo de la microscopía electrónica de barrido, observan que el daño ejercido por el choque-térmico en espermatozoides ovinos, consiste en una desestructuración de las membranas plasmática y acrosomal, que provoca un estallido y reciclamiento vesicular en gran parte de los componentes de la membrana. Estas alteraciones de la membrana plasmática del espermatozoide, reducen por tanto el transporte espermático y su viabilidad en el aparato genital de la hembra (Mattner y col., 1969; Valcárcel y col., 1994).

### **3.3.2 Factores que influyen en la congelabilidad del esperma de macho cabrío**

El grado de susceptibilidad, al daño producido durante el proceso de congelación-descongelación, depende de la combinación de varios factores (Watson, 1995 y 2000) entre los que destacamos la especie animal (Aguado y col., 1998; Sanz y col., 1999), raza (Cochran y col., 1985; Karatzas y col., 1997; Aguado y col., 1998) e incluso el propio individuo (Ritar y Salamon, 1991; Garde, 1993; Aguado y col., 1998), a causa de las diferencias existentes en las características de los lípidos integrantes de las membranas celulares.

Bien es conocido el efecto desfavorable del plasma seminal, sobre el grado de congelabilidad del esperma caprino (Roy, 1957; Corteel, 1974). Para Ritar y Salamon (1982), la separación del plasma seminal, mediante centrifugación, muestra un efecto positivo sobre la viabilidad del esperma caprino congelado-descongelado (apartado 3.3.3.3, Pág. 44).

Por otro lado, en la bibliografía no existen muchos estudios sobre el efecto de la estación en el grado de congelabilidad del esperma caprino. Loubser y Niekerk (1983) en machos de raza Angora, no encuentran un efecto significativo de la estación sobre la congelabilidad del esperma caprino. Sin embargo, en ovino si se ha demostrado la existencia de un mayor grado de congelabilidad durante la estación reproductiva (Colas y Brice, 1976). Asimismo, Tuli y Holtz (1995) en estudios realizados en Alemania en la raza Boer, observan que el porcentaje de espermatozoides móviles y vivos a la descongelación, aumentan de forma significativa en eyaculados recolectados y procesados durante la estación reproductiva.

### **3.3.2.1 Integridad del acrosoma**

La capacitación es un fenómeno fisiológico importante e imprescindible para la fertilización del oocito (Cognie y col., 1991) que tiene lugar en el aparato genital femenino, y consiste en una serie de modificaciones que incluyen la alteración o pérdida de glicoproteínas periféricas, reordenación de proteínas estructurales, reducción del colesterol y cambios en la distribución y composición de los fosfolípidos de membrana (Yanagimachi, 1994). Pero también es un proceso degenerativo que se puede producir por muerte celular, agentes físicos (proceso de refrigeración y congelación-descongelación), químicos, etc. Por esto la evaluación de las distintas membranas del espermatozoide (membrana plasmática, acrosomal y mitocondrial) constituye una prueba de valoración espermática muy importante dada la gran trascendencia de estas estructuras para la funcionalidad del espermatozoide (Didion y col., 1990; Graham y col., 1990; Woelders, 1991), teniendo un gran valor predictivo de la fertilidad potencial del esperma (Benoff y col., 1993; Bielsa y col., 1994). Asimismo, son varios los autores

que obtienen una alta correlación entre el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro y la fertilidad (Saacke y White, 1972; Juneja y col., 1989).

Clásicamente, las pruebas de integridad de estas membranas, se realizaban mediante observación microscópica bajo iluminación de contraste de fases (Weitze, 1977; Söderquist y col., 1997), interferencia y fluorescencia (Harrison y Vickers, 1990; Woelders, 1991; Johnson y col., 1996) o por técnicas tintoriales bajo iluminación normal (Varner y col., 1987; Vázquez y col., 1992). La bibliografía actual muestra, que en los últimos años, se han desarrollado numerosas técnicas que se fundamentan en el empleo de sustancias fluorescentes y en la capacidad de las membranas espermáticas para permitir o no el paso de estas sustancias dependiendo de su estado funcional; describiéndose técnicas de tinción simple o dobles, así como fluorocromos (diacetato de carboxifluorosceína, yoduro de propidio (PI), pisum sativum agglutinin lectin (PSA), Hoechst 33342, SYBR-14, etc) para determinar la viabilidad de la célula espermática (Graham y col., 1990; Harrison y Vickers, 1990; Johnson y col., 1996).

Althose y Hopkins (1995) en cerdo, emplean dos colorantes fluorescentes, Calceína AM (CAM) y homodímero de Etidio (EthD-1) que tienen la ventaja de evaluar simultáneamente el porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática intacta y el movimiento espermático (Rodríguez-Martínez y col., 1997). Para Vázquez y col. (1992), el empleo de técnicas de triple tinción (TST) desarrolladas en espermatozoides humanos (Talbot y Chacon, 1981) y adaptadas a las distintas especies animales como ratón (Talbot y Chacon, 1981), toro (Didion y Graves, 1986), caballo (Varner y col., 1987) y macho cabrío (Kusunoki y col., 1989), permiten diferenciar de forma conjunta la integridad del acrosoma y la viabilidad de las células espermáticas, mediante el empleo de tres colorantes, el azul Tripán (colorante vital), marrón Bismark (colorante postacrosómico) y rosa de Bengala (colorante acrosómico).

Otra técnica similar a las descritas es la del colorante del ADN H33258, sustancia fluorescente que no penetra en células espermáticas cuya membrana esté intacta, haciéndolo, sin embargo, en las que su membrana esté dañada (Cross y col., 1986),

uniéndose al ADN y presentando por tanto estos espermatozoides una mayor fluorescencia.

Durante el proceso de congelación-descongelación del esperma, se produce una alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática (Hammerstedt y col., 1990; Parks y Graham, 1992), así como una alteración de la integridad de la membrana acrosomal (Aisen y col., 2000), que producen la liberación de varias enzimas específicas (Salisbury y col., 1978) entre las que destacamos la acrosina (Francavilla y col., 1994) y la hialuronidasa que además de jugar un papel importante en el proceso de la fertilización (McRorie y col., 1974) son indicadoras de la alteración del acrosoma durante el procesamiento (Mancini y col., 1964) y congelación del esperma (Foulkes y Watson, 1995), y, por tanto, aportan información sobre la calidad espermática. Al mismo tiempo, la fosfatasa ácida y alcalina, las transaminasas (GOT y GPT) y la láctico deshidrogenasa, tienen un papel esencial en el metabolismo espermático aportando la energía necesaria para la supervivencia, movimiento y fertilidad del espermatozoide, y presentan una correlación positiva con el daño acrosomal (Chauhan y col., 1994). En base a esto, algunas pruebas enzimáticas tiene como objetivo determinar la presencia de estas enzimas intracelulares en el plasma seminal como marcadores del daño celular producido en el espermatozoide durante el proceso de congelación-descongelación (Singh y col., 1992), habiéndose demostrado su correlación con la fertilidad (Pace y col., 1981).

En los últimos años, se han propuesto ensayos laboratoriales de valoración directa de la capacidad de los glicosaminoglucanos, para inducir la reacción acrosómica *in vitro* (Whitfield y Parkinson, 1992), así como la aplicación de sondas citoquímicas (lectinas, anticuerpos monoclonales, enzimas, clortetraciclina, etc.) que se unirán de forma específica a determinados lugares de la membrana acrosomal, empleándose como métodos diagnósticos de la maduración e integridad de acrosoma de los espermatozoides (Rajamahendran y col., 1994; Martí y col., 1998).

Últimamente se están empleando pruebas de determinación de la actividad mitocondrial mediante la utilización de sustancias fluorescentes como la rodamina 123 (Graham y col., 1990), MITO o el JC-1 (Graham y col., 1990; Ericsson y col., 1993; Garner y col., 1997). Asimismo, se están empleando otras sustancias como el Lyso Tracker Green DND-26 para identificar por medio de la citometría de flujo los acrosomas intactos (Graham y col., 1990; Johnson y col., 1996).

#### **3.3.2.1.1 Factores que influyen en el porcentaje de acrosomas dañados**

Como la mayoría de parámetros espermáticos, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado sigue un perfil estacional aunque distinto al presentado por la morfología espermática, con máximos durante el invierno y primavera (Roca y col., 1992b en Murciano-Granadina).

Al igual que en el esperma de morueco (Amir y col., 1986), en eyaculados de macho cabrío en los que existen espermatozoides con acrosoma dañado, a veces suelen encontrarse otros defectos en la cabeza y en la pieza intermedia. Por otro lado, varios autores han observado que el porcentaje de acrosomas dañados aumenta con la edad, si bien lo hacen de manera no significativa (Skalet y col., 1988 en Nubiana; Roca y col., 1991a en Murciano-Granadina). Esto mismo se ha puesto de manifiesto en otras especies como en morueco de raza Yankasa (Osinowo y col., 1988), toro y cerdo (Lotze, 1989).

Chauhan y Anand (1990) observan que el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro, no se ve afectado por la centrifugación, realizada para separar el plasma seminal (Coelho y col., 1995), dilución del esperma, refrigeración a +5°C, glicerolización y equilibrado; sin embargo, durante el proceso de congelación-descongelación del esperma, de las distintas especies, si se produce un aumento significativo del daño acrosomal (Pascual y col., 1993; Singh y col., 1995; García y col., 1996; Ollero y col., 1996). Bag y col. (2002b), en morueco, observan que la temperatura inicial de congelación, tiene un efecto significativo sobre el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro tras el periodo de incubación. Para Valcárcel y

col. (1994) en morueco, el porcentaje de membranas íntegras después de la congelación, se reduce en un 70%; encontrando además una correlación positiva con el movimiento tras 8 horas de incubación a +37°C.

Chauhan y col. (1994), mediante microscopía electrónica, describen los cambios sufridos en la ultraestructura del espermatozoide durante el proceso de congelación-descongelación, consistiendo en una protusión del capuchón cefálico, colas partidas, hinchamiento del acrosoma y pérdida del contenido acrosomal. Del mismo modo, periodos de incubación prolongados, así como, elevada temperatura de incubación son también causa de deterioro y cambios en la membrana plasmática y acrosómica del espermatozoide de morueco (Saacke y White, 1972; Bag y col., 2002). Para López y col. (1999) en morueco, el daño provocado por periodos prolongados de incubación está más asociado al daño en la membrana plasmática, mientras que una mayor temperatura de incubación provocaría tanto daño en la membrana plasmática como en la acrosómica. Asimismo, Glogowski y col. (1998) en verraco, observan una relación linear entre la actividad de la acrosina y el tiempo de incubación en un rango de 15 a 60 minutos. Además, aprecian que la actividad de la acrosina medida a +20°C es menor que cuando es medida a +25°C, +30°C y +37°C, aunque no observan diferencias significativas entre estas tres últimas temperaturas.

Singh y col. (1996), mediante determinación enzimática, observan que la integridad de acrosoma se ve influenciada por el diluyente empleado durante el proceso de congelación-descongelación, demostrando que aquellos diluyentes que contienen lactosa sola o en combinación con glicerol como crioprotectores presentan mejores porcentajes de viabilidad, movimiento, morfología espermática e integridad de acrosoma (Singh y col., 1995). Otros estudios han aportado conclusiones similares en otras especies como el toro (Buruiana y col., 1980), búfalo (Singh y col, 1992) y morueco (Nehring, 1988).

### **3.3.3 Método de congelación y descongelación**

#### **3.3.3.1 Diluyentes empleados en la congelación-descongelación del esperma caprino**

Muy pocos espermatozoides sobreviven al proceso de congelación-descongelación en ausencia de soluciones diluyocconservadoras adecuadas que incorporen agentes crioprotectores. En 1982 Graham y col. señalan, entre las características que debe proporcionar un buen diluyente, mantener una adecuada presión osmótica y equilibrio electrolítico, poseer compuestos con propiedades quelantes y proporcionar un pK de 7 dado la baja capacidad tampón del plasma seminal.

Aunque la dilución del esperma caprino se ha venido realizando con diluyentes a base de leche descremada reconstituida (Corteel, 1974) y con combinaciones de Tris-yema de huevo-glucosa (Ritar y Salamon, 1982), dextrosa-ácido cítrico (Chandler, 1988); o ácido cítrico-yema de huevo (Memon y Ott., 1981); el diluyente universal Tris-ácido cítrico-fructosa ha proporcionado óptimos resultados desde su utilización por Ritar y Salamon (1982). Varios trabajos han demostrado que los compuestos amínicos (Tes, Bes, Hepes y Pipes) son los que cumplen en su mayor parte con la lista de aportaciones ideales en la protección espermática, manteniendo un pH constante además de permitir la inclusión posterior de crioprotectores no penetrantes como la yema de huevo a distintas proporciones (Graham y col., 1972; Dunner y Vázquez, 1991; Pintado, 1991).

Deka y Rao (1987) en un estudio comparativo entre diluyentes comúnmente empleados en la congelación de esperma caprino, observan un mayor grado de congelabilidad para el diluyente Tris-yema de huevo-glicerol con respecto al resto de diluyentes (leche desnatada, citrato-yema de huevo, rafinosa-yema de huevo-glicerol), así como, un mayor movimiento espermático e integridad de acrosoma a la descongelación. Resultados similares obtienen Chauhan y Anand (1990) estudiando las características espermáticas a la descongelación en tres diluyentes diferentes (Tris-yema de huevo, Citrato-glucosa-yema de huevo y leche desnatada-yema de huevo), Pintado y col. (1991) en cinco (Citrato- yema de huevo, diluyente de Cornell, leche descremada,

Tris-ácido cítrico-glucosa y Tris-ácido cítrico-fructosa), Tuli y Holtz (1992) en cuatro (Tris-ácido cítrico, Tes-Tris, Tes-hidróxido de sodio y Bes-hidróxido de sodio) y Pérez y Mateos (1995) en tres diluyentes (Tris-yema de huevo, Leche y Yema de huevo-Leche). En cuanto al espermatozoide refrigerado Dunner (1991a y b) empleando dieciséis diluyentes diferentes con espermatozoide de machos Murciano-Granadinos, obtiene resultados de movimiento e integridad de acrosoma significativamente superiores para las combinaciones de Tris, sobre todo Tris-Tes y Tris-Pipes. Y en búfalo, Sukhija (1984) también obtiene mayores porcentajes de movimiento espermático, espermatozoides vivos y acrosomas íntegros en espermatozoide congelado-descongelado con los diluyentes Tris y Tes-Tris frente a Bes y Tes.

### **3.3.3.2 Papel de la yema de huevo en la congelación del espermatozoide caprino**

Phillips y Lardy (1940) fueron los primeros autores en describir, el efecto protector que la yema de huevo tiene, sobre la membrana espermática y acrosoma del espermatozoide frente al “choque frío”, siendo un constituyente habitual de los diluyentes usados en la congelación del espermatozoide. La yema de huevo posee una fracción de lipoproteínas de baja densidad, concretamente de fosfolípidos, que se ha demostrado tiene un efecto crioprotector del espermatozoide durante el proceso de refrigeración y congelación-descongelación. El mecanismo por el cual estos fosfolípidos protegen la membrana espermática no es del todo conocido, aunque se cree que pueden prevenir la pérdida de fosfolípidos que la misma sufre durante el choque frío.

Sin embargo, se sabe que la congelación del espermatozoide caprino, empleando diluyentes que contengan yema de huevo, es complicada debido a la presencia de una fosfolipasa A (egg yolk coagulating enzyme, EYCE) en el plasma seminal (Roy, 1957), producida por las glándulas de Cowper y que cataliza la hidrólisis, en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$ , de las lecitinas de la yema de huevo produciendo ácidos grasos y lisolecitinas con efecto tóxico directo sobre los espermatozoides (Roy, 1957; Corteel, 1975b y 1980; Nunes, 1982 y Pellicer y Combarous, 1994), ejerciendo un efecto desfavorable sobre la fertilidad del espermatozoide (Roy, 1957; Iritani y Nishikawa, 1963; Ritar y Salamon, 1982).

Por todo esto, en la congelación del esperma caprino, el porcentaje de yema de huevo empleado en las soluciones diluyococonservadoras, normalmente es menor al utilizado en la congelación de esperma de toro o morueco. Así Memon y col. (1985), indican una drástica disminución de la viabilidad espermática, cuando el esperma no centrifugado se diluye en soluciones que contienen un 11% de yema de huevo; y según Ritar y Salamon (1982 y 1991), las concentraciones de yema de huevo superiores al 1.5% provocan un efecto depresivo sobre la viabilidad del esperma no centrifugado, provocando una coagulación del medio y muerte celular tras 2 horas de incubación a +37°C. Sin embargo, Dunner (1993) no aprecia este descenso en la viabilidad del esperma cuando emplea diluyentes con una concentración de yema de huevo del 3% y 12%; Pérez y Mateos (1995) obtienen mejores resultados a la descongelación cuando emplean concentraciones de 9% y 12%; y Gracia y col. (1998) en machos de la Agrupación Caprina Canaria, obtienen una mayor calidad del esperma congelado-descongelado a medida que el diluyente incorporaba mayor proporción de yema de huevo (12%). Roca y col. (1997) consideran que la razón de estas divergencias entre autores pudiera deberse a diferencias en la concentración de EYCE entre razas, aunque hasta la fecha éstas no se han demostrado, pero si se ha sugerido la presencia de diferencias bajo la influencia de la estación y entre individuos (Iritani y col., 1964; Ritar y Salamon, 1982 y 1991). Asimismo, Iritani y Nishikawa (1961) indican que el plasma seminal del toro, morueco, cerdo y conejo no contienen la enzima EYCE. Por otra parte, la hidrólisis de las lecitinas de la yema de huevo depende, entre otros, de la disponibilidad de calcio (Roy, 1957), pH, temperatura y de la concentración de plasma seminal (Iritani y Nishikawa, 1961).

### **3.3.3.3 Efecto de la separación del plasma seminal sobre el grado de congelabilidad del esperma caprino**

El efecto tóxico que la hidrólisis de la yema de huevo tiene sobre los espermatozoides, puede ser reducido mediante la separación del plasma seminal por centrifugación previa dilución del esperma (Corteel, 1974; Memon y col., 1982), mejorando así la viabilidad de las células espermáticas tras el proceso de congelación-descongelación (Corteel, 1974, 1975b y 1992; Ritar y Salamon, 1982; Memon y col.,

1985), o en su defecto tendremos que disminuir la concentración de yema de huevo presente en el diluyente (Ritar y Salamon, 1982 y 1991; Ritar y col., 1990; Ritar y Ball, 1993) o emplear altas diluciones de esperma (Chauhan y Anand, 1990).

Varios autores observan que el esperma centrifugado puede preservarse a bajas temperaturas tras diluirlo en soluciones Tris que contengan altas concentraciones de yema de huevo (Ritar y Salamon, 1982; Chauhan y Anand, 1990; Corteel, 1974, 1977 y 1992). Pellicer-Rubio y Combarous (1998), utilizando diluyentes a base de leche, verifican también que el plasma seminal ejerce una acción negativa en el proceso de congelación y aconsejan su eliminación mediante centrifugación; eliminación que Ritar y Salamon (1982) realizan con el esperma fresco y tanto sea dentro como fuera de la estación reproductiva (Corteel, 1974 y 1977; Nunes y col., 1982; Ritar y Salamon, 1982; Machado y Simplício, 1992). Así, varios autores indican separar el plasma seminal por centrifugación previa dilución, con el fin de evitar el efecto detrimental que tienen sobre el movimiento espermático, integridad de acrosoma y respiración (Nunes y col., 1982; Memon y col., 1985). No obstante, los efectos de la centrifugación son diferentes dependiendo de la intensidad del lavado (Ritar y Salamon, 1982) y del diluyente utilizado (Corteel, 1975b; Ritar y Salamon, 1991). Entre las ventajas inherentes se ha demostrado que la centrifugación conlleva la pérdida según autores del 6% (Ritar y Salamon, 1982), 10% (Corteel, 1974; Dunner y Vázquez, 1991) y 15% (Leboeuf, 1992) de las células espermáticas.

Mateos y Pérez (1994) opinan que el efecto de la centrifugación depende del diluyente que se emplee. Existen trabajos en los que se utilizan diluyentes que contienen compuestos amínicos, y que aún no encontrando diferencias significativas, los valores medios obtenidos con esperma centrifugado, proporcionan cifras de viabilidad *in vitro* más bajas que cuando no había sido centrifugado (Ritar y Salamon, 1983; Chauhan y Anand, 1990; Tuli y Holtz, 1992 y 1994; Vázquez y col., 1998; Azerêdo y col., 2001). Tuli y Holtz (1994), concluyen que la ausencia del plasma seminal induce un incremento del porcentaje de células con membranas dañadas, y que coincide con lo observado por Maxwell y col. (1997) mediante citometría de flujo. Sin embargo,

Azerêdo y col. (2001) utilizando fluorocromos para la valoración de la integridad del acrosoma, no observa diferencias significativas entre el esperma centrifugado y sin centrifugar.

Sin embargo, Mateos y Pérez (1994) trabajando con esperma diluyoconservado en Tris-yema de huevo (3%), observan que el centrifugado del mismo proporciona una mejor viabilidad a la descongelación en cuanto a porcentaje de espermatozoides móviles y calidad de movimiento, mostrando resultados similares en cuanto a porcentaje de acrosomas dañados e inferior porcentaje de formas anormales. Sin embargo, Memon y col. (1985) empleando tres soluciones diluyoconservadoras diferentes, no encuentran efecto del diluyente sobre el proceso de centrifugación.

También se conocen las variaciones en la eficacia de la separación del plasma seminal en función de la concentración espermática de la muestra. En este sentido, Corteel (1990) determinó para las razas Alpina y Saanen, que debemos aplicar solución de lavado hasta obtener una concentración espermática de 200-400 x 10<sup>6</sup> spz/ml. Ritar y Salamon (1982) en Angora, observan una mayor tasa de viabilidad en esperma congelado-descongelado con diluyente Tris-yema de huevo al 12%, realizando un doble centrifugado con solución de lavado al 1:10 y 1:20.

Tuli y Holtz (1994) trabajando con machos de raza Boer, aprecian un menor descenso del movimiento progresivo y porcentaje de espermatozoides vivos a la descongelación del esperma diluyoconservado con yema de huevo y sin centrifugar. Ritar y Salamon (1983), Ozsar y col. (1988) y Pérez (1988) obtienen resultados similares empleando diluyentes Tris-yema de huevo-glicerol y leche en la congelación del esperma caprino, ya sea centrifugado o no. Sin embargo, Deka y Rao (1987) no apreciaron diferencias significativas entre el esperma centrifugado y sin centrifugar.

No obstante, otros autores aprecian que el esperma caprino no centrifugado puede también ser diluyoconservado a +5°C en diluyente Tris con un 1.5-2% de yema de huevo (Ritar y Salamon, 1982 y 1991 en Angora; Roca y col., 1997 en Murciano-

Granadina). Azerêdo y col. (2001) en 3 machos Saanen, observan que el proceso de centrifugación causa un descenso del movimiento tras la refrigeración y congelación-descongelación. Estos resultados coinciden con lo descrito por Ritar y Salamon (1983), Chauhan y Anand (1990) y Tuli y Holtz (1994).

Otros investigadores por el contrario tienen como objetivo eliminar la fase de centrifugación del espermatozoides caprino para separar el plasma seminal, o por lo menos simplificar el proceso de congelación a través de la identificación y neutralización del factor enzimático presente en las secreciones de las glándulas bulbouretrales, o a través del desarrollo de medios sintéticos o semi-sintéticos capaces de preservar la fertilidad espermática. Por otro lado, otros autores señalan el efecto positivo de la adición a los diluyentes de espermatozoides, de otras sustancias menos comunes como el agua de coco (Salles y Nunes, 1993), saliva o extractos vegetales (García y Ruttle, 1987), diferentes sustancias con efecto tampón (Tuli y Holtz, 1992; Dunner, 1993) o preparados de lípidos purificados (Graham y Foote, 1987).

Graham y col. (1971) utilizaron sustancias tensoactivas en ensayos de congelación de espermatozoides porcino, y de los setenta y ocho compuestos ensayados, la adición al diluyente de congelación de un detergente comercial (Orvus Es Paste, OEP) utilizado de forma rutinaria en la congelación de espermatozoides porcino y equino (Martin y col., 1978; Cochran y col., 1984), demostró tener un efecto favorable sobre la integridad del acrosoma. Hoy por hoy, el mecanismo de acción de los detergentes no se conocen con total exactitud pero el efecto beneficioso que tienen sobre el movimiento espermático e integridad de acrosoma, se relaciona con la concentración de yema de huevo existente en el diluyente (Graham y Cabro, 1972).

#### **3.3.3.4 Adición de antibióticos a las soluciones diluyoconservadoras**

La adición de antibióticos se ha convertido en un hecho rutinario ya que se consigue controlar el crecimiento de la flora bacteriana en el eyaculado, si bien no existen muchos trabajos sobre el efecto de los antibióticos en el espermatozoides caprino. Aunque en principio la acción de estas sustancias fue considerada beneficiosa para el

esperma, pueden ejercer un cierto efecto espermicida (Ahmad, 1987) o alterar alguna de los parámetros espermáticos, sobre todo los relacionados con el movimiento (Jasko y col., 1993). En el toro Ahmad (1987), entre otros, concluye que la mayoría de los antibióticos pueden ser utilizados sin problemas para el control del crecimiento bacteriano, si bien encuentra algunas diferencias en función del tipo de diluyente empleado. Ericsson y col. (1990) tampoco aprecian que la adición de antibióticos altere de forma significativa la viabilidad de los espermatozoides, no apareciendo efectos adversos sobre la calidad el esperma congelado-descongelado de toro. Asimismo, Anel y col. (1998) comprueban que la adición de ciertos antibióticos en el diluyente de congelación del esperma ovino, no tiene efectos adversos sobre las características seminales (movimiento e integridad de acrosoma y de membrana plasmática) del esperma congelado-descongelado de morueco.

### **3.3.3.5 Características de las dosis para espermatización manual**

Unas de las causas por las que la espermatización manual con esperma congelado (EM), del ganado caprino, no se haya desarrollado satisfactoriamente, es debido al bajo número de dosis congeladas que se obtienen por eyaculado. Además el número de dosis, está relacionado con el procesado del esperma y el tipo de espermatización (Artiga y col., 1993).

Existen varios trabajos en ovino que comparan los resultados de fertilidad variando el número de espermatozoides por dosis; sin embargo son escasas este tipo de experiencias en el ganado caprino. Entwiste y Martín (1972) no observan diferencias significativas tras espermatizar variando el número de espermatozoides por dosis de 50 a 100 millones. Colas (1979) no aprecia diferencias significativas tras emplear dosis de 0.5 ml a concentraciones de 500, 400 y 300 millones por vía cervical. Zlatarev (1976) indica que el número de espermatozoides óptimo para realizar una espermatización manual es de 80 millones en un volumen de 0.2 ml, llegando además a la conclusión que el empleo de dosis de 40 millones provocan un descenso significativo de la fertilidad.

Martín y Watson (1976) utilizaron dosis de 100 millones de espermatozoides y consiguieron unos resultados de fertilidad superiores a los obtenidos con 25 millones. Schindler y Amir (1973) no encontraron diferencias significativas al variar la concentración de las dosis de 120 a 80 y 40 millones en volúmenes de 0.15, 0.10 y 0.05 ml respectivamente. Laghford (1982) tras realizar la espermatización manual con espermatozoides diluidos a 200-400 millones en un volumen de 0.5 ml no observó diferencias significativas con los resultados obtenidos mediante monta natural en ovejas con celo inducido. Además concluye que el uso de dosis con una concentración inferior a 100 millones de espermatozoides, en un volumen de 0.5 ml, provoca un marcado descenso de la fertilidad.

No obstante los progresos conseguidos en la congelación del espermatozoides caprino junto a la técnica de espermatización manual, han permitido reducir el número de espermatozoides hasta 60-100 millones espermatozoides móviles por dosis, sin disminuir de forma significativa la fertilidad (Evans y Maxwell, 1987; Corteel y col., 1988; Corteel y Leboeuf, 1990). Sin embargo, para Romano y Fernández-Abella (1997), el mínimo número de espermatozoides requeridos para obtener óptimos resultados en la espermatización manual del ganado caprino es de 120 millones espermatozoides por dosis seminal, frente a sólo 60 millones espermatozoides para un salto en monta natural (Fulkerson y col., 1982). Vázquez y col. (1998) recomiendan emplear dosis con 100 millones espermatozoides viables en volúmenes de 0.25 ml, cuando trabajamos con nuestras razas autóctonas.

### **3.3.3.6 Adición de crioprotectores a los diluyentes del espermatozoides caprino**

Aunque en la bibliografía se recogen gran variedad de agentes crioprotectores que se pueden emplear en la congelación, como el glicerol, el DMSO, el 1,2-propanodiol y el etilenglicol; azúcares como la glucosa, fructosa, sacarosa, rafinosa y la lactosa; y proteínas y lipoproteínas como la yema de huevo o suero sanguíneo, el glicerol ha venido empleándose de forma casi exclusiva en la conservación del espermatozoides caprino desde su descubrimiento por Polge, Smith y Parkes (1949).

Para Singh y col. (1995), el glicerol sólo o en combinación con la lactosa obtiene mejores resultados de movimiento progresivo, integridad de acrosoma y porcentaje de espermatozoides vivos a la descongelación que el DMSO. Resultados similares obtuvieron Molina y col. (1994) en estudios realizados sobre la incorporación de crioprotectores penetrantes en los diluyentes de congelación de espermatozoide ovino.

El DMSO penetra de forma rápida a través de la membrana plasmática del espermatozoide, ejerciendo su acción crioprotectora, no obstante en morueco se ha observado un efecto tóxico durante el proceso de refrigeración, disminuyendo la viabilidad del espermatozoide a la descongelación (Jones, 1965). Sin embargo, el glicerol aunque no se conoce completamente su efecto crioprotector durante el proceso de refrigeración y congelación-descongelación, penetra a menor concentración equilibrando la presión osmótica e interfiriendo en el incremento de solutos para impedir la nucleación y la formación de cristales de hielo (Meryman, 1966). Recientemente se ha descubierto, que el glicerol forma además fuertes uniones con los fosfolípidos de la membrana plasmática del espermatozoide, durante el proceso de congelación (Anchoroguy y col., 1987) e interacciona con ella, uniéndose a proteínas y glicoproteínas (Armitage, 1986), lo que le confiere la mejor efectividad como crioprotector (Molina y col., 1994).

Bien es conocido que el efecto crioprotector del glicerol depende de su concentración (Colas, 1975; Watson y Martin, 1975; Joshi, 1990); sin embargo, la literatura no coincide en la proporción de glicerol a añadir con el fin de obtener los mejores resultados de viabilidad espermática a la descongelación. Generalmente, se ha venido incorporando al diluyente a proporciones que varían entre un 4 y 7% (Corteel, 1974; Chauhan y Anand, 1990; Evans y Maxwell, 1990; Ritar y Salamon, 1991) sólo o en combinación con DMSO al 1% (Singh y col., 1995). Drobnis y col. (1982) observan que la proporción de glicerol más beneficiosa entre 0%, 4% y 7% es el 7%. En cambio Salamon y Ritar (1982) aprecian que el 4% obtiene mejores resultados que el 2.5% y 5.5%. Deka y Rao (1986) obtienen que el 4.6% de glicerol favorece a la integridad del acrosoma y el 6% al movimiento espermático.

Watson y Martin (1975) aprecian que la combinación de yema de huevo con glicerol en los diluyentes de esperma caprino ofrece efectos beneficiosos sobre la viabilidad del mismo a la descongelación. Pérez y Mateos (1995) observan una interacción entre la cantidad de glicerol y la composición del diluyente, alcanzándose los mejores resultados cuando emplean el 4% en el diluyente Tris-yema de huevo y el 8% en el yema de huevo-leche. Así pues, Snedeker y col. (1970) obtienen los mejores porcentajes de movimiento progresivo a la descongelación empleando el diluyente Tris-yema de huevo con un 6% de glicerol y DMSO al 1%.

Salamon (1968) en trabajos comparativos entre los crioprotectores etilenglicol y glicerol empleados a la misma concentración, observa una superioridad significativa del glicerol en la mayoría de los parámetros estudiados, siempre y cuando las concentraciones fueran superiores al 2.8%; sin embargo, otros autores concluyen que el etilenglicol a bajas concentraciones (1.7%) se comporta de forma similar al glicerol en cuanto a movimiento a la descongelación, aunque proporciona una mayor protección del acrosoma (Salamon y Maxwell, 1995b; Moraes y col., 1998).

Por otro lado, Singh y col. (1995) concluyen que la lactosa en combinación con el glicerol tiene un mayor efecto crioprotector que el glicerol sólo, y esta actividad aumenta conforme incrementamos la concentración de lactosa, como se ha demostrado en el toro (Krishnamoorthy, 1981). La lactosa realiza su efecto crioprotector manteniendo la osmolaridad del diluyente (Salisbury y col., 1978) y permite disminuir la proporción de glicerol hasta el 5%, sin producir ningún efecto negativo sobre el movimiento espermático a la descongelación (Krishnamoorthy, 1981).

Por todo esto, probablemente el nivel óptimo de glicerol dependa de varios factores entre los que destacan la composición del diluyente y la cantidad de otros crioprotectores presentes en el mismo (Pérez y Mateos, 1995).

Existe gran controversia en cuanto al método de glicerolización a emplear en la congelación del esperma caprino, si bien en la mayoría de los trabajos se demuestra que

la adición en un solo paso y de forma gradual del glicerol a temperaturas de laboratorio a +37°C, mejora la calidad del esperma congelado-descongelado (Salamon y Ritar, 1982 en Angora; Tuli y Holtz, 1994 en Boer). Resultados similares se han descrito en morueco (Salamon, 1968; Lightfoot y Salamon, 1969); sin embargo, Colas (1975) en morueco, obtiene mejores resultados de movimiento a la descongelación cuando la glicerolización la realiza a +4°C. En caprino Deka y Rao (1986) aprecian mayores porcentajes de movimiento a la descongelación cuando la glicerolización se realiza a +5°C.

### **3.3.3.7 Proceso de equilibrado**

Una vez diluido el esperma es necesario permitir que éste se estabilice, de modo que los espermatozoides estén bien protegidos durante el proceso de congelación-descongelación. El efecto que la duración del periodo de equilibrado, tiene sobre la congelabilidad del esperma caprino, ha sido poco estudiado (Salamon y Ritar, 1982; Deka y Rao, 1986). Existen pautas de congelación del esperma caprino que no utilizan este periodo de equilibrado (Corteel, 1974), a pesar de constituir una etapa de gran importancia en la congelación del esperma en otras especies.

Durante el equilibrado se produce un descenso de la temperatura del esperma desde los +20-30°C hasta +5°C, el cual debe realizarse a velocidad uniforme y durante un periodo de 1.5-2 horas (Evans y Maxwell, 1990). Chauhan y Anand (1990) observan una mayor viabilidad del esperma tras realizar un período de equilibrado de 3 horas a +5°C; sin embargo, Pérez y Mateos (1994) aprecian que un período de equilibrado de 2 horas a +5°C mejora de forma considerable los porcentajes de espermatozoides móviles y formas normales a la descongelación, así como la calidad del movimiento y el porcentaje de acrosomas dañados, aunque este último en menor grado.

Para Mareco y Arosteguy (1994), este periodo varía entre 2-6 horas, obteniendo mejores resultados de viabilidad a la descongelación cuando el periodo de equilibrado se extiende a 3-4 horas. Asimismo, Vázquez y col. (1998) en las razas Murciano-Granadina, Malagueña, Verata y del Guadarrama, observan que el proceso de

equilibrado a +5°C, empleando diluyente Tris, no debe de sobrepasar las 4 horas ya que se produce un descenso considerable de la viabilidad espermática.

### **3.3.3.8 Método de envasado**

Existe escasa bibliografía sobre el envasado del esperma caprino congelado-descongelado, sin embargo si hay algunos estudios en morueco (Maxwell y col., 1995), que obtienen los mejores resultados de fertilidad con el esperma envasado en pellets; sin embargo, la demanda de mercado hace que otros tipos de envases tomen hoy por hoy una mayor importancia, como las pajuelas francesas selladas de 0.25 y 0.5 ml con alcohol de polivinilo o por ultrasonidos.

Existen distintas opiniones en lo que se refiere a la influencia del material del envase, sobre la viabilidad del esperma congelado-descongelado. En varios estudios comparativos entre pajuelas y pellets, unos autores obtienen mejores resultados de viabilidad y fertilidad con las pajuelas, mientras que otros los obtienen con los pellets. Para Hunton y col. (1987) no existen diferencias estadísticamente significativas en la fertilidad obtenida entre en el esperma congelado-descongelado en pellets o en pajuelas, tras la espermatización intrauterina vía laparoscópica

Para Maxwell y col. (1995) los índices de fertilidad del esperma congelado-descongelado en pellets son superiores a los obtenidos en pajuelas y además concluyen que los resultados de congelabilidad y movimiento a la descongelación del esperma envasado en pajuelas de 0.5 ml son superiores a los obtenidos en las de 0.25 ml.

### **3.3.3.9 Proceso de congelación**

El proceso de congelación expone a las células espermáticas a una pérdida de agua y a un incremento de la concentración de solutos intra y extracelulares, de lo que deriva la búsqueda de una velocidad óptima de congelación, para prevenir la formación de cristales intracelulares y minimizar el tiempo de exposición a la concentración de solutos. No obstante, la disminución de la temperatura debe realizarse de forma más o

menos lenta, con el fin de mantener las características de las proteínas del plasma seminal que interaccionarán con las del núcleo espermático (García y col., 1993).

En la bibliografía encontramos discrepancias entre autores, en lo que respecta al tiempo de exposición a vapores de nitrógeno líquido, así como, la distancia de separación entre las pajuelas y la superficie del líquido. Por otro lado, el comienzo de la producción de cristales de hielo y el patrón de congelación del esperma depende del tamaño del envase y del tipo de soporte de las pajuelas, no siendo igual la capacidad de preservación en pajuelas de 0.5 ml que en 0.25 ml (Ritar y col., 1990a).

Además, los espermatozoides son muy sensibles a la exposición prolongada a vapores de nitrógeno líquido, mejorando su supervivencia cuando se colocan a 4 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido durante de 30 segundos o más (Corteel, 1974; Ritar y col., 1990a). Para Ritar y col. (1990a), la viabilidad espermática se ve seriamente afectada en aquellas pajuelas colocadas sobre vapores de nitrógeno líquido por un período inferior a 10 segundos. Tuli y Holtz (1992), observan mejor viabilidad espermática cuando colocan las pajuelas a una distancia de 2 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido durante 8-9 minutos. Para Vázquez y col. (1998), la congelación en vapores de nitrógeno líquido debe de realizarse durante al menos 10 minutos.

Maxwell y col. (1995), obtienen un mayor porcentaje de movimiento y viabilidad espermática a la descongelación, cuando las pajuelas de 0.25 y 0.5 ml son colocadas a 6 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido.

### **3.3.3.10 Proceso de descongelación**

El proceso de congelación-descongelación, es tan importante como la fase de refrigeración, en cuanto al impacto que éstas tienen sobre la viabilidad del espermatozoide tras la descongelación (Mazur, 1985). Las variaciones en la temperatura de congelación y descongelación influyen inevitablemente en la proporción de espermatozoides móviles, provocando además cambios estructurales, bioquímicos y funcionales en la célula espermática.

Según Salamon y Maxwell (1995a) la mayoría de los investigadores utilizan temperaturas entre los 38-42°C para descongelar esperma envasado en minipajuelas. Sin embargo, otros autores realizan la descongelación a temperaturas de 70-75°C (Aamdal y Andersen, 1968; Fiser y col., 1987; Grotte y col., 1992).

Aamdal y Amdersen (1968) obtienen una mayor recuperación de las células espermáticas cuando se descongelan sumergidas en agua a +35°C, frente a la descongelación en agua fría a +5°C o a temperatura ambiente a +20°C. Según Rodríguez y col. (1975), el movimiento espermático a la descongelación aumenta significativamente cuando se realiza la descongelación en agua a +55°C durante 8 segundos frente a la descongelación en agua a +5°C durante 3 minutos.

Rugg y col. (1977) observaron una mayor recuperación de las células espermáticas tras descongelar en un baño maría con agua temperada a +75°C durante 7 segundos en relación a la descongelación a +35°C durante 12 segundos y a +3°C durante 2 minutos. Hube y Uribe (1980) en toro, concluyen que la descongelación del esperma en agua a +40°C durante 10 segundos proporciona una mayor recuperación espermática, en cuanto a porcentajes de integridad de acrosoma y movimiento espermático que en agua a +17°C durante 20 segundos, agua de hielo a +5°C durante 2 minutos y a temperatura ambiente a +21°C durante 6 minutos.

Söderquist y col. (1997) observan que la descongelación de pajuelas a +70°C durante 5 segundos, presenta mayores porcentajes de acrosomas intactos cuando se compara con una descongelación a +35°C durante 12 segundos. En la misma línea, Vázquez y col. (1998) en nuestras razas autóctonas, concluyen que la descongelación del esperma debe realizarse de forma rápida al baño maría a +60°C durante 6 segundos, dejándola a continuación a temperatura ambiente para que adquiera, de forma suave los últimos grados de recuperación del cambio de estado.

Todo esto indica, que una descongelación rápida a temperaturas elevadas provocará una mejor recuperación espermática con un menor daño celular, por pasar

más rápidamente la temperatura crítica ( $-60^{\circ}\text{C}$  a  $-15^{\circ}\text{C}$ ) donde se producirá el mayor daño sobre el espermatozoide.

### **3.3.4 Valoración del esperma congelado-descongelado**

#### **3.3.4.1 Movimiento a la descongelación**

La estimación del movimiento espermático inicial, junto al movimiento tras un período de incubación a temperatura corporal después de la descongelación a diferentes temperaturas y tiempos, han sido comúnmente utilizadas como pruebas de viabilidad espermática (Saacke y White, 1972).

Para Garde (1993) el test de endósmosis celular, junto al movimiento individual tras la incubación del esperma durante 1 hora a  $+39^{\circ}\text{C}$ , son los parámetros espermáticos que ofrecen mayor información y más fiable acerca del poder fecundante del esperma congelado-descongelado.

Sin embargo otros autores indican que existe una mayor correlación de la prueba de longevidad, con la fertilidad potencial del esperma congelado-descongelado, si ésta se realiza inmediatamente después de la descongelación (Saacke y col., 1980; Pace y col., 1981), ya que el propio periodo de incubación eleva esta correlación con la fertilidad (Saacke y White, 1972; Fiser y col., 1991).

Según Fiser y col. (1991), el mantenimiento del movimiento espermático tras un período de incubación, refleja la probabilidad del esperma de permanecer viable en el aparato genital de la hembra. No obstante, debemos de tener en cuenta que el movimiento espermático decrece con forme aumenta el tiempo y temperatura de incubación (Fiser y col., 1991; Valcárcel y col., 1994; Bag y col., 2002a y b).

Por otra parte, la viabilidad del esperma congelado-descongelado depende, entre otros factores, de la temperatura inicial de congelación (Graham y col., 1978), que a su vez tiene un efecto significativo sobre el movimiento y velocidad espermática registrada a la descongelación (Bag y col, 2002a y b).

### **3.4 Espermatización manual (EM) con espermatozoides congelado-descongelado**

La espermatización manual (EM) tiene sus limitaciones, por un lado debido a la dificultad del espermatozoides caprino para ser congelado-descongelado, y por otro, a las dificultades de introducir esta técnica reproductiva en esta especie que continúa siendo explotada, en la mayor parte del mundo, mediante sistemas ganaderos tradicionales con poca evolución técnica y de manejo (Mascarenhas, 1994). Sin embargo, la EM en ganado ovino tiene un presente firme y un esperanzador futuro, demandada actualmente no sólo en núcleos de selección de razas autóctonas sino también en las poblaciones basales de dichas agrupaciones raciales y en las agrupaciones mixtas, debido a la posibilidad de mejorar genéticamente a través del empleo de espermatozoides congelado-descongelado.

El cérvix de la oveja presenta una serie de pliegues, con una disposición excéntrica de cada uno de los anillos fibrosos dejando una estrecha luz, con lo que es prácticamente imposible introducir el catéter hasta el cuerpo del útero, y para realizar la EM intrauterina se deben utilizar técnicas laparoscópicas con las que se obtienen buenos resultados de fertilidad (Salamon y Maxwell, 1995b). Sin embargo, tanto en la vaca como en la cabra, aunque su cérvix está constituido por pliegues de tejido músculo-conectivo, en el momento del celo se relaja debido al efecto de los estrógenos, lo que permite el paso de la pipeta de inseminación empleando la técnica de EM intrauterina vía cervical descrita por Fougner (1976). Esta técnica de espermatización es la más empleada en el ganado caprino (Bongso y col., 1982), aunque el depósito intrauterino mediante el empleo de técnicas laparoscópicas está produciendo grandes éxitos en cuanto a porcentajes de concepción y nacimientos.

La EM del ganado caprino en España se realizó de forma casi experimental hasta finales de los años 90, tanto con espermatozoides refrigerado como congelado-descongelado (Vázquez y col., 1998), y es a partir de este momento en el que se organizan grupos de investigación con el fin de poner en marcha la metodología más adecuada en esta especie (Tapia y Herrera, 1995; Carrizosa y col., 1997; Lorenzo y col., 1997).

Actualmente la EM se practica en muchos países incluido España, aunque su aplicación comercial no esté del todo extendida, a pesar de la importancia del ganado caprino como productores de leche y carne, debido fundamentalmente al problema de usar esperma congelado-descongelado, ya que desde el proceso de refrigeración se produce una reducción de la viabilidad espermática.

A estas ventajas que supone el empleo de la EM, conocidas y demostradas en otras especies, tenemos que añadir la firma de acuerdos sobre Biodiversidad para la conservación de recursos zoogenéticos, que en lo que respecta al ganado caprino, el catálogo oficial de razas autóctonas publicado en el BOE nº 279/97 incluye como razas autóctonas en fomento la Agrupación Caprina Canaria, Malagueña, Murciana y Verata; como razas autóctonas de protección especial (R.D. 1682/1997) la Agrupación de las Mesetas, Azpi-Gorri, Blanca Andaluza, Blanca Celtibérica, Bermeya, del Guadarrama, Florida, Gallega, Ibicenca, Jurdana, Mallorquina, Moncayo, Negra Serrana, Pirenaica, Payoya y Retinta.

### **3.4.1 Índices de fertilidad**

Los resultados de fertilidad obtenidos por EM se encuentran relacionados tanto con las condiciones fisiológicas del macho como de la hembra.

Las principales barreras físicas con las que se encuentra el esperma, durante su progresión por el aparato genital femenino, son el complejo cervix-moco cervical (Mullins y Saacke, 1989), tanto en monta natural como en EM cervical, útero (Mitchell y col., 1985) y la unión útero-tubárica (Hunter y Wilmut, 1984). Por todo esto, el número final de espermatozoides que alcanza el oviducto es muy pequeño en proporción al total espermaticado (Saacke, 1982), observándose además que esta población presenta mejor viabilidad, así como mayores porcentajes de espermatozoides morfológicamente normales (Saacke y col., 1988). Una consecuencia directa de este proceso de selección, será que en eyaculados de baja calidad es preciso aumentar el número de espermatozoides por dosis, para conseguir el mínimo de espermatozoides

viabiles en el punto de fertilización. Si bien, la fertilidad del macho se incrementa a medida que aumentamos el número de espermatozoides, existe un umbral a partir del cual los factores limitantes de la hembra se hacen importantes.

En morueco existen varios trabajos en los que se establece una no muy alta correlación entre los parámetros que reflejan la calidad del eyaculado y posteriores porcentajes de fertilidad, debido a la interacción de diversos factores como la objetividad o subjetividad de las pruebas, calidad de la muestra seminal aplicada en la EM y efecto del transporte espermático a través del aparato genital de la hembra (Artiga y col., 1994). La fertilidad obtenida en la EM depende también de una serie de factores que inciden directamente sobre la misma y entre los que encontramos además de la calidad del esperma utilizado ya referida (Salisbury, 1961; Artiga y col., 1993; Karatzas y col., 1997), el lugar de depósito (intracervical o intrauterino) (Fougner, 1976; Artiga y col., 1993), número de espermataciones (Artiga y col., 1993; Karatzas y col., 1997), estación reproductiva (Artiga y col., 1993), raza (Artiga y col., 1993; Karatzas y col., 1997), edad (Chemineau y col., 1991; Artiga y col., 1993), exposición al macho (Romano, 1993 y 1994), climatología, respuesta de la hembra al tratamiento de sincronización y momento de espermatación con respecto a la ovulación (Salisbury y col., 1978; Rao y Bhattacharyya, 1980; Ozsar y col., 1988; Artiga y col., 1993).

Por otra parte, la fertilidad obtenida mediante EM con esperma congelado-descongelado depende del grado de dilución, método de congelación, temperatura y tipo de glicerolización, raza y condiciones climáticas (Colas, 1975; Salamon y Ritar, 1982). Corteel (1980) obtuvo mejores resultados de fertilidad empleando el diluyente lácteo, mientras que Salamon y Ritar (1982) los obtuvieron con Tris-yema de huevo. Sin embargo, Singh y col. (1995) concluyen que el diluyente empleado en la congelación no influye significativamente sobre la fertilidad obtenida en EM. En cualquier caso hay que tener en cuenta que uno de los principales factores que incide sobre los resultados de EM es la ganadería (Fantova y col., 1998).

La doble espermatización es un método aceptado para incrementar la fertilidad, aunque Ritar (1993) concluye que ésta no mejora los resultados de fertilidad si el número total de espermatozoides depositados por espermatización única es mayor. Asimismo, sugiere que el número óptimo de espermatozoides móviles en esperma fresco o congelado-descongelado debe ser de  $120 \times 10^6$  espermatozoides por dosis, y que un incremento en este número no va a mejorar los resultados de fertilidad. Corteel y col. (1988) y Ritar y Ball (1993) obtuvieron una fertilidad menor después de dos espermatizaciones, lo que explicaron como resultado del estrés adicional al que eran expuestas las hembras durante el manejo, y además concluyeron que la respuesta a la segunda espermatización depende del tiempo a la que se fije y de su relación con la ovulación y será baja o nula si la primera se realizó en el momento óptimo.

En cuanto al momento idóneo de realizar la espermatización, Hafez (1987) trabajando con ganado caprino, recomienda realizar la EM 12 horas después de presentar signos de celo, seguido de una segunda inseminación al día siguiente de comenzar el estro. Karatzas y col. (1997) concluyen que la doble espermatización con esperma fresco o congelado-descongelado a las 36 y 60 horas obtiene mejores resultados de fertilidad que una única a las 50-55 horas.

Por otro lado, la profundidad a la que se deposite el esperma en el aparato genital de la hembra va a influir sobre manera en los resultados de fertilidad, mejorando cuanto más profundo se realice el depósito del esperma (Ritar y Salamon, 1983). En este sentido Ritar (1993) aprecia que con la espermatización cervical una menor proporción de espermatozoides atraviesa el pliegue cervical, por lo que los subsiguientes niveles de fertilidad serán menores. Sin embargo, Roca y col. (1997) en Murciano-Granadina, no encuentran diferencias significativas de fertilidad entre el depósito cervical o intrauterino, y opinan que las posibles diferencias se relacionan más con el número de espermatozoides depositados en el aparato genital de la hembra.

Por otra parte, la EM del ganado caprino esta íntimamente ligada a los tratamientos de inducción y sincronización de celos con los que se han obtenido

resultados de fertilidad muy aceptables tanto en la estación reproductiva como fuera de ella (Leboeuf, 1989). Nuestros resultados de fertilidad obtenidos mediante EM simple a las 45 horas tras la retirada de esponjas con espermatozoos diluido y conservado a +5°C son de 71.40% (Dorado y col., 2002c). Sin embargo, varios trabajos demuestran que la tasa de fertilidad es mayor en hembras sincronizadas con progestágenos durante la estación reproductiva (Corteel, 1975a, 1976 y 1980; Baril y col., 1993).

Del mismo modo, se sabe que la reducción de la duración de los tratamientos hormonales se traduce en un aumento de la fertilidad (Corteel y col., 1988), ya que los tratamientos prolongados con progestágenos disminuyen la supervivencia y el transporte de los espermatozoides en el aparato genital (Leboeuf y col., 1998). Asimismo, el uso de forma repetida de los tratamientos de inducción y sincronización de celos en cabras se ha relacionado con un descenso de la fertilidad después de la EM (Baril y col., 1992), como consecuencia de un retraso en la aparición de los celos y un aumento en los niveles plasmáticos de Anticuerpos anti-eCG (Baril y col., 1993).

## **4 MATERIAL Y MÉTODOS**

## 4.1 Material

### 4.1.1 Animales

Todos los animales, utilizados en este estudio, pertenecen al mismo rebaño, localizado en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo Ganadero (CIDG) de la Diputación Provincial de Córdoba, ubicadas a 3 Km del Campus de Rabanales de la Universidad de Córdoba, donde se encuentra el laboratorio de Reproducción y Obstetricia del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria.

Dicho rebaño pertenece a la Asociación Española de Criadores de Ganado Caprino de Raza Florida (ACRIFLOR) y fue cedido por la misma para realizar esta experiencia. La zona donde se realizó el estudio se localiza en el Suroeste de la Península Ibérica entre las coordenadas geográficas 37° 53' de latitud Norte, 4° 46' de longitud Oeste y 110 m de altitud.

**Tabla 1. Temperatura ambiental media, máxima y mínima, pluviometría y horas de luz según la estación de año.**

ESTACIÓN	TEMPERATURA (°C)			PLUVIOMETRÍA (l/m <sup>2</sup> )	Horas de luz
	MEDIA	MÍNIMA *	MÁXIMA **		
<b>Primavera</b>	22.84	13.93	31.76	48	13:58:09
<b>Verano</b>	28.04	20.52	35.56	23	13:25:59
<b>Otoño</b>	13.45	7.42	19.48	566	10:13:03
<b>Invierno</b>	12.73	7.09	18.38	397	10:56:51

\* media de la temperatura mínima diaria registrada a las  $7.39 \pm 0.13$  h.

\*\* media de la temperatura máxima diaria registrada a las  $17.49 \pm 0.09$  h.

El clima de la zona es de tipo mediterráneo con un índice de precipitaciones de 1034 l/m<sup>2</sup> y durante el periodo de estudio se registraron unas temperaturas máximas y mínimas de +44°C en junio y agosto de 2001, y de 0°C en noviembre de 2001, respectivamente; oscilando el intervalo de tiempo entre el amanecer y la puesta de sol,

entre 14:40:06 h. en junio y 9:39:06 h. en diciembre de 2001 (observaciones recogidas por el Instituto Nacional de Meteorología).

#### **4.1.1.1 Machos**

En total se han utilizado 10 machos de 8 meses de edad, entre los que se han seleccionado a 2, que han sido los donantes de esperma para crear el banco congelado. En el control de salida a celo de las hembras utilizadas en el programa de espermatización manual (EM), se emplearon 2 machos adultos provistos de mandil, de 5 y 6 años de edad, sexualmente maduros y probados como reproductores.

#### **4.1.1.2 Hembras**

Todas las cabras utilizadas en el programa de EM, tenían edades comprendidas entre 1 y 5 años y más de un parto; presentaban un buen estado de carnes y se mantuvieron en régimen de estabulación permanente. En todas, el intervalo desde el último parto a la cubrición, fue de al menos 120 días y se eliminaron las hembras que habían abortado, viejas o con problemas reproductivos.

#### **4.1.2 Instalaciones**

Entre las instalaciones, localizadas en el CIDG, diseñadas para cría y producción del rebaño de cabras utilizado para el estudio, se encuentran un corral cebadero de 32x23 metros (736 m<sup>2</sup>), con un apartadero para el manejo de 6x6 metros (36 m<sup>2</sup>) que hemos empleado para realizar la valoración reproductiva de las hembras utilizadas en el programa de EM, aplicar los tratamientos conceptivos y realizar el diagnóstico precoz de gestación por exploración ecográfica interna. Para la recogida de esperma se ha utilizado un pequeño corral de 7x3 metros (21 m<sup>2</sup>); la detección de celos se realizó en un apartadero de 10x6 metros (60 m<sup>2</sup>) contiguo al corral de las hembras, y como zona de machos se utilizó un pequeño corral de 10x8 metros (80 m<sup>2</sup>) situado a unos 16-18 metros de distancia del de las hembras.

El laboratorio de Reproducción de 40 m<sup>2</sup>, se ubica en las instalaciones del Hospital Clínico Veterinario S.L. de la Universidad de Córdoba, adscritas al Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria, en el Campus de Rabanales a 7 Km de Córdoba.

#### **4.1.3 Recogida de esperma**

- Vagina artificial para ovino y caprino, ajustable con válvula. Minitüb.
- Termómetro, para vagina artificial, de mercurio hasta +100°C. Minitüb.
- Colectores de vidrio graduados de 4 ml. Minitüb.
- Caja de Porex isotérmica, con tapa para el transporte del esperma a +37°C hasta el laboratorio.
- Lubricante no espermicida estéril, Priority Care<sup>®</sup>.

#### **4.1.4 Valoración espermática**

- Solución Dulbecco's buffer di-fosfato (DPBS), con 25 mg/l de Sulfato de Kanamicina y 1 x 20 ml de albúmina al 0.4% w/v. Emcare<sup>®</sup>.
- Diluyente Merck I<sup>®</sup> sin antibiótico. Minitüb.
- Cámara de conteo Neubauer. Brand.
- Cámara de conteo Makler. Sefi-Medical Instruments Ltd.
- Cubreobjetos 22x22 para cámara de conteo. Menzel-glaser.

- Pipeta mezcladora de hematíes. Blaubrand.
- Tinción Giemsa ultrarrápido Diff-Quik<sup>®</sup>. Dade Behring.
- Tinción para morfología y determinación de integridad de acrosoma Spermac<sup>®</sup>. Minitüb.

#### **4.1.5 Dilución, procesado y refrigeración del esperma**

- Agitador eléctrico Heidolph mod. Reax 2000.
- pHmetro Denver Instrument mod. Basic.
- Estufa Pselecta mod.205, ajustadas a +37°C.
- Pletina térmica Pselecta mod. Plactronic, ajustadas a +37°C.
- Microscopio óptico Olympus mod. Bh2-Sc, con contraste de fases de Olympus. Provisto de ocular de 10x/20 L aumentos y objetivos de 4, 10, 20, 40 y 100.
- Placa atemperada para microscopio mod. f01.
- Cámara de televisión en blanco y negro Sony mod ccd-iris, incorporada al microscopio óptico.
- Monitor en color Mitsubitshi mod. eum-1419a, de 13”.
- Ordenador Chaplet mod. Pentium 200 mmx.

- Sistema de análisis automatizado de espermatozoides “Sperm Class Analyzer” (SCA.). Microptic.
- Microscopio óptico Leitz mod. Dialux 20 ed. Provisto de ocular de 10x/18 mm aumentos y objetivos de 4, 10, 40 y 100.
- Cámara de televisión en color Sony mod ccd-iris, ssc-c350p, incorporada al microscopio óptico.
- Monitor en color Sony mod. Trinitron kx-14cp1, de 13”.
- Fotómetro Spermacue, para la medición de la densidad del espermatozoides. Minitüb.
- Micropipeta Autoclave Nichipet 0.5-10 µl.
- Micropipeta Eppendorf Reference 10-100 µl.
- Micropipeta Eppendorf Reference 50-250 µl.
- Centrífuga Jouan mod. br4i.  $rcf=1.118 r n^2$ . Con rotor s40 (max. load 2.00 Kg. y max. rpm 4300).
- Diluyente Triladyl<sup>®</sup> a base de agua bidestilada, ácido cítrico, fructosa, tampón Tris (tris-[hidroximetil]-aminometano), glicerol y una concentración final de 15 mg de Tilosina, 25 mg de Gentamicina, 15 mg de Lincomicina y 30 mg de Espectinomicina para 100 ml Minitüb.
- Agua para análisis –ACS. Panreac<sup>®</sup>.

- Yema de huevo de gallina fresco.
- Filtro para yema de huevo, estéril, forma embudo. Minitüb.
- Sodio dodecil-sulfato (SDS), tubo pasta 30 gr, Equex-STM<sup>®</sup>. Minitüb.
- Diluyente lácteo con un 20% de yema de huevo y 4% de glicerol, Gent<sup>®</sup>. Minitüb.
- Diluyente Biladyl A<sup>®</sup>, sin Glicerol compuesto por agua bidestilada, ácido cítrico, fructosa, tampón Tris (tris-[hidroximetil]-aminometano), y una concentración final de 100 µg de Tilosina, 500 µg de Gentamicina, 300 µg de Lincomicina y 600 µg de Espectinomicina para 0.02 ml. Minitüb.
- AB-Cocktail<sup>®</sup> para Biladyl y Triladyl LL. Minitüb.

#### **4.1.6 Envasado**

- Equipo combinado de soldadura por ultrasonido pgh 420. Branson Ultrasonidos.
- Equipo automático de envasado y sellado de pajuelas francesas de 0.5 y 0.25 cc con bomba de vacío, sellado por ultrasonidos y control electrónico, Phillip mp 133. Minitüb.
- Bomba de vacío de baja densidad, 30-60 Hg, con válvula ajustable y manómetro. Minitüb.
- Impresora automática mt-65/133 az, con barra antiestática. Minitüb.
- Pajuela mediana francesa (pack 2.500 uni.) 0.5 cc. Minitüb.

- Alcohol polivinílico.(CH<sub>2</sub>CHOH x 40-46 centipoises hidrolizado 87-89%), Dr. Theodor Schuchardt. Gmb & Co.
- Tubo para inyectores de 0.25 y 0.5 cc, largo 450 mm, con punta rectangular. Minitüb.
- Empaquetaduras para tobera envasadora y aspiradora para pajuelas francesas 0.25 y 0.5 cc. Minitüb.

#### **4.1.7 Congelación-descongelación**

##### **4.1.7.1 Congelación:**

- Recipiente para transporte de esperma diluyococonservado a +5°C. Equitainer<sup>®</sup>.
- Caja isotérmica con tapa, medidas interiores 745x345x250 mm. Minitüb.
- Chasis para pajuelas de 0.5 cc, capacidad para 36 pajuelas. Minitüb.
- Rampa de congelación horizontal para 100 pajuelas de 0.5 cc. Minitüb.
- Pinza para manipulación de pajuelas de 0.5 cc. imv.

##### **4.1.7.2 Descongelación:**

- Pinza para manipulación de pajuelas de 0.5 cc. imv.
- Caja isotérmica con tapa, medidas interiores 745x345x250 mm. Minitüb.
- Tijeras Mayo 165 mm. Stainless.
- Termómetro de mercurio, hasta +100°C. Minitüb.

#### **4.1.8 Almacenamiento y mantenimiento del banco de esperma**

- Tanque de nitrógeno líquido mve xc 33/22. Telstar.
- Nitrógeno líquido. Air Liquide.

#### **4.1.9 Espermatización Manual (EM)**

##### **4.1.9.1 Inducción y sincronización celos**

- Aplicadores de esponjas vaginales de ovejas y cabras. Intervet.
- Acetato de Fluorogestona (FGA), esponjas vaginales con 45 mg, Chronogest<sup>®</sup>. Intervet.
- eCG liofilizada, inyectables de 1.000 UI, Foligon<sup>®</sup>. Intervet.
- Cloprostenol, inyectable de 250 µg/ml, presentaciones de 10 ml, Estrumate<sup>®</sup>. Schering-Plough.
- Framicetina y sulfatiazol, botes conteniendo 100 gr en polvo, Framicas<sup>®</sup>. Ovejero.

##### **4.1.9.2 Espermatización manual vía cervical:**

- Inseminador cervical, de ovejas y cabras, para pipetas de punta excéntrica. Minitüb.
- Pipeta de inseminación cervical, para ovejas y cabras, con punta excéntrica para esperma fresco o congelado-descongelado. Minitüb.
- Espéculo vaginal para ovejas y cabras, 160 mm, tipo Duokbill. Minitüb.

- Iluminador de proximidad para espéculo, con caja de batería. Minitüb.

#### **4.1.10 Diagnóstico ecográfico de gestación**

- Ecógrafo Medison co.ltd mod. SA-600V, equipado con sonda lineal de 7.5 Mhz, flexible.
- Adaptador rígido de PVC para exploración ecográfica vía rectal.
- Vídeo impresora para ecógrafo Sony, mod. up-860ce, con papel térmico.
- Papel térmico de video-impresora Sony upp-110 hd.
- Gel para examen ultrasónico Aquasonic 100, 5 litros. Parker.
- Guantes de exploración largos, 5 dedos. Sempercare®.

#### **4.1.11 Estudio estadístico**

##### **4.1.11.1 Hardware.**

- Ordenador Authentic AMD, amd Athlon (tm) xp1700.
- Impresora Hewlett Packard mod. Laserjet 6 L.

**4.1.11.2 Software.**

- Paquete Microsoft Office 2000-pro para Windows XP

Microsoft Word 2000

Microsoft Excel 2000

Microsoft PowerPoint 2000

- Paquete Estadístico SPSS 8.0 para Windows.

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Entrenamiento y selección de los donantes de esperma**

Para entrenar a los 10 machos con 8 meses de edad en la recogida de esperma mediante vagina artificial (VA), se sometieron a un ritmo de recogida de 3 saltos por semana. Para facilitar el entrenamiento, siempre se utilizaron como soporte hembras que presentaban externamente signos de celo y receptividad sexual. Durante las primeras sesiones de entrenamiento, se pretendía sólo acostumar a los machos a la presencia de los técnicos y en todas se evitó realizar ruidos y movimientos bruscos. La duración máxima de cada una de ellas, fue de 10 minutos aproximadamente, tras los cuales se devolvía el macho al corral, hubiera o no saltado sobre la hembra.

Se concluyó que la fase de entrenamiento había finalizado, cuando los machos eyaculaban en un período inferior a 5 minutos, desde el momento en que se encontraba en presencia de la hembra, y no perdían la libido, aunque se les obligara a realizar dos o tres montas fallidas antes de realizar la recogida (Pintado y col., 1986).

La selección de los sementales se basó por un lado, en su grado de adaptación a la zona de recogida y a las condiciones específicas del estudio, y que permitieran la recogida de esperma de forma eficaz, rápida y continuada durante el mismo; y, por otro, según su capacidad reproductiva (libido, tiempo a la primera erección, al primer salto), tiempo de reacción (definido como el lapso en segundos que transcurre desde la irrupción del macho en la zona de recogida hasta la eyaculación), eficacia a la cubrición (definido como el número de saltos o montas necesarios para eyacular) y calidad del esperma. No se pudo valorar el parámetro jerarquía, entre el lote de machos estudiados, debido a que las instalaciones no eran adecuadas para poderla observar.

Para recoger los datos obtenidos de esta fase se utilizó una ficha específica para el periodo de entrenamiento en el salto en VA y valoración del esperma (Tabla 26, Anexo 1, Pág. 186).

#### **4.2.2 Recolección de esperma**

Las extracciones de esperma se realizaron empleando una vagina artificial (VA), que se monta, en el momento de usar, revirtiendo los extremos de la camisa de látex sobre el cuerpo, sujetos con 2 ligas flexibles de caucho, para formar una cámara entre cuerpo y camisa donde irá el agua y el aire. Una vez montada, se introduce en una estufa a +42°C y en el momento de emplearla se llena de agua atemperada a +40-42°C y de aire a través de la válvula, hasta conseguir una presión adecuada. A continuación se le acopla un cono flexible de látex (intermediario), el colector de esperma graduado en mililitros y la camisa externa de material sintético opaco y aislante. Antes de utilizarla, se lubrica la entrada de la VA, con un gel no espermicida y estéril.

En todas las recogidas de esperma, se utilizaron hembras en celo, para aportar al macho el estímulo sexual apropiado. La secuencia seguida en cada una fue introducir primero a la hembra, sujeta por un ayudante en la zona de recogida; después se introduce el semental, guiado por otro ayudante que lo mantiene a una distancia de 2-3 metros de la hembra, comprobando en todo momento su grado de interés por la misma. Seguidamente aproximamos el macho a la hembra y tras observarse una ligera erección, con o sin evaginación del pene, se le permite el salto, momento que se aprovecha para servirle la VA, permitiendo que el macho introduzca el pene en la misma y tras eyacular se le retira a la vez que el macho desmonta.

Una vez recolectado el esperma, el colector se transporta al laboratorio, aislándolo de los cambios de temperatura, protegiéndolo de golpes, de la acción directa de la luz solar y manteniéndolo a +37°C durante los 5-10 minutos, que se tarda en el traslado.

#### **4.2.3 Valoración del esperma**

Todos los eyaculados recogidos han sido sometidos al siguiente protocolo de valoración macro y microscópica, realizada en el Laboratorio del Servicio de Reproducción y Obstetricia de la Facultad de Veterinaria.

#### **4.2.3.1 Valoración macroscópica**

Observación visual del eyaculado a través del cristal del colector graduado, observando el volumen (ml), aspecto y color.

El aspecto se clasificó cualitativamente como denso, fluido o acuoso, y según el color se catalogó como blanco lechoso, marfil o amarillento.

#### **4.2.3.2 Valoración microscópica**

Se realiza utilizando una pequeña fracción del eyaculado (0.1-0.2 ml), que se mantiene en estufa a +37°C y protegido de la incidencia de la luz directa; y consiste en el cálculo de los parámetros de movimiento, concentración, morfología espermática e integridad del acrosoma.

##### **4.2.3.2.1 Valoración del movimiento**

###### **4.2.3.2.1.1 Preparación y almacenamiento de los diluyentes**

De los dos diluyentes empleados, uno, Merk I<sup>®</sup>, se prepara el día de su recepción, y tras dividirlo en alícuotas de 20 ml, se almacena en el frigorífico a -18°C, por un periodo máximo de seis meses. El otro diluyente, Solución Dulbecco's buffer di-fosfato (DPBS), Emcare<sup>®</sup>, se almacena a +5°C durante 6 meses sin adicionarle ningún otro componente.

###### **4.2.3.2.1.2 Método de valoración del movimiento**

Tanto en el esperma fresco, como en el congelado-descongelado (apartado 4.2.5, Pág.81), hemos utilizado el equipo de análisis de imagen "Sperm Class Analyzer" (SCA<sup>®</sup>) de Microptic. Para el primero, se prepara una dilución con DPBS, hasta alcanzar una concentración aproximada de 50 millones de spz/ml, atemperado a +37°C. Tras 5 minutos en estufa, se deposita una gota sobre la cámara Makler, atemperada a +37°C en platina calentable y se observa al microscopio de contraste de fases, provisto así mismo de platina regulada a +37°C, con objetivo de 10x y contraste de 20. Se capturan 3 series, en dos gotas diferentes, con el fin de valorar el porcentaje de espermatozoides estáticos, móviles totales (MT) y movimiento rápido progresivo

(MRP), definido como el porcentaje de espermatozoides móviles que poseen una velocidad lineal (VAP)  $>60\mu\text{m/s}$ .

Estos datos son recogidos de forma individual en una hoja de cálculo para su posterior estudio estadístico.

#### **4.2.3.2.2 Concentración**

Empleamos la técnica del hemocitómetro.

- Dilución 1:200, con formalina al 10%, utilizando la pipeta mezcladora de hematíes. A continuación se homogeneiza la muestra de esperma mediante oscilaciones cuidadosas y tras desprejar las 5-10 primeras gotas, se llena por capilaridad la cámara cuentaglobos (p.e. de Neubauer).
- Recuento de espermatozoides: tras dejar sedimentar, horizontalmente, durante 3 minutos, observamos al microscopio con objetivo de 40x, contando únicamente las cabezas de los espermatozoides localizados en las cuatro cuadrículas que conforman la diagonal o las esquinas de la cámara.

La fórmula utilizada para el cálculo de la concentración ha sido:

$$\text{Concentración} = M \times 400 \times 10 \times 200 \times 10$$

- M = media de espermatozoides contados
- 400 = superficie del cuadrado ( $1/400$  de  $\text{mm}^2$ )
- 10 = altura entre la cámara y el cubre ( $1/10$  de mm)
- 200 = factor de dilución
- 10 = conversión de  $\text{mm}^3$  a ml
- Concentración = espermatozoides por ml (spz/ml)

#### **4.2.3.2.3 Morfología espermática**

Se realizó tanto con el espermatozoide fresco, como con el congelado-descongelado, empleando la tinción Diff-Quik<sup>®</sup>, microscopio óptico con objetivo de 40x y las anomalías se han expresado siguiendo la clasificación de Saacke (1970).

##### **4.2.3.2.3.1 Morfología en espermatozoide precongelado**

Se realizó empleando una gota, de la dilución preparada para el cálculo del movimiento, con la que se hace una extensión sobre porta, dejándola secar al aire, y se tiñe con la tinción Diff-Quik<sup>®</sup>, observándose al microscopio con objetivo de 40x, para evaluar el número de espermatozoides con morfología normal, de entre 100-200 células, y expresando el resultado entre 0 y 100%.

##### **4.2.3.2.3.2 A partir del espermatozoide congelado-descongelado**

Se empleó una gota de la dilución preparada para la valoración del movimiento tras un periodo de incubación de 60 minutos a +37°C, realizando una extensión que tras dejar secar al aire, se tiñe y se observa al microscopio con objetivo de 40x, para evaluar el número de espermatozoides normales de entre 100-200 células, y expresando el resultado entre 0 y 100%.

##### **4.2.3.2.4 Integridad de acrosoma**

Se ha valorado antes y después del proceso de congelación-descongelación, empleando en el primer caso una gota de la dilución preparada para el cálculo del movimiento y en el segundo una gota de la dilución realizada para la valoración del movimiento a la descongelación, tras permanecer una hora en estufa a +37°C, realizando una extensión de cada gota en un porta, y tras 10 minutos de secado al aire, se tiñe con la tinción Spermac<sup>®</sup>, observándose al microscopio con objetivo de inmersión (100x), para evaluar el número de espermatozoides con acrosoma íntegro, activado o sin acrosoma (espermatozoide desnudo), contando entre 100-200 células y dando un valor entre 0 y 100% para cada parámetro.

Se elaboraron varias fichas de trabajo en las que se recogen todos los antecedentes referenciados en el presente apartado (Tabla 27, Anexo 1, Pág. 186).

#### **4.2.4 Congelación del esperma**

Utilizamos dos machos con 20 y 21 meses de edad al inicio de la experiencia, que se sometieron ininterrumpidamente durante 14 meses a un ritmo de recogida de 3 saltos por semana. Para la congelación se emplearon dos soluciones diluyoconservadoras diferentes, una compuesta por Tris-ácido cítrico-fructosa-glicerol-yema de huevo-sodio dodecil-sulfato (T); y otra por leche desnatada-glicerol-yema de huevo (L), y todas las dosis fueron sometidas al mismo protocolo de congelación-descongelación, cuyas fases se describen a continuación.

##### **4.2.4.1 Preparación y almacenamiento de los diluyentes**

Se prepararon el día de su recepción en el laboratorio y, tras dividirlos en alícuotas, se almacenaron en el congelador a  $-18^{\circ}\text{C}$  durante el periodo recomendado por el fabricante.

– Método de elaboración del diluyente T:

- El diluyente comercial Triladyl<sup>®</sup> se divide en alícuotas de 10 ml, que se almacenan a  $-18^{\circ}\text{C}$  por un periodo máximo de dos meses.
- A cada alícuota de diluyente, una vez descongeladas a temperatura de laboratorio, se le añade un 20% de yema de huevo filtrada, para cuya obtención se utilizaron huevos de gallina frescos, que previa limpieza y desinfección externa se les extrae la yema, se coloca sobre un papel de filtro esterilizado.
- Finalmente se añade 0.6 ml de pasta Equex- STM<sup>®</sup> por 100 ml de diluyente.

– Método de elaboración del diluyente L:

El diluyente lácteo Gent<sup>®</sup> se divide en alícuotas de 12 ml y se almacena a -18°C durante un periodo máximo de 6 meses.

#### **4.2.4.2 Método de congelación. Separación del plasma seminal mediante centrifugación**

##### **4.2.4.2.1 Preparación y almacenamiento del diluyente de centrifugación**

El diluyente de centrifugación empleado fue el Biladyl A<sup>®</sup> que se preparó el día de su recepción en el laboratorio, y tras dividirlo en alícuotas de 10 ml, se almacenó a -18°C en el congelador por un periodo máximo de 2 meses.

##### **4.2.4.2.2 Método de centrifugación**

El espermatozoide se diluye en solución de Biladyl A<sup>®</sup>, atemperada a +37°C, a una proporción de 1:9 y posteriormente se centrifuga a 2.500 r.p.m. durante 20 minutos a temperatura de laboratorio (25°C), y se elimina el sobrenadante por completo, utilizando una pipeta pasteur y se le añade el diluyente correspondiente hasta alcanzar la concentración deseada.

##### **4.2.4.3 Cálculo de las dosis**

Las dosis seminales se calculan en base al porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo rápido (MRP), de tal modo, que cada una lleva  $125 \times 10^6$  espermatozoides con MRP en 0.5 ml.

De esta forma conocido el número de pajuelas se calcula la cantidad de diluyente a añadir para completar el volumen necesario, a un ritmo de 1 ml por minuto.

Fórmula:

$$\frac{\text{Volumen} \times \text{Concentración} \times \% \text{MRP}}{125 \times 10^6} = \text{unidades}$$

#### **4.2.4.4 Equilibrado**

Tras la dilución y un período de adaptación a los diluyentes de congelación de 5-10 minutos a temperatura de laboratorio, ambas alícuotas se colocan en el contenedor para espermatozoides refrigerado (Equitainer<sup>®</sup>), donde permanecen durante 5 horas a +5°C (período de equilibración).

#### **4.2.4.5 Etiquetado**

Las dosis congeladas fueron identificadas mediante el etiquetado previo al envasado, empleando una máquina de impresión semiautomática (modelo mt-65/133, Minitüb). El sistema de códigos utilizado representa, de izquierda a derecha el número de crotal del macho (dos cifras), fecha de congelación (seis cifras) y diluyente empleado (una letra).

#### **4.2.4.6 Envasado y Sellado**

Para el envasado se emplearon pajuelas francesas de plástico, de 0.5 ml envasadas y selladas por ultrasonidos con un equipo automático (modelo Phillip mp 133, Minitüb).

#### **4.2.4.7 Congelación**

Hemos utilizado los vapores de nitrógeno líquido para congelar el espermatozoides, colocando las dosis horizontalmente a 4-5 cm de la superficie del nitrógeno líquido durante 20 minutos. Para ello se vierte nitrógeno líquido sobre una caja isotérmica de porex provista de tapa, y se coloca con cuidado el chasis en el fondo de la misma, de modo que la longitud de las patas del chasis marque la distancia referida entre el nitrógeno líquido y las pajuelas.

#### **4.2.4.8 Almacenamiento**

El proceso de conservación de espermatozoides concluyó con el almacenaje de las pajuelas en tanques de nitrógeno líquido a -196°C, en posición vertical, clasificándolas por goblets y canisteras.

#### **4.2.5 Descongelación**

De cada eyaculado congelado, se eligieron al azar una dosis por diluyente (T y L), tras 24 horas de almacenamiento en nitrógeno líquido, con el fin de estudiar los parámetros de movimiento, realizando una valoración del movimiento a los 60 minutos postdescongelación, morfología espermática e integridad del acrosoma. La descongelación se realizó sumergiendo las dosis seleccionadas en un baño maría a +39°C durante 30 segundos.

#### **4.2.6 Creación y mantenimiento del banco de esperma**

Los eyaculados que se congelaron tuvieron volúmenes  $\geq$  a 0.5 ml, movimiento rápido progresivo  $\geq$  a 50%, normalidad  $\geq$  a 70% y concentración  $\geq$  a  $2000 \times 10^6$  spz/ml.

Tras la descongelación (apartado 4.2.5, Pág.81), se valora el movimiento calculando los parámetros MT y MRP a los 60 minutos, manteniendo la muestra en estufa a +37°C previa dilución con Merk I<sup>®</sup> hasta alcanzar una concentración aproximada de 40-50 millones de spz/ml, respetando un ritmo de dilución de 1 ml/minuto. Las dosis que a los 60 minutos post-descongelación presentaban un MRP inferior a 30% fueron desechadas.

Estos datos son recogidos de forma individual en una hoja de cálculo para su posterior estudio estadístico.

Del total de eyaculados recolectados a lo largo de un año, se almacenaron en tanques de nitrógeno líquido a -196°C, aquellos que cumplieron los requisitos referenciados en el apartado 4.2.6, manteniendo el nivel de nitrógeno líquido adecuado mediante la realización de recargas cada 20 días aproximadamente.

#### **4.2.7 Espermatización manual (EM)**

El programa de EM estuvo limitado y condicionado entre otros, por el tamaño y las condiciones del rebaño, de tal modo que se diseñaron y adecuaron los lotes intentando no alterar el manejo del mismo.

##### **4.2.7.1 Selección de las hembras**

Se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: edad de la reproductora, historial de partos, historial de patologías médicas y reproductivas, número de tratamientos hormonales y fecha del último parto (>120 días).

Además, se realizó una exploración ecográfica rectal del aparato genital de cada reproductora; seleccionando 3 lotes distintos de hembras.

##### **4.2.7.2 Tratamiento de inducción y sincronización de celos**

Se empleó el método Chronogest<sup>®</sup>, utilizando esponjas de 45 mg de Acetato de Fluorogestona (FGA) que permanecen en vagina durante once días. La aplicación del tratamiento de inducción y sincronización de celos tuvo lugar en un apartadero de 6x6 m (36 m<sup>2</sup>), habilitado para tal efecto. Con la hembra inmovilizada por un ayudante y en la estación, se desinfecta la vulva con solución de povidona yodada (Betadine<sup>®</sup>) e introducimos la esponja en vagina mediante el aplicador de esponjas impregnado con Framicetina y Sulfatiazol (Framicas<sup>®</sup>), previamente lubricado. Seguidamente se comprueba la correcta colocación de la esponja realizando una pequeña tracción del hilo de retirada de la misma, para terminar cortando el exceso de hilo a unos 2-3 cm caudal a la vulva.

Dos días antes de la retirada de las esponjas se administró, por vía intramuscular, 300 UI de eCG (Foligon<sup>®</sup>) en 3 ml de diluyente y 125 µg de Cloprostenol (Estrumate<sup>®</sup>) en 0.5 ml de diluyente.

#### **4.2.7.3 Control de salida a celo**

Doce horas después de la retirada de esponjas iniciamos el control de salida a celo, realizando 3 recelas al día (8:00, 14:00 y 20:00 horas), empleando dos machos adultos enteros y fértiles, provistos de mandiles, de 5 y 6 años de edad.

El control duró 72 horas y tuvo lugar en un apartadero de 10x6 m (60 m<sup>2</sup>), habilitado para tal efecto, elaborándose varias fichas de trabajo en las que se anotaron las horas de salida a celo, orden de salida y los signos de celo que presentaron todas las cabras (Tabla 32, Anexo 2, Pág.192).

#### **4.2.7.4 Técnica de espermatización manual vía cervical**

En el total de cabras sincronizadas se realizó una doble espermatización manual (EM) a tiempo fijo, a las  $36.34 \pm 0.07$  horas y a las  $60.10 \pm 0.06$  horas de la retirada de esponjas. Con la ayuda de 2 operarios cada cabra se mantuvo apoyada sobre el tercio anterior e inmovilizada sobre una valla soporte, y tras desinfectar la vulva con solución de povidona yodada (Betadine<sup>®</sup>), se introdujo en la vagina un espéculo de pico de pato, previamente lubricado y provisto de un sistema de iluminación de proximidad, se visualiza el cérvix, y se procede a cateterizarlo mediante una vaina de inseminación de punta excéntrica, con el fin de introducir el contenido de las pajuelas lo más profundamente posible. En la ficha correspondiente, se registran las características del cérvix y la existencia o no de moco y su calidad (Tabla 34, Anexo 2, Pág.192); si hubo o no reflujo de parte de la dosis a la vagina, se anota la hora, dosis empleada y tiempo medio utilizado.

#### **4.2.7.5 Diagnóstico ecográfico de gestación**

Se realizó por exploración ecográfica del útero, vía rectal, a los 25 días post-espermatización. Todas las exploraciones fueron llevadas a cabo con la hembra previamente inmovilizada y en la estación, introduciendo el transductor del ecógrafo por vía rectal, previa limpieza digital de la ampolla y lubricación con gel de ecografía. Conforme introducimos lentamente la sonda, se ejerce una ligera presión en dirección ventral, para así poder localizar la vejiga de la orina y posteriormente el útero. Una vez

localizado el útero se realizaron pequeñas y suaves rotaciones de la sonda para identificar la vesícula embrionaria.

#### **4.2.7.6 Control de parideras**

Consiste en la anotación de la fecha del parto, características y número de chivos nacidos (Tabla 35, Anexo 2, Págs, 192).

#### **4.2.8 Determinación de la temperatura ambiental y fotoperiodo**

Se determinó mediante un termómetro de mínima y máxima, ubicado en las instalaciones del CIDG de la Diputación Provincial de Córdoba, mientras que el fotoperiodo fue valorado por el Instituto Nacional de Meteorología.

#### **4.2.9 Tratamiento estadístico de los datos**

El análisis estadístico consistió en el cálculo de medias, desviaciones típicas y porcentajes y su comparación mediante análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para las medias y Chi-cuadrado para los porcentajes, tomando como variables independientes el individuo, mes y estación del año (primavera: abril-junio, verano: julio-septiembre, otoño: octubre-diciembre, invierno: enero-marzo), fotoperiodo (fotoperiodo ascendente: del 22 de diciembre al 21 de junio, fotoperiodo descendente: del 22 de junio al 21 de diciembre), temperatura ambiental media y diluyente. Cuando las diferencias eran significativas, valores de  $p < 0.05$ , se realizaba el test de Duncan de comparación de medias a posteriori. Se calculó el coeficiente de correlación entre los parámetros seminales, y de dichas variables frente al individuo, mes, estación, fotoperiodo, temperatura ambiental media y diluyente. Los resultados se expresan en media  $\pm$  desviación típica.

## **5 RESULTADOS**

### 5.1 Resultados del programa de entrenamiento y selección de los donantes de esperma

De los 10 machos entrenados, solo 6 saltaron en vagina, tras someterlos a tres recogidas semanales hasta realizar tres rondas. En la primera saltaron y eyacularon en la vagina artificial 6 machos (60%), de los cuales dos tuvieron que ser retirados del estudio por padecer un proceso diarreico que requirió tratamiento médico. En la segunda ronda saltaron el 30%, y en la tercera saltaron 5 de 9 (55.56%) y no se dejó saltar al número 2 por sufrir también un proceso diarreico (Tabla 2).

**Tabla 2. Resultados del programa de entrenamiento y selección de los donantes de esperma.**

MACHO	Nº RECOGIDA	T 1ª E (min)	T 1º S (min)	TR (min)	EC	VE (ml)	C (x 10 <sup>6</sup> spz/ml)	MRP (%)	N (%)	I (%)
1	1ª	-	1:15	1:25	2	1.1	-	0	84.2	80.6
1	2ª	0:28	0:34	0:39	1	1	2156	6.25	-	-
1	3ª	0:22	0:27	0:27	1	0.8	2968	18.51	83.5	71.0
2	1ª	0:25	0:25	1:27	3	2.0	1768	5.95	78.0	84.0
2	2ª	0:14	0:50	4:00	4	0.5	1280	27.71	73.1	88.2
2	3ª	4:00	3:00	4:00	2	0.7	1174	24.07	71.0	82.5
3	1ª	2:15	3:15	10:15	5	0.7	1376	4.44	67.3	90.9
3	2ª	5:00	3:00	5:00	4	0.6	4548	1.55	67.9	75.2
4	1ª	8:00	8:00	9:00	3	0.9	2867	10.55	-	-
5	1ª	2:00	2:15	2:15	1	0.5	288	0	75.7	90.1
5	2ª	0:12	0:53	-	4	0.5	654	29.03	70.1	82.4
5	3ª	0:06	0:24	0:18	4	1.3	1168	30.91	58.2	81.5
6	1ª	-	0:30	2:00	4	0.9	1045	0.99	66.4	74.1
6	2ª	0:09	0:09	0:25	3	0.4	1200	1.72	75.5	91.0

T1ºE= tiempo a la primera eyaculación; T1ºS= tiempo al primer salto; TR= tiempo de reacción, EC= eficacia a la cubrición; VE= volumen eyaculado; C= Concentración espermática; MRP= movimiento rápido progresivo; N= morfología espermática; I= integridad de acrosoma.

De los diez machos sometidos a aprendizaje en las condiciones de nuestro estudio, el 60% (6/10) respondieron al primer estímulo y el 50% (5/10) repitieron al segundo. Sin embargo, y como podemos apreciar en la tabla de muestreo, el macho número 4 solo eyaculó en vagina en una ocasión, empleando tres saltos para ello, ocurriendo el primero de ellos a los 8 minutos, por lo que se excluyó del lote. Se destacan por su comportamiento sexual (tiempo a la primera eyaculación, al primer

salto y de reacción) y por la calidad del esperma 2 de los 6 que respondieron al programa de entrenamiento, y que fueron seleccionados para el estudio.

## **5.2 Resultados obtenidos en la valoración del esperma fresco**

Durante el periodo de estudio, comprendido entre noviembre de 2000 a diciembre de 2001, se realizaron 128 recogidas de esperma mediante VA de los dos machos seleccionados. A continuación se describen los resultados de las valoraciones seminales correspondientes de los referidos eyaculados, realizados inmediatamente tras la recogida.

### **5.2.1 Volumen eyaculado**

El volumen medio eyaculado (VE) fue de  $1.20 \pm 0.36$  ml para ambos machos, con valores mínimos de 0.4 ml y máximos de 2.1 ml. No se observan variaciones individuales ( $p > 0.05$ ), obteniéndose valores de  $1.18 \pm 0.36$  ml y  $1.23 \pm 0.37$  ml, para el macho 1 y 2, respectivamente (Tabla 3).

**Tabla 3. Volumen medio eyaculado (VE) durante el periodo de estudio por cada macho (media  $\pm$  desviación típica).**

<b>MACHO</b>	<b>VE (ml)</b>
1 n=70	$1,18 \pm 0,36$
2 n=58	$1,23 \pm 0,37$
Total n=128	$1,20 \pm 0,36$

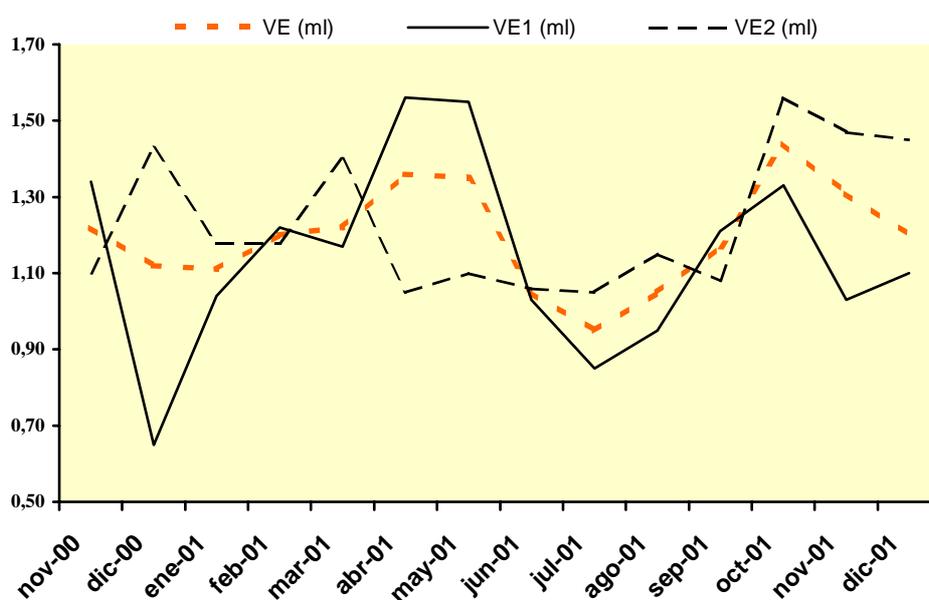
Al analizar la posible interacción de la estación del año sobre la evolución del VE, durante el periodo de estudio, por ambos machos (Tabla 4), no observamos diferencias significativas entre estaciones ( $p > 0.05$ ), siendo similares entre ellas, otoño ( $1.28 \pm 0.36$  ml), invierno ( $1.18 \pm 0.29$  ml) y primavera ( $1.25 \pm 0.43$  ml); mientras que en verano el VE fue menor ( $1.06 \pm 0.33$  ml), pero no estadísticamente significativo.

**Tabla 4. Volumen medio eyaculado (VE) durante las distintas estaciones del año por ambos machos (media  $\pm$  desviación típica).**

ESTACIÓN	VE (ml)
Primavera n=24	1,25 $\pm$ 0,43
Verano n=28	1,06 $\pm$ 0,33
Otoño n=44	1,28 $\pm$ 0,36
Invierno n=32	1,18 $\pm$ 0,29

El VE por ambos machos (Figura 1), no mostró diferencias significativas entre meses ( $p > 0.05$ ), registrándose valores similares durante los catorce meses de estudio; no obstante, se observó un ligero aumento en abril ( $1.36 \pm 0.38$  ml) y mayo de 2001 ( $1.35 \pm 0.50$  ml), para volver a descender hasta registrarse el mínimo en julio de 2001 ( $0.95 \pm 0.35$  ml). En octubre de 2001, se registró el valor máximo ( $1.44 \pm 0.29$  ml), para volver disminuir hasta el final de la experiencia (diciembre de 2001).

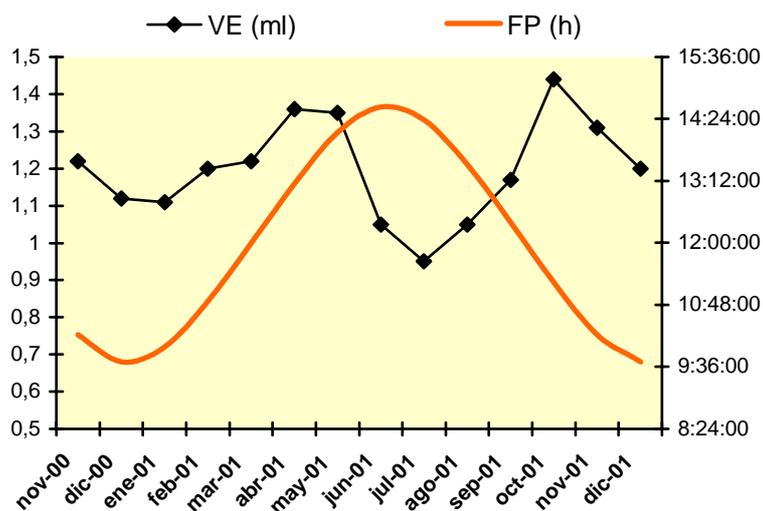
**Figura 1. Evolución del volumen medio eyaculado (VE) durante los catorce meses de estudio por ambos machos (VE1; VE2).**



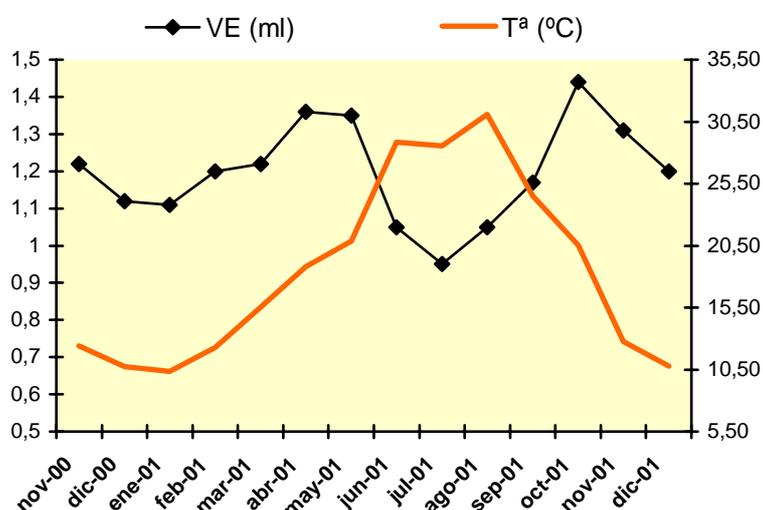
Considerando ambos machos, el volumen no mostró diferencias significativas entre fotoperiodos ( $p > 0.05$ ), con valores medios de  $1.22 \pm 0.36$  ml para el ascendente y  $1.19 \pm 0.36$  ml para el descendente. No obstante, se registró un aumento progresivo a partir del solsticio de invierno (21 de diciembre), hasta alcanzar los valores más elevados poco antes del solsticio de verano (21 de junio), y que disminuyeron llegando al mínimo en julio de 2001 ( $0.95 \pm 0.35$  ml), registrándose los valores más bajos en verano (1.02 ml). Seguidamente, se observó un nuevo aumento hasta alcanzar el máximo en octubre de 2001 ( $1.44 \pm 0.29$  ml), para volver a disminuir hasta el final de la experiencia, justo antes del siguiente solsticio de invierno (Figura 2).

Al igual que el fotoperiodo, la temperatura media ambiental no influyó significativamente sobre el volumen medio eyaculado, y aunque se registró un patrón de distribución similar al de la curva de temperatura ambiental, el VE disminuyó durante los meses más calurosos (junio, julio y agosto de 2001); sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 3).

**Figura 2. Evolución del volumen eyaculado medio (VE) por ambos machos frente al fotoperiodo (FP).**



**Figura 3. Evolución del volumen eyaculado medio (VE) frente a la temperatura ambiental media (T<sup>a</sup>).**



### 5.2.2 Concentración espermática

El valor medio de concentración espermática (C) fue de  $3542.17 \pm 776.75 \times 10^6$  spz/ml, con un valor mínimo de  $1892.00 \times 10^6$  spz/ml y máximo de  $5068.00 \times 10^6$  spz/ml. Al igual que con el volumen eyaculado, este parámetro no mostró variaciones individuales ( $p > 0.05$ ), con valores de  $3580.55 \pm 802.36 \times 10^6$  spz/ml y  $3495.26 \pm 721.94 \times 10^6$  spz/ml para el macho 1 y 2, respectivamente (Tabla 5).

**Tabla 5. Concentración espermática media (C) durante el periodo de estudio para cada macho (media  $\pm$  desviación típica).**

MACHO	C (spz/ml)
1 n=70	$3580,55 \pm 822,36$
2 n=58	$3495,26 \pm 721,94$
Total n=128	$3542,17 \pm 776,75$

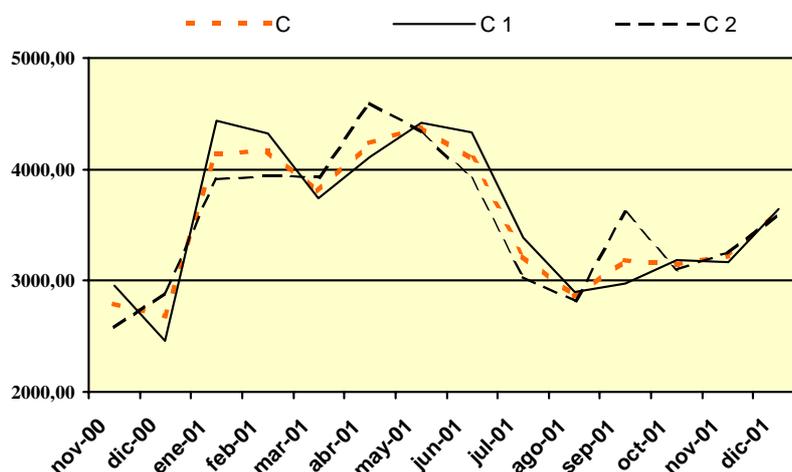
Sin embargo, se observaron diferencias muy significativas entre estaciones ( $p < 0.001$ ), con valores máximos en invierno ( $4043.29 \pm 499.53 \times 10^6$  spz/ml) y primavera ( $4261.27 \pm 582.14 \times 10^6$  spz/ml), y mínimos en verano ( $3152.89 \pm 646.96 \times 10^6$  spz/ml) y otoño ( $3092.37 \pm 614.55 \times 10^6$  spz/ml) (Tabla 6).

**Tabla 6. Concentración espermática media (C) en cada estación del año por ambos machos (media  $\pm$  desviación típica).**

ESTACIÓN	C (spz/ml)
Primavera n=24	$4261,27 \pm 582,14^b$
Verano n=28	$3152,89 \pm 646,96^a$
Otoño n=44	$3092,37 \pm 614,55^a$
Invierno n=32	$4043,29 \pm 499,53^b$

Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.001$ )

**Figura 4. Evolución de la concentración espermática media (C) durante los catorce meses de estudio por ambos machos (C1; C2).**

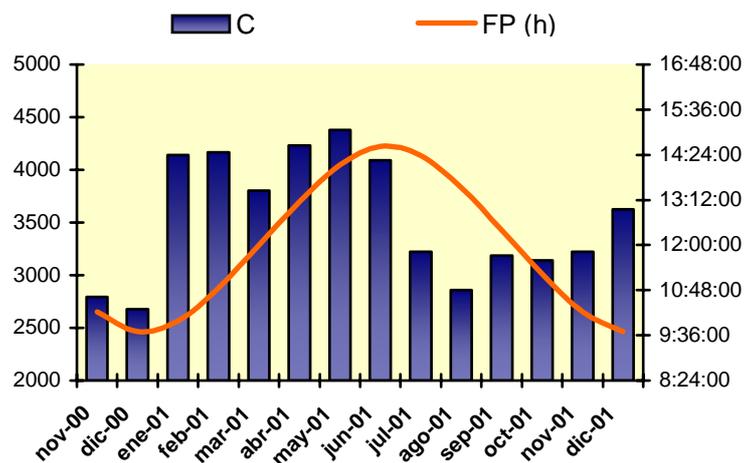


La figura 4 representa la evolución de la concentración espermática, observándose diferencias significativas entre meses ( $p < 0.001$ ), registrándose los valores mínimos en cada macho en noviembre y diciembre de 2000, con  $2793.33 \pm 518.70 \times 10^6$

spz/ml y  $2676.67 \pm 608.88 \times 10^6$  spz/ml, respectivamente; elevándose a continuación significativamente hasta alcanzar los valores máximos entre enero ( $4143.11 \pm 508.72 \times 10^6$  spz/ml) y junio de 2001 ( $4092.57 \pm 687.94 \times 10^6$  spz/ml), para disminuir progresivamente hasta agosto de 2001 ( $2859.00 \pm 287.04 \times 10^6$  spz/ml), y en ambos machos volvió a aumentar suavemente hasta el final del periodo de estudio ( $3626.67 \pm 505.52 \times 10^6$  spz/ml).

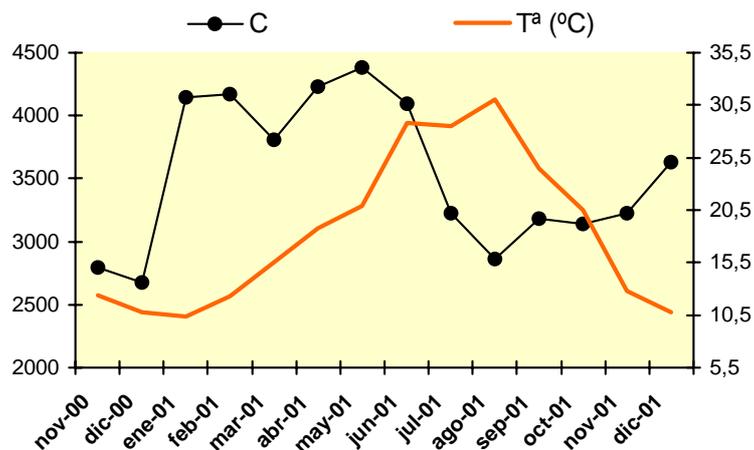
Al analizar el posible efecto del fotoperiodo sobre la evolución de la concentración espermática media durante los catorce meses de estudio (Figura 5), obtuvimos diferencias significativas entre fotoperiodos ( $p < 0.001$ ), con valores máximos durante el ascendente ( $4165.83 \pm 536.41 \times 10^6$  spz/ml) y mínimos en el descendente ( $3126.39 \pm 618.47 \times 10^6$  spz/ml). A partir del solsticio de invierno, se registró un aumento progresivo hasta alcanzar valores máximos ( $4378.91 \pm 497.47 \times 10^6$  spz/ml) justo antes de solsticio de verano, a partir del cual se observó un descenso progresivo de la misma, para volver a elevarse antes del siguiente solsticio de invierno.

**Figura 5. Evolución de la concentración espermática media (C) por ambos machos frente al fotoperiodo (FP).**



La temperatura ambiental no mostró influencia significativa sobre la evolución de C a lo largo del estudio; si bien, disminuyó ligeramente durante los meses de temperaturas elevadas, concretamente en julio y agosto de 2001 (Figura 6).

**Figura 6. Evolución de la concentración espermática media (C) por ambos machos frente a la temperatura ambiental media (T<sup>a</sup>).**



### 5.2.3 Movimiento espermático

El movimiento espermático se valoró calculando dos parámetros cinéticos distintos, el movimiento total (MT) y el movimiento rápido progresivo (MRP), cuyos valores medios durante la experiencia fueron de  $81.41 \pm 9.33 \%$  y  $56.52 \pm 11.34 \%$ , respectivamente. Obtuvimos diferencias significativas entre individuos para ambos parámetros ( $p < 0.001$  respecto al MT y  $p < 0.01$  respecto al MRP), de tal modo que MT mostró valores medios de  $76.84 \pm 8.26 \%$  y  $87.05 \pm 7.30 \%$  para los machos 1 y 2, respectivamente; mientras que MRP fue de  $53.62 \pm 11.32 \%$  para el macho 1 y  $60.08 \pm 10.38 \%$  para el 2 (Tabla 7).

**Tabla 7. MT y MRP medios durante el periodo de estudio para cada macho (media  $\pm$  desviación típica).**

MACHO	MT (%)	MRP (%)
1 n=70	76,84 $\pm$ 8,26 <sup>***</sup>	53,62 $\pm$ 11,32 <sup>**</sup>
2 n=58	87,05 $\pm$ 7,30 <sup>***</sup>	60,08 $\pm$ 10,38 <sup>**</sup>
Total n=128	81,41 $\pm$ 9,33	56,52 $\pm$ 11,34

<sup>\*\*</sup> (p<0.01) <sup>\*\*\*</sup> (p<0.001)

MT= porcentaje medio de espermatozoides con movimiento total; MRP= porcentaje medio de espermatozoides con movimiento rápido progresivo.

El valor medio anual de MT no mostró diferencias significativas entre estaciones ( $p>0.05$ ), registrándose porcentajes similares en invierno (80.96  $\pm$  8.95 %), primavera (84.95  $\pm$  9.49 %) y verano (81.71  $\pm$  9.54 %); sin embargo en otoño se registraron valores ligeramente inferiores al resto del año (79.41  $\pm$  9.07 %), pero no estadísticamente significativos (Tabla 8).

**Tabla 8. MT y MRP medios durante las distintas estaciones del año por ambos machos (media  $\pm$  desviación típica).**

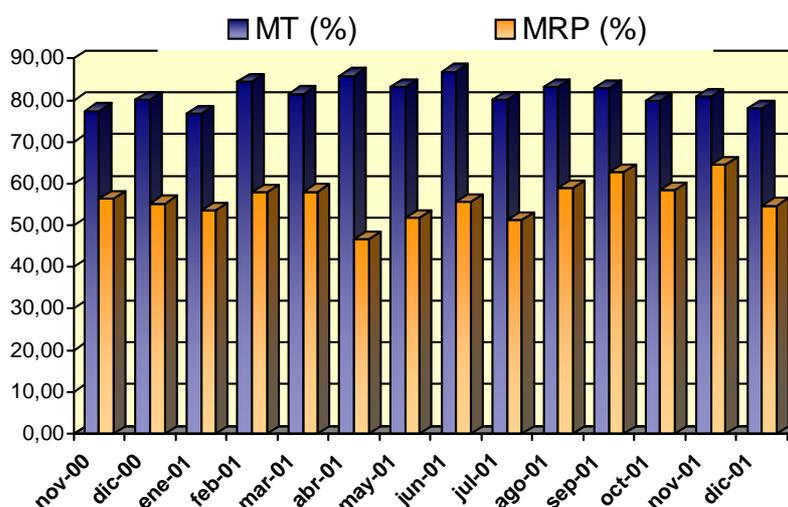
ESTACIÓN	MT (%)	MRP (%)
Primavera n=24	84,95 $\pm$ 9,49	52,01 $\pm$ 10,14
Verano n=28	81,71 $\pm$ 9,54	57,25 $\pm$ 14,28
Otoño n=44	79,41 $\pm$ 9,07	58,50 $\pm$ 11,12
Invierno n=32	80,96 $\pm$ 8,95	56,53 $\pm$ 8,81

MT= porcentaje medio de espermatozoides con movimiento total; MRP= porcentaje medio de espermatozoides con movimiento rápido progresivo.

Asimismo, el MRP no mostró diferencias significativas entre estaciones ( $p<0.05$ ), con valores similares en verano (57.25  $\pm$  14.28 %), otoño (58.50  $\pm$  11.12%) e invierno (56.53  $\pm$  8.81 %), que disminuyeron suavemente en primavera (52.01  $\pm$  10.14 %), pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 8).

Tras analizar el posible efecto del mes de estudio sobre la evolución del movimiento espermático durante la experiencia (Figura 7), no obtuvimos diferencias significativas entre meses para MT y MRP ( $p>0.05$ ); sin embargo, el MRP mostró un ligero aumento en noviembre de 2001 ( $64.59 \pm 7.26$  %), así como un suave descenso en abril de 2001 ( $46.63 \pm 7.19$  %).

**Figura 7. Evolución de MT y MRP por ambos machos durante el estudio.**

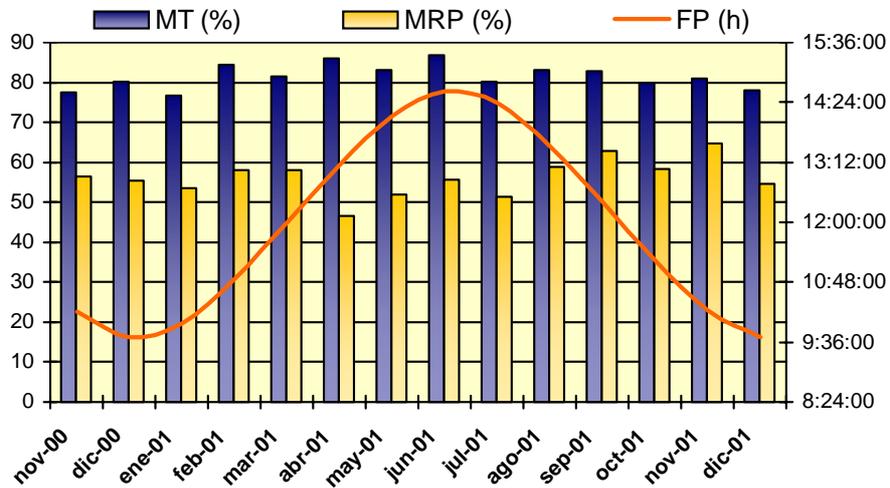


MT= porcentaje medio de espermatozoides con movimiento total;  
MRP= porcentaje medio de espermatozoides con movimiento rápido progresivo.

No observamos influencia del fotoperiodo sobre la evolución del movimiento espermático (Figura 8), ya que no obtuvimos diferencias significativas para MT y MRP ( $p>0.05$ ), con valores de MT y MRP similares durante el fotoperiodo ascendente ( $82.57 \pm 9.40$  %;  $54.42 \pm 9.72$  %) y descendente ( $80.55 \pm 9.25$  %;  $57.97 \pm 12.18$  %) respectivamente.

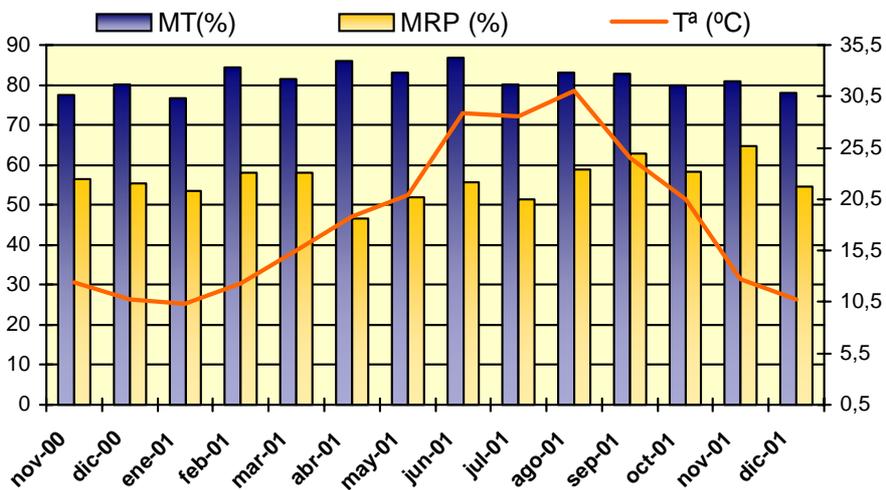
Del mismo modo, la temperatura ambiental, no mostró efecto significativo sobre la evolución del movimiento espermático a lo largo de todo el periodo de estudio ( $p>0.05$ ), manteniendo, ambos parámetros cinéticos, una distribución similar a lo largo de la experiencia e independiente de la oscilación térmica (Figura 9).

Figura 8. Evolución de MT y MRP por ambos machos frente al fotoperiodo (FP).



MT= porcentaje medio de espermatozoides con movimiento total; MRP= porcentaje medio de espermatozoides con movimiento rápido progresivo.

Figura 9. Evolución de MT y MRP por ambos machos frente a la temperatura ambiental media (T<sup>a</sup>).



MT= porcentaje medio de espermatozoides con movimiento total; MRP= porcentaje medio de espermatozoides con movimiento rápido progresivo.

## 5.2.4 Morfología espermática

El valor medio anual del porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales (N) fue de  $74.20 \pm 19.15$  %, para ambos machos; encontrándose diferencias significativas entre individuos ( $p < 0.001$ ), con valores medios de  $60.18 \pm 15.37$  % y  $90.27 \pm 5.58$  %, para el macho 1 y 2, respectivamente (Tabla 9), que se vieron influidos por un proceso inflamatorio testicular que afectó al macho 1 entre los meses de junio a septiembre, y que fue de etiología desconocida, tratado con antibióticos de amplio espectro, y que tras remitir tras 12 días el macho recuperó su calidad seminal.

**Tabla 9. Morfología espermática (N) durante el periodo de estudio para cada macho (media  $\pm$  desviación típica).**

MACHO	N (%)
1 n=70	$60,18 \pm 15,37^a$
2 n=58	$90,27 \pm 5,58^b$
Total n=128	$74,20 \pm 19,15$

Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.001$ )

N= porcentaje medio de espermatozoides morfológicamente normales.

**Tabla 10. Morfología espermática en cada estación del año por ambos machos (media  $\pm$  desviación típica).**

ESTACIÓN	N (%)
Primavera n=24	$70,63 \pm 24,80^a$
Verano n=28	$67,90 \pm 24,25^a$
Otoño n=44	$82,25 \pm 10,53^b$
Invierno n=32	$73,11 \pm 13,98^{ab}$

Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

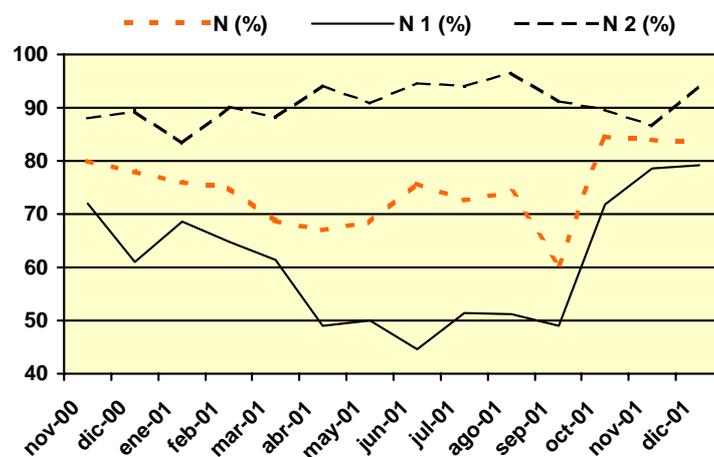
N= porcentaje medio de espermatozoides morfológicamente normales.

La morfología espermática mostró diferencias significativas según la estación del año ( $p < 0.05$ ), registrándose los valores más bajos en invierno ( $73.11 \pm 13.98$  %),

primavera ( $70.63 \pm 24.80$  %) y verano ( $67.90 \pm 24.25$  %); mientras que en otoño se registraron valores estadísticamente superiores al resto del año ( $82.25 \pm 10.53$  %).

La figura 10 representa gráficamente la evolución de la morfología espermática a lo largo del estudio, no observándose diferencias significativas entre los meses del año ( $p > 0.05$ ); aunque se registra un descenso progresivo desde noviembre de 2000 ( $79.93 \pm 12.75$  %) hasta abril de 2001 ( $67.10 \pm 32.03$  %). Los niveles menores se observaron entre los meses de marzo ( $68.78 \pm 15.36$  %) y mayo de 2001 ( $68.46 \pm 22.04$  %), para aumentar de forma progresiva hasta el final de la fase de estudio ( $83.43 \pm 9.37$  %). En septiembre de 2001 se registró el menor porcentaje de este parámetro ( $60.50 \pm 23.16$  %).

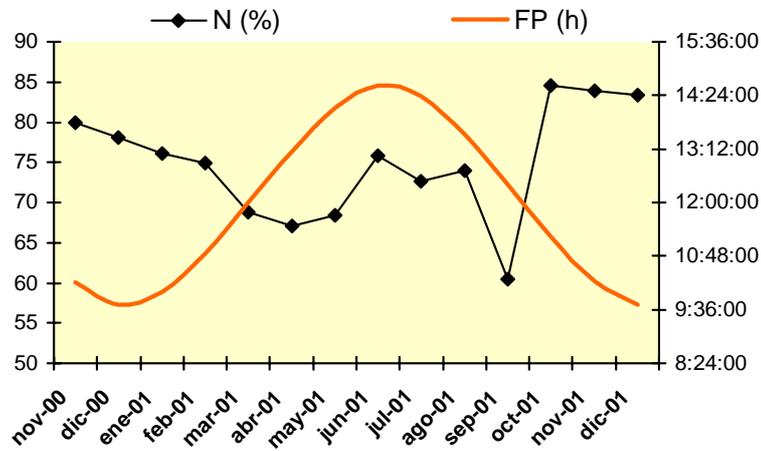
**Figura 10. Evolución de la morfología espermática media (N) e individual en cada macho (N1; N2).**



N= porcentaje medio de espermatozoides morfológicamente normales por ambos machos, N 1: porcentaje medio de espermatozoides morfológicamente normales por el macho 1, N 2: porcentaje medio de espermatozoides morfológicamente normales por el macho 2.

Tras analizar el posible efecto del fotoperiodo, sobre la evolución de la morfología espermática a lo largo del estudio (Figura 11), no obtuvimos diferencias significativas entre fotoperiodos ( $p > 0.05$ ), con valores de  $71.57 \pm 19.00$  % y  $76.28 \pm 19.16$  % para el ascendente y descendente, respectivamente.

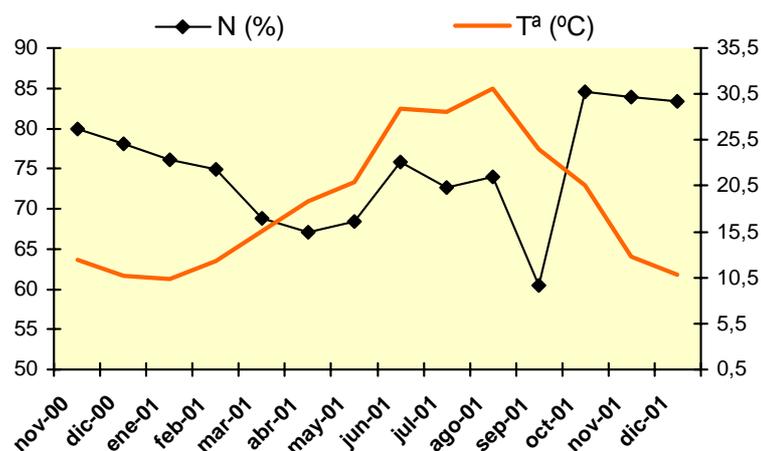
Figura 11. Evolución de la morfología espermática media (N) por ambos machos frente al fotoperiodo (FP).



N= porcentaje medio de espermatozoides morfológicamente normales.

La temperatura ambiental media no mostró influencia significativa sobre la proporción de espermatozoides morfológicamente normales durante el periodo de estudio ( $p > 0.05$ ), mostrando un patrón de distribución similar a la curva de la temperatura ambiental (Figura 12).

Figura 12. Evolución de la morfología espermática media (N) por ambos machos frente a la temperatura ambiental media ( $T^a$ ).



N= porcentaje medio de espermatozoides morfológicamente normales por ambos machos.

## 5.2.5 Integridad de acrosoma

El porcentaje medio de espermatozoides con el acrosoma íntegro por eyaculado (I) durante el periodo de estudio fue de  $91.00 \pm 4.74$  %, con un mínimo del 77.40 % y un máximo de 99.20 %, para ambos machos. Por otro lado, no se observaron variaciones individuales para este parámetro ( $p > 0.05$ ) en los machos estudiados, registrándose valores medios de  $90.30 \pm 4.91$  % y  $91.85 \pm 4.43$  % para los machos 1 y 2, respectivamente (Tabla 11).

**Tabla 11. Integridad de acrosoma (I) durante el periodo de estudio por cada macho (media  $\pm$  desviación típica).**

MACHO	I (%)
1 n=70	$90,30 \pm 4,91$
2 n=58	$91,85 \pm 4,43$
Total n=128	$91,00 \pm 4,74$

El valor medio anual del porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro (Tabla 12), mostró diferencias significativas según la estación del año ( $p < 0.001$ ), con valores máximos en otoño ( $91.36 \pm 4.36$  %), invierno ( $93.07 \pm 3.81$  %) y primavera ( $91.88 \pm 4.44$  %), que disminuyó significativamente en verano ( $87.55 \pm 4.81$  %).

**Tabla 12. Integridad de acrosoma (I) en cada estación del año por ambos machos (media  $\pm$  desviación típica).**

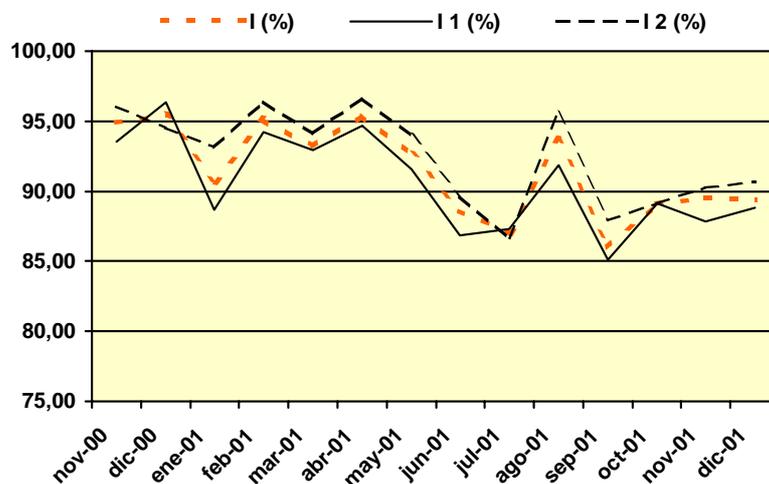
ESTACIÓN	I (%)
Primavera n=24	$91,88 \pm 4,44^b$
Verano n=28	$87,55 \pm 4,81^a$
Otoño n=44	$91,36 \pm 4,36^b$
Invierno n=32	$93,07 \pm 3,81^b$

Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.001$ )

I= porcentaje medio de espermatozoides con acrosoma íntegro.

Asimismo, obtuvimos variaciones mensuales en la integridad de acrosoma ( $p < 0.001$ ), con valores mínimos en septiembre de 2001 ( $86.03 \pm 4.70 \%$ ) y máximos en abril de 2001 ( $95.46 \pm 2.23 \%$ ). Los valores superiores se registraron entre noviembre de 2000 ( $94.94 \pm 3.43 \%$ ) y abril de 2001, para descender progresivamente hasta septiembre de 2001 y volver a elevarse hasta el final del periodo de estudio (Figura 13).

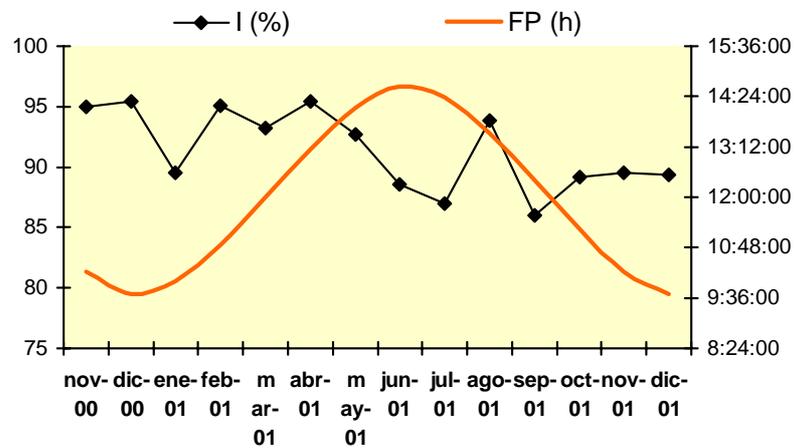
**Figura 13. Evolución de la integridad de acrosoma media (I) e individual en cada macho (I1; I2).**



I= porcentaje medio de espermatozoides con acrosoma íntegro por ambos macho; I 1= porcentaje medio de espermatozoides con acrosoma íntegro por el macho 1; I 2= porcentaje medio de espermatozoides con acrosoma íntegro por el macho 2.

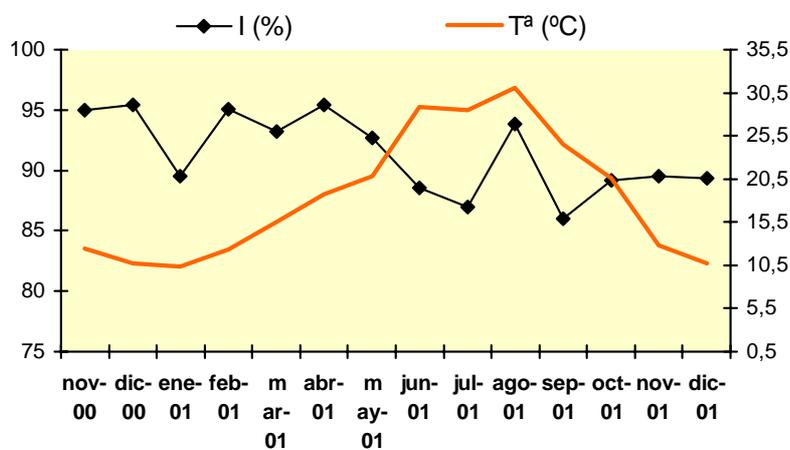
Al estudiar estadísticamente el posible efecto del fotoperiodo, sobre la evolución de la integridad de acrosoma a lo largo del periodo de estudio (Figura 14), se obtuvieron diferencias muy significativas entre ambos ( $p < 0.001$ ), correspondiendo los valores superiores al ascendente ( $93.03 \pm 3.65 \%$ ), que disminuyeron justo antes del solsticio de verano. Durante el fotoperiodo descendente se registraron los valores mínimos ( $89.63 \pm 4.93 \%$ ), que se incrementaron poco antes del siguiente solsticio de invierno.

Figura 14. Evolución de la integridad de acrosoma por ambos machos frente al fotoperiodo (FP).



I= porcentaje medio de espermatozoides con acrosoma íntegro.

Figura 15. Evolución de la integridad de acrosoma por ambos machos frente a la temperatura media ambiental (T<sup>a</sup>).



I= porcentaje medio de espermatozoides con acrosoma íntegro.

Asimismo, observamos una interacción significativa de la temperatura ambiental media sobre la evolución de la integridad de acrosoma a lo largo del estudio ( $p < 0.01$ ), registrándose los valores más elevados cuando la temperatura ambiental fue menor, y que disminuyeron hasta valores mínimos, cuando se registraron las temperaturas máximas, que a su vez coincidió con la estación de verano. A continuación, con el

descenso de las temperaturas (Figura 15) se observó un incremento en el porcentaje de espermatozoides con integridad de acrosoma.

#### 5.2.6 Correlación entre los parámetros espermáticos estudiados

Al calcular el coeficiente de correlación entre los parámetros espermáticos, se observó la existencia de correlaciones entre varios de ellos; así, el volumen eyaculado (VE) mostró una correlación significativa con el MRP ( $r=0.25$ ,  $p<0.01$ ); sin embargo, no se obtuvo correlación significativa entre el mismo y el resto de parámetros seminales (concentración espermática, movimiento total, morfología espermática e integridad de acrosoma).

Por el contrario, la concentración espermática (C) mostró correlación negativa y significativa con el MRP ( $r= -0.20$ ,  $p<0.05$ ); no observándose correlación significativa con el resto de parámetros seminales (volumen eyaculado, movimiento total, morfología espermática e integridad de acrosoma).

Por otra parte, el MT mostró correlación significativa con el MRP ( $r=0.58$ ,  $p<0.01$ ), morfología espermática ( $r=0.54$ ,  $p<0.01$ ) e integridad de acrosoma ( $r=0.19$ ,  $p<0.05$ ); sin embargo, no obtuvimos correlación significativa con la concentración espermática (C).

Asimismo, el MRP mostró, a su vez correlación significativa con la morfología espermática ( $r=0.29$ ,  $p<0.01$ ), mientras que esta última mostró correlación significativa con la integridad de acrosoma ( $r=0.25$ ,  $p<0.01$ ).

Por otro lado, al calcular el coeficiente de correlación entre dichos parámetros espermáticos y las variables individuo, estación, mes, fotoperiodo y temperatura media ambiental, obtuvimos una correlación significativa del factor individuo con el MT ( $0.55$ ,  $p<0.01$ ), MRP ( $r=0.28$ ,  $p<0.01$ ) y morfología espermática ( $r=0.79$ ,  $p<0.01$ ).

La estación del año mostró una correlación significativa con la integridad de acrosoma ( $r=0.19$ ,  $p<0.05$ ), al igual que el factor mes, que mostró correlación negativa y significativa con la integridad de acrosoma ( $r= -0.48$ ,  $p<0.01$ ).

Los factores ambientales, fotoperiodo y temperatura media, mostraron correlación significativa con varios de los parámetros seminales estudiados, el primero con la concentración espermática ( $r=0.66$ ,  $p<0.01$ ) e integridad de acrosoma ( $r=0.35$ ,  $p<0.01$ ), mientras que la temperatura media manifestó correlación negativa y significativa con la integridad de acrosoma.

**Tabla 13. Índices de correlación entre los parámetros seminales y de éstos con el individuo (macho), estación, mes, fotoperiodo (FP) y temperatura ambiental media (T<sup>a</sup>).**

	VE	C	MT	MRP	N	I
<b>VE</b>		,051 ns	,123 ns	,246**	-,012 ns	,127 ns
<b>C</b>	,051 ns		,102 ns	-,199*	-,047 ns	,035 ns
<b>MT</b>	,123 ns	,102 ns		,576**	,536**	,190*
<b>MRP</b>	,246**	-,199*	,576**		,290**	,083 ns
<b>N</b>	-,012 ns	-,047 ns	,536**	,290**		,249**
<b>I</b>	,127 ns	,035 ns	,190*	,083 ns	,249**	
<b>MACHO</b>	,069 ns	-,055 ns	,546**	,284**	,787**	,163 ns
<b>ESTACIÓN</b>	,020 ns	-,074 ns	-,159 ns	,131 ns	,127 ns	,187*
<b>MES</b>	,070 ns	-,133 ns	,031 ns	,154 ns	,045 ns	-,478**
<b>FP</b>	,052 ns	,658**	,107 ns	-,155 ns	-,123 ns	,353**
<b>T<sup>a</sup></b>	-,132 ns	-,005 ns	,142 ns	-,044 ns	-,179 ns	-,348**

\*\* Correlación significativa ( $p<0.01$ ); \* Correlación significativa ( $p<0.05$ ); ns (no significativo)  
VE= volumen eyaculado; C= concentración espermática; MT: movimiento total; MRP: movimiento rápido progresivo; N: morfología espermática; I: integridad de acrosoma.

### **5.3 Resultados obtenidos en la valoración del esperma congelado-descongelado**

#### **5.3.1 Movimiento post-descongelación**

De los 128 eyaculados recogidos durante el estudio, 99 (77.34%) cumplieron los requisitos exigidos a la precongelación (apartado 4.2.6), mientras que 29 (22.66%) fueron eliminados, no observando diferencias significativas en la producción de eyaculados aptos para congelar entre individuos ( $p>0.05$ ); de manera que, del macho 1 se congeló el 71.43% de los eyaculados (50/70), mientras que del 2 se pudo congelar el 84.48% (49/58).

Por otra parte, apreciamos que el tiempo de reacción aumentó significativamente en primavera ( $p<0.01$ ) (3 minutos y 28 segundos), así como la presencia de fallos en la eyaculación en el macho 1 (4.29%).

En todos los eyaculados congelados se determinó el movimiento a la descongelación. En total se realizaron 198 valoraciones cuyos resultados fueron los siguientes:

#### **5.3.1.1 Movimiento total y rápido progresivo a la descongelación (MTD y MRPD)**

El valor medio del movimiento total a la descongelación (MTD) fue de  $55.49 \pm 14.19$  % para ambos machos, registrándose una pérdida de 25.92 puntos en el porcentaje de espermatozoides tras el proceso de congelación-descongelación (Tabla 14) comparándolo con el valor medio de dicho parámetro obtenido antes de congelar el esperma ( $81.41 \pm 9.33$  %). Con respecto al movimiento rápido progresivo medio a la descongelación (MRPD) fue de  $33.76 \pm 11.58$  % para ambos machos, con un máximo de 61.78% y un mínimo de 5.22%. Este parámetro se vio influido significativamente por el proceso de congelación-descongelación al que se sometió el esperma, registrándose pérdidas de hasta un 40.27% con respecto al valor medio obtenido antes de congelar (Tabla 15).

**Tabla 14. Resultados del porcentaje de MT obtenido en la valoración de esperma precongelado y descongelado para cada macho y diluyente (media  $\pm$  desviación típica).**

MOVIMIENTO TOTAL (%)	MACHO			DILUYENTE	
	1	2	TOTAL	TRIS	LACTEO
<b>precongelación</b> n=128	76,84 $\pm$ 8,26 ***	87,05 $\pm$ 7,30 ***	81,41 $\pm$ 9,33		
<b>descongelación</b> n=198	52,59 $\pm$ 11,84 **	58,47 $\pm$ 15,78 **	55,49 $\pm$ 14,19	57,39 $\pm$ 12,23	53,60 $\pm$ 15,74

\*\* (p<0.01); \*\*\* (p<0.001)

MT= movimiento total precongelado; MTD= movimiento total a la descongelación.

Se observaron variaciones individuales en el MTD (p<0.01) y MRPD (p<0.001) en los dos machos estudiados, con valores de 52.59  $\pm$  11.84 % y 58.47  $\pm$  15.78 % en el MTD y de 30.60  $\pm$  9.46 % y 37.03  $\pm$  12.66 % en el MRPD para los machos 1 y 2, respectivamente. Asimismo, se registraron pérdidas del 31.56% para el macho 1 y del 32.83% para el 2 en el MTD (Tabla 14), que fueron del 42.93% para el macho 1 y 38.37% para el 2 en el MRPD (Tabla 15).

**Tabla 15. Resultados del movimiento rápido progresivo medio obtenido en la valoración de esperma precongelado y descongelado durante los catorce meses de estudio para cada macho y diluyente (media  $\pm$  desviación típica).**

MRP (%)	MACHO			DILUYENTE	
	1	2	TOTAL	TRIS	LACTEO
<b>precongelación</b> n=128	53,62 $\pm$ 11,32 **	60,08 $\pm$ 10,38 **	56,52 $\pm$ 11,34		
<b>descongelación</b> n=198	30,60 $\pm$ 9,46 ***	37,03 $\pm$ 12,66 ***	33,76 $\pm$ 11,58	34,44 $\pm$ 9,74	33,10 $\pm$ 13,16

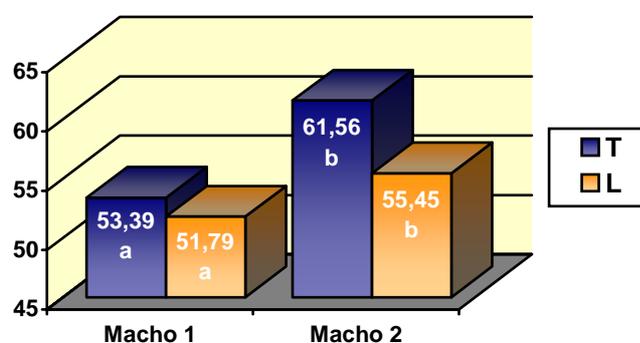
\*\* (p<0.01); \*\*\* (p<0.001)

MRP= movimiento rápido progresivo del esperma precongelado; MRPD= movimiento rápido progresivo a la descongelación

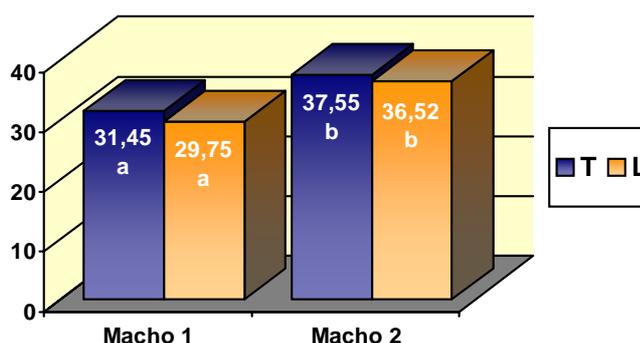
En cuanto al análisis del posible efecto del diluyente de congelación sobre el MTD y MRPD, no obtuvimos diferencias significativas entre ambos diluyentes (p>0.05), aunque el Tris (T) mostró valores ligeramente superiores a los registrados por el diluyente lácteo (L), para ambas variables. Además, se observaron pérdidas del 29.5% y 34.16% de MT para T y L, respectivamente (Tabla 14), que fueron del 39.07% para el T y del 41.44% para el L en cuanto al MRPD (Tabla 15).

Tras analizar el efecto del macho sobre el MTD obtenido por cada diluyente (Figura 16), observamos variaciones individuales ( $p < 0.01$ ) para T, registrándose valores de  $53.39 \pm 11.04$  % y  $61.56 \pm 12.11$  % para los machos 1 y 2 respectivamente. Sin embargo, no obtuvimos diferencias individuales estadísticamente significativas en el MTD ( $p > 0.05$ ) empleando L, con valores de  $51.79 \pm 12.65$  % para el macho 1 y  $55.45 \pm 18.32$  % para el 2.

**Figura 16.** MTD medio para cada macho según el diluyente de congelación (T= Tris; L=lácteo).



**Figura 17.** Valores de movimiento rápido progresivo medio a la descongelación (MRPD) obtenidos en cada individuo, según el diluyentes (T= diluyente Tris; L= diluyente lácteo).



También se obtuvieron diferencias individuales significativas ( $p < 0.01$  respecto al T,  $p < 0.05$  respecto al L), al estudiar el efecto del macho sobre el MRPD obtenido por cada diluyente a lo largo de todo el periodo de estudio (Figura 17). Así, el macho 1 mostró valores significativamente inferiores a los registrados por el 2 en ambos diluyentes, con valores de  $31.45 \pm 7.44$  % y  $29.75 \pm 11.13$  % para T y L,

respectivamente; mientras que el macho 2 mostró valores de  $37.55 \pm 10.90$  % empleando T y  $36.52 \pm 14.27$  % con L.

Asimismo, en las figuras 16 y 17 podemos apreciar diferencias, pero no estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ), en los valores de MTD y MRPD registrados por cada macho durante el estudio según el diluyente de congelación utilizado, si bien T mostró valores ligeramente superiores a los obtenidos por L, en ambos machos, así el MTD en el macho 1 dio valores de  $53.39 \pm 11.04$  % para T y  $51.79 \pm 12.64$  % para L; mientras que en el macho 2 los valores registrados fueron de  $61.56 \pm 12.11$  % y  $55.45 \pm 18.31$  % para T y L, respectivamente.

Al valorar el efecto de la estación, correspondiente a la fecha de recogida del eyaculado, sobre la evolución del MTD (Tabla 16), no obtuvimos diferencias significativas entre estaciones ( $p > 0.05$ ), registrándose valores muy similares en invierno ( $56.95 \pm 10.54$  %), primavera ( $58.46 \pm 15.97$  %) y verano ( $57.24 \pm 15.15$  %), y que disminuyeron ligeramente en otoño ( $52.75 \pm 14.38$  %), pero no estadísticamente significativo. Las diferencias entre el MT antes de congelar y a la descongelación, alcanzaron pérdidas medias de 26.49 puntos en primavera, 32.38 puntos en verano, 26.66 puntos en otoño y 25.16 puntos en invierno.

En cuanto a la influencia de la estación del año sobre los resultados de MRPD (Tabla 16), obtuvimos diferencias significativas ( $p < 0.01$ ), aunque los valores fueron constantes en tres de las cuatro estaciones. Así, en otoño se registró un porcentaje medio de  $31.12 \pm 12.43$  %,  $33.99 \pm 6.59$  % en invierno y  $33.32 \pm 9.94$  % en primavera, que aumentaron significativamente en verano ( $38.55 \pm 13.10$  %). Por otra parte, se observaron pérdidas del 35.94% en primavera, 32.66% en verano, 46.80% en otoño y 9.87% en invierno.

**Tabla 16. Respuesta del movimiento espermático a la congelación-descongelación según la estación del año por individuo y diluyente (media  $\pm$  desviación típica).**

ESTACIÓN	MT (%)			MTD (%)			MTD (%)	
	1	2	Total	1	2	Total	TRIS	LACTEO
<b>Primavera</b> n=14	77,60 $\pm$ 7,09	92,29 $\pm$ 4,49 **	84,95 $\pm$ 9,49	55,69 $\pm$ 10,09 *	61,24 $\pm$ 20,28 *	58,46 $\pm$ 15,97	63,21 $\pm$ 10,11	53,72 $\pm$ 19,45
<b>Verano</b> n=23	75,78 $\pm$ 7,72	89,62 $\pm$ 4,79 **	81,71 $\pm$ 9,54	47,71 $\pm$ 11,07 *	65,98 $\pm$ 13,06 *	57,24 $\pm$ 15,15	57,31 $\pm$ 13,23	57,17 $\pm$ 17,15
<b>Otoño</b> n=41	75,79 $\pm$ 8,56	83,42 $\pm$ 8,04 **	79,41 $\pm$ 9,07	51,31 $\pm$ 13,18 *	54,27 $\pm$ 15,56 *	52,75 $\pm$ 14,38	54,47 $\pm$ 13,35	51,04 $\pm$ 15,30
<b>Invierno</b> n=21	78,42 $\pm$ 9,32	84,97 $\pm$ 6,91 **	80,96 $\pm$ 8,95	57,94 $\pm$ 8,48 *	55,80 $\pm$ 12,67 *	56,95 $\pm$ 10,54	59,39 $\pm$ 8,21	54,62 $\pm$ 12,11

\* (p<0.05), \*\* (p<0.01)

MT: movimiento total a la pre congelación, MTD: movimiento total a la descongelación.

**Tabla 17. Respuesta del movimiento espermático a la congelación-descongelación según la estación del año por individuo y diluyente (media  $\pm$  desviación típica).**

ESTACIÓN	MRP (%)			MRPD (%)			MRPD (%)	
	1	2	Total	1	2	Total	TRIS	LACTEO
<b>Primavera</b> n=14	48,44 $\pm$ 7,88	55,58 $\pm$ 11,18	52,01 $\pm$ 10,14	31,77 $\pm$ 5,61	34,87 $\pm$ 12,99 <sup>c</sup>	33,32 $\pm$ 9,94 <sup>b</sup>	33,36 $\pm$ 5,41	33,28 $\pm$ 13,26 <sup>a</sup>
<b>Verano</b> n=23	52,82 $\pm$ 15,69	63,16 $\pm$ 9,90	57,25 $\pm$ 14,28	30,16 $\pm$ 9,84	46,24 $\pm$ 10,88 <sup>c</sup>	38,55 $\pm$ 13,10 <sup>b</sup>	37,90 $\pm$ 10,40	39,20 $\pm$ 15,56 <sup>a</sup>
<b>Otoño</b> n=41	56,04 $\pm$ 10,54	61,20 $\pm$ 11,35	58,50 $\pm$ 11,11	28,62 $\pm$ 11,32	33,75 $\pm$ 13,13 <sup>c</sup>	31,12 $\pm$ 12,43 <sup>b</sup>	32,95 $\pm$ 11,64	29,29 $\pm$ 13,06 <sup>a</sup>
<b>Invierno</b> n=21	54,64 $\pm$ 9,23	59,53 $\pm$ 7,51	56,53 $\pm$ 8,81	34,08 $\pm$ 5,80	33,90 $\pm$ 7,56 <sup>c</sup>	33,99 $\pm$ 6,59 <sup>b</sup>	34,27 $\pm$ 5,83	33,73 $\pm$ 7,37 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> (p<0.05), <sup>b</sup> (p<0.01), <sup>c</sup> (p<0.001)

MRP: movimiento rápido progresivo a la pre congelación, MRPD: movimiento rápido progresivo a la descongelación

Figura 18. Movimiento total medio observado a la descongelación (MTD) en cada estación por individuo.

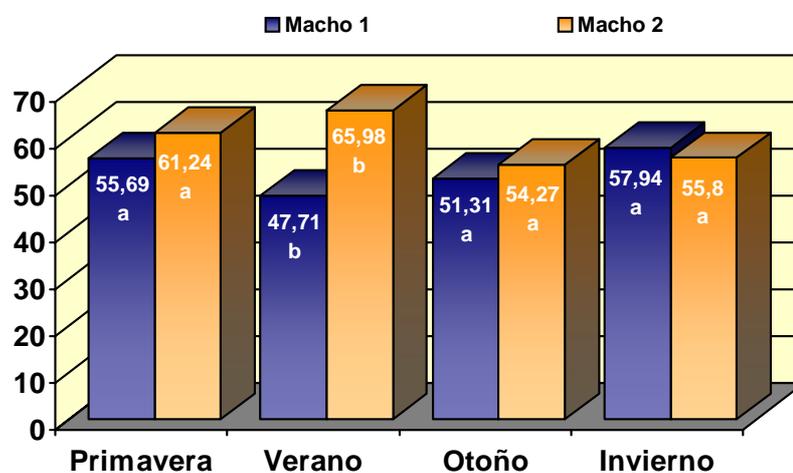
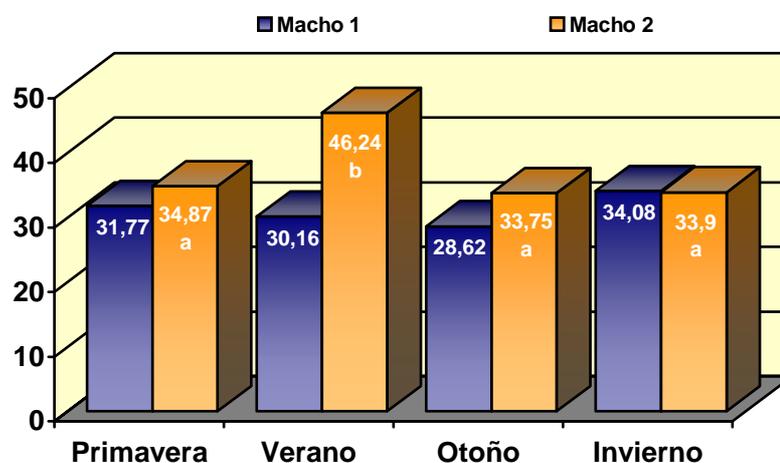


Figura 19. Movimiento rápido progresivo medio observado a la descongelación (MRPD) en cada estación por individuo.



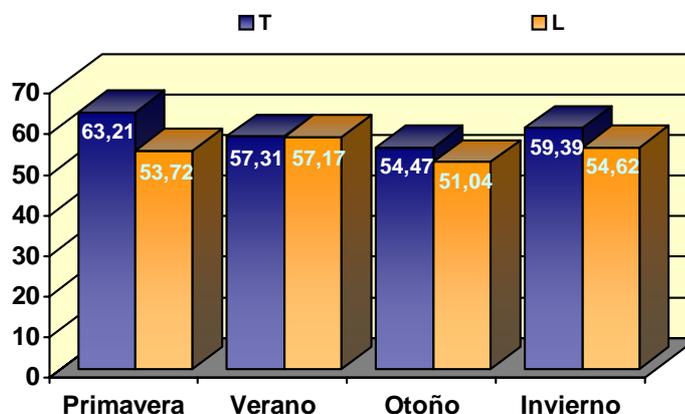
Sin embargo, tras analizar de forma individual el efecto de la estación, en la que se recoge el esperma, sobre el MTD registrado por cada macho (Figura 18), obtuvimos diferencias significativas en el macho 1 ( $p < 0.05$ ), observándose valores similares en otoño ( $51.31 \pm 13.18$  %), invierno ( $57.94 \pm 8.48$  %) y primavera ( $55.69 \pm 10.09$  %), que disminuyeron significativamente en verano ( $47.71 \pm 11.07$  %). Asimismo, el macho 2

también mostró variaciones estacionales ( $p < 0.05$ ), con valores similares en otoño ( $54.27 \pm 15.56 \%$ ), invierno ( $55.80 \pm 12.67 \%$ ) y primavera ( $61.24 \pm 20.27 \%$ ), para aumentar de forma significativa en verano ( $65.98 \pm 13.06 \%$ ), junto con el MRPD ( $46.24 \pm 10.88 \%$ ) que en este macho mostró diferencias muy significativas según la estación del año ( $p < 0.001$ ), a diferencia del macho 1 que mantiene porcentajes prácticamente constantes durante el estudio.

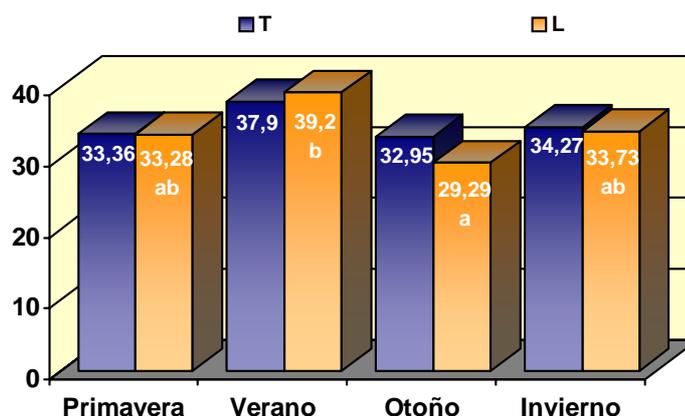
Por otra parte, al estudiar el efecto de la estación sobre el MTD y el MRPD registrado por ambos diluyentes durante el estudio (Figuras 20 y 21), no observamos diferencias significativas entre estaciones ( $p > 0.05$ ) en los dos diluyentes estudiados, para el MTD. Sin embargo, el diluyente lácteo (L) sí mostró diferencias significativas en los resultados de MRPD obtenidos según la estación ( $p < 0.05$ ) con valores similares durante las estaciones de invierno y primavera ( $33.73 \pm 7.37 \%$  y  $33.28 \pm 13.26 \%$ , respectivamente) pero con diferencias estadísticamente significativas entre otoño y verano ( $29.29 \pm 13.06 \%$  vs  $39.20 \pm 15.56 \%$ ).

Así, la respuesta al Tris (T) dio valores similares en verano e invierno con un MTD medio de  $57.31 \pm 13.24 \%$  y  $59.39 \pm 8.21 \%$ , respectivamente, que disminuyó de forma suave en otoño ( $54.47 \pm 13.35 \%$ ), y aumentó significativamente en primavera ( $63.21 \pm 10.11 \%$ ). No obstante, el MTD obtenido con el diluyente lácteo (L) mostró una distribución más homogénea durante la experiencia, si bien se aprecia un ligero aumento en verano ( $57.17 \pm 17.15 \%$ ). Con respecto al MRPD se aprecia un ligero aumento durante el verano ( $37.90 \pm 10.40 \%$ ) empleando el diluyente T, aunque las diferencias no fueron significativas ( $p > 0.05$ ).

**Figura 20. Movimiento total medio observado a la descongelación (MTD) en cada estación por diluyente (T= Tris; L=lácteo).**

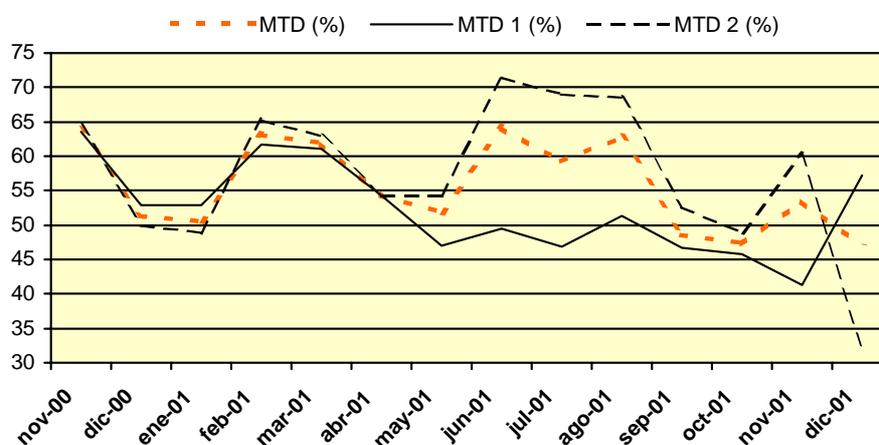


**Figura 21. Movimiento rápido progresivo medio observado a la descongelación (MRPD) en cada estación por diluyente (T= diluyente Tris; L= diluyente lácteo).**



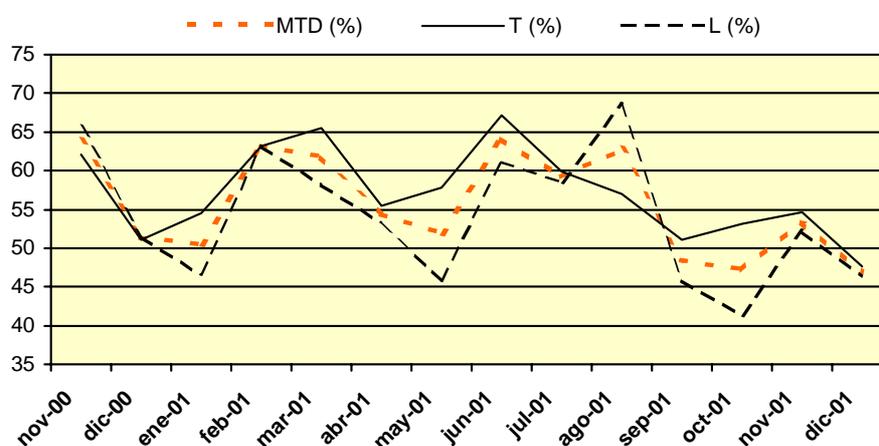
En la figura 22, donde se representa gráficamente la evolución del MTD medio, obtenido en cada macho, con respecto a la media observada a lo largo de los catorce meses de estudio, se aprecian variaciones individuales entre machos ( $p < 0.01$ ), y las diferencias son muy significativas en los valores de MTD según el mes de estudio ( $p < 0.001$ ), registrándose porcentajes superiores en noviembre de 2000, así como en febrero, marzo, junio, julio y agosto de 2001, que disminuyeron de forma significativa durante los meses de septiembre, octubre y diciembre de 2001.

**Figura 22. Variación del movimiento total medio a la descongelación (MTD) respecto a la media en cada uno de los machos estudiados durante los 14 meses de estudio.**



MTD= movimiento total medio observado a la descongelación por ambos machos; MTD 1= movimiento total medio observado a la descongelación por el macho 1; MTD 2= movimiento total medio observado a la descongelación por el macho 2.

**Figura 23. Movimiento total medio observado a la descongelación (MTD) para cada diluyente respecto a la media, durante los 14 meses de estudio.**



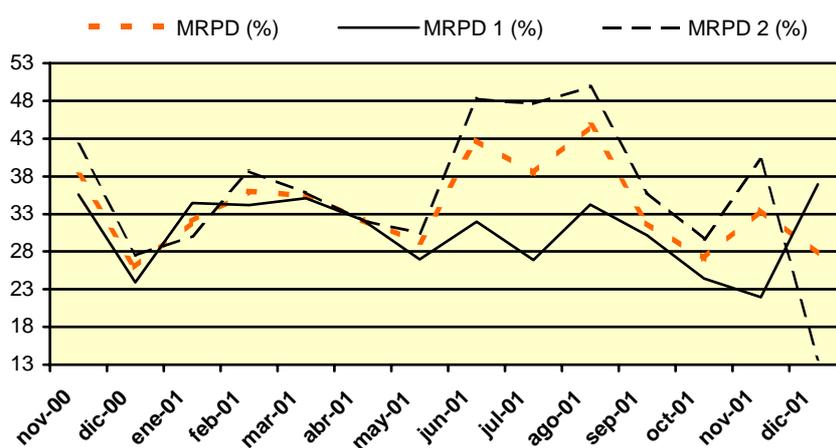
MTD= movimiento total medio observado a la descongelación por ambos machos; T= movimiento total medio observado a la descongelación por el Tris; L= movimiento total medio observado a la descongelación por el diluyente lácteo.

Al representar gráficamente la evolución del MTD para cada diluyente a lo largo de todo el periodo de estudio (Figura 23), observamos que ambos diluyentes mostraron

una distribución similar durante dicho periodo, aunque el Tris (T) registró valores significativamente superiores en marzo y junio de 2001 ( $65.47 \pm 7.07 \%$  y  $67.17 \pm 14.16 \%$ , respectivamente), que disminuyeron hasta alcanzar valores mínimos en diciembre de 2001 ( $47.62 \pm 12.58 \%$ ); mientras que el diluyente lácteo (L) obtuvo valores máximos en agosto ( $68.57 \pm 16.17 \%$ ) y mínimos en octubre de 2001 ( $41.39 \pm 12.08 \%$ ).

La representación gráfica de la evolución del MRPD obtenido a lo largo del estudio (Figura 24), nos permite observar que existen variaciones individuales entre machos ( $p < 0.001$ ), y diferencias significativas según el mes de estudio ( $p < 0.001$ ), registrándose los porcentajes más elevados en junio, julio y agosto, y los mínimos en diciembre de 2000 y en octubre de 2001. Por otra parte, aunque se apreciaba una distribución similar del MRPD en ambos machos, los valores de MRPD fueron significativamente superiores en el macho 2 durante los meses de mayo a septiembre de 2001.

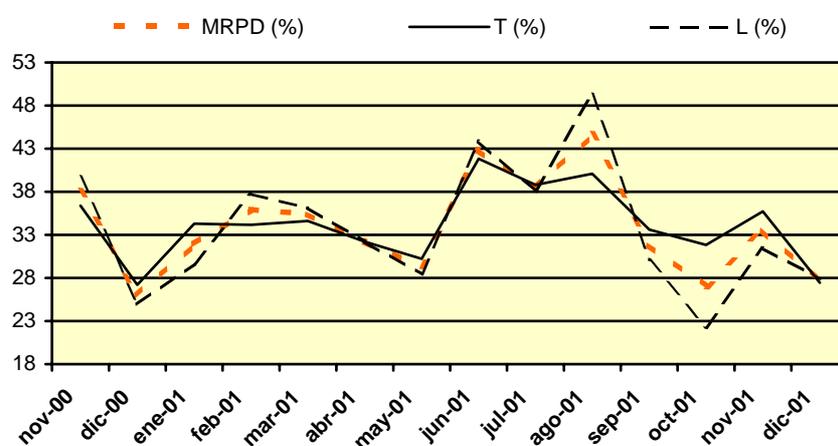
**Figura 24. Variación del movimiento rápido progresivo medio a la descongelación (MRPD) respecto a la media en cada uno de los machos estudiados durante los 14 meses de estudio.**



MRPD= movimiento rápido progresivo medio observado a la descongelación por ambos machos; MRPD 1= movimiento rápido progresivo observado a la descongelación por el macho 1; MRPD 2= movimiento rápido progresivo observado a la descongelación por el macho 2.

Al observar la distribución del MRPD según el diluyente empleado se aprecia una distribución prácticamente igual para ambos (Figura 25), aunque en los meses de julio a noviembre de 2001 las diferencias fueron significativas ( $p < 0.05$ ), por la respuesta observada en el macho 2, que mostró valores máximos en agosto y mínimos en octubre de 2001.

**Figura 25. Movimiento rápido progresivo medio observado a la descongelación (MRPD) para cada diluyente respecto a la media.**

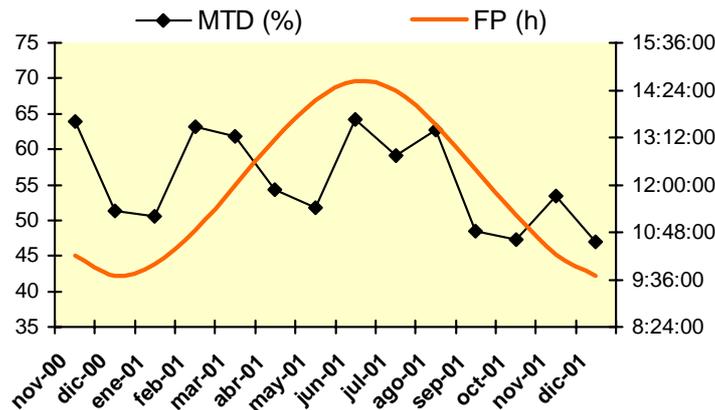


MRPD= movimiento rápido progresivo medio observado a la descongelación por ambos machos; T= movimiento rápido progresivo observado a la descongelación por el Tris; L= movimiento rápido progresivo observado a la descongelación por el diluyente lácteo.

En cuanto al posible efecto del fotoperiodo sobre la evolución del MTD y MRPD a lo largo del estudio (Figuras 26 y 27), no se observaron diferencias significativas en el MTD entre ambos fotoperiodos ( $p > 0.05$ ), mostrándose de forma casi constante a lo largo del mismo; no obstante, se registraron valores ligeramente superiores durante el fotoperiodo ascendente ( $57.70 \pm 12.89 \%$ ), e inferiores durante el descendente ( $54.21 \pm 14.79 \%$ ), algo similar a lo observado en el MRPD que alcanzó valores ligeramente superiores durante el ascendente ( $34.08 \pm 8.22 \%$ ). Se apreció un aumento progresivo del MTD y MRPD a partir del solsticio de invierno, que descendió en abril y mayo de 2001, para volver a aumentar hasta el solsticio de verano. A

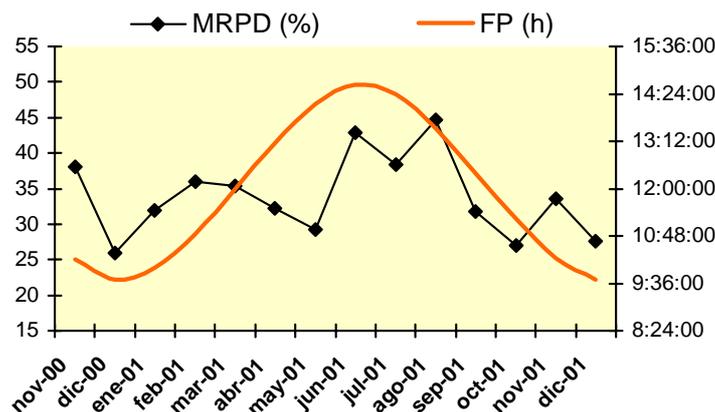
continuación, disminuyó progresivamente hasta el final del periodo de estudio, registrándose un pequeño aumento de MRPD en noviembre de 2001.

**Figura 26. Evolución del movimiento total medio observado a la descongelación (MTD) respecto al fotoperiodo por ambos machos.**



MTD= movimiento total medio observado a la descongelación por ambos machos; FP= Fotoperiodo.

**Figura 27. Evolución del movimiento rápido progresivo medio a la descongelación (MRPD) respecto al fotoperiodo durante el estudio por ambos machos.**

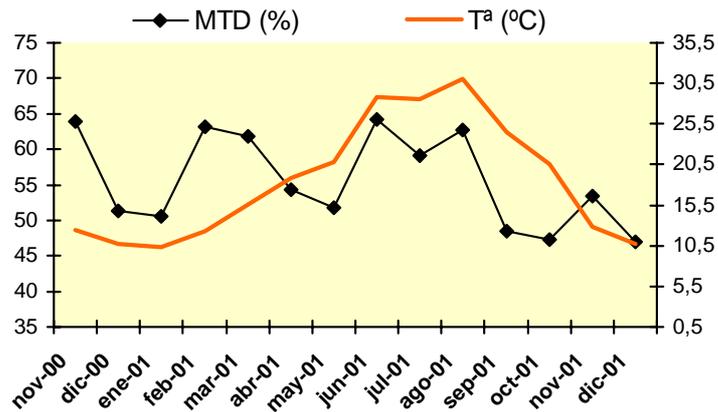


MRPD= movimiento rápido progresivo medio observado a la descongelación por ambos machos; FP= Fotoperiodo.

La temperatura media ambiental mostró una influencia significativa sobre el MTD y MRPD a lo largo de todo el periodo de estudio ( $p < 0.001$ ), registrándose los valores

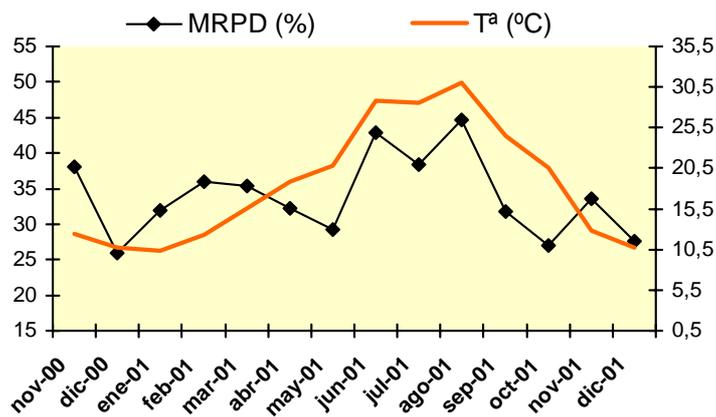
más elevados durante los meses más calurosos (junio, julio y agosto de 2001) (Figuras 28 y 29).

**Figura 28. Movimiento total medio observado a la descongelación (MTD), respecto a la temperatura ambiental media.**



MTD= movimiento total medio observado a la descongelación por ambos machos; T<sup>a</sup>= temperatura ambiental media.

**Figura 29. Movimiento rápido progresivo medio observado a la descongelación (MRPD) durante el estudio, respecto a la temperatura media ambiental.**



MRPD= movimiento rápido progresivo medio observado a la descongelación por ambos machos; T<sup>a</sup>= temperatura ambiental media.

### 5.3.2 Resultados de morfología espermática a la descongelación

La proporción media de espermatozoides morfológicamente normales a la descongelación (ND), fue de  $74.29 \pm 19.48$  % para ambos machos, no registrándose disminución en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales tras el proceso de congelación-descongelación (Tabla 18).

**Tabla 18. Resultados de los porcentajes de morfología espermática obtenidos antes y después de congelar para cada macho y diluyente (media  $\pm$  desviación típica).**

N (%)	MACHO			DILUYENTE	
	1	2	TOTAL	TRIS	LACTEO
<b>precongelación</b> n=128	60,18 $\pm$ 15,37 <sup>a</sup>	90,27 $\pm$ 5,58 <sup>b</sup>	74,20 $\pm$ 19,15		
<b>descongelación</b> n=198	59,77 $\pm$ 15,96 <sup>a</sup>	89,11 $\pm$ 8,47 <sup>b</sup>	74,29 $\pm$ 19,48	73,26 $\pm$ 19,75	75,31 $\pm$ 19,25

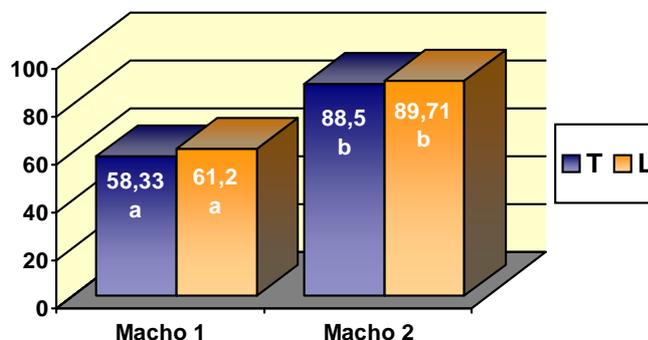
Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.001$ )

N= proporción de espermatozoides morfológicamente normales a la precongelación, ND= proporción de espermatozoides morfológicamente normales a la descongelación.

Además en la misma tabla se representan los valores medios de ND para cada macho y diluyente, observándose diferencias significativas entre individuos ( $p < 0.001$ ), con valores de  $59.77 \pm 15.96$  % y  $89.11 \pm 8.47$  % para los machos 1 y 2, respectivamente, y pérdidas tras el proceso de congelación-descongelación del 0.68% en el macho 1 y del 1.29% en el 2. Sin embargo, no obtuvimos diferencias significativas en la ND ( $p > 0.05$ ) entre los diluyentes empleados, aunque L mostró resultados ligeramente superiores a los mostrados por T (Tabla 18).

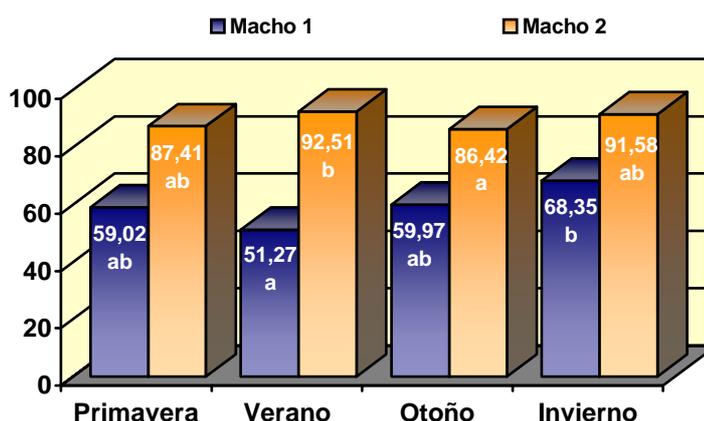
En la figura 30 se observan las diferencias obtenidas en la ND media por diluyente, observándose variaciones individuales para ambos diluyentes ( $p < 0.001$ ) entre machos; así, el macho 2 dio porcentajes significativamente superiores a los del macho 1, tanto con el Tris (T) como con el diluyente lácteo (L). Sin embargo, no obtuvimos diferencias significativas en la ND registrada por cada macho según el diluyente utilizado durante el proceso de congelación-descongelación; no obstante, L obtuvo mejores resultados de ND respecto a T en ambos machos.

**Figura 30. Morfología espermática media observada a la descongelación (ND) en cada individuo, según el diluyente (T= diluyente Tris; L= diluyente lácteo).**



Tras analizar el efecto de la estación sobre la evolución de la ND a lo largo del periodo de estudio (Tabla 19), no obtuvimos diferencias significativas entre estaciones ( $p > 0.05$ ), manifestando una distribución casi constante durante el estudio, aunque en invierno se registraron valores ligeramente superiores al resto de estaciones ( $79.41 \pm 16.52\%$ ), pero no estadísticamente significativas.

**Figura 31. Morfología espermática observada a la descongelación (ND) en cada estación por individuo.**

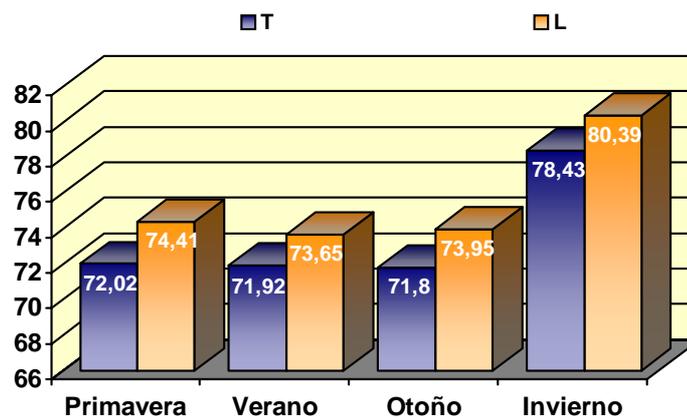


Sin embargo, al evaluar el efecto de la estación sobre la ND registrada en cada macho (Figura 31), obtuvimos diferencias significativas según la estación ( $p < 0.01$  respecto al macho 1,  $p < 0.05$  respecto al 2). Así pues, el macho 1 mostró valores

significativamente menores en verano ( $51.27 \pm 10.44$  %) y mayores en invierno ( $68.35 \pm 15.09$  %); mientras que el macho 2 registró diferencias significativas entre el otoño ( $86.42 \pm 10.48$  %) y el verano ( $92.51 \pm 6.01$  %).

Además, la evaluación del efecto de la estación sobre la evolución de la ND en los dos diluyentes estudiados (Figura 32), no refleja diferencias significativas entre estaciones ( $p > 0.05$ ), mostrando ambos diluyentes valores parecidos a lo largo del estudio; no obstante, el porcentaje de espermatozoides normales a la descongelación fue ligeramente superior en invierno con ambos diluyentes ( $78.43 \pm 17.81$  % para T y  $80.39 \pm 15.50$  % para L).

**Figura 32. Morfología espermática observada a la descongelación (ND) en cada estación por diluyente (T= diluyente Tris; L= diluyente lácteo).**



**Tabla 19. Porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales a la precongelación y descongelación según la estación del año por individuo y diluyente (media  $\pm$  desviación típica).**

ESTACIÓN	N (%)			ND (%)			ND (%)	
	1	2	Total	1	2	Total	TRIS	LACTEO
<b>Primavera</b> n=14	48,38 $\pm$ 13,79 <sup>c</sup>	92,89 $\pm$ 3,78 <sup>b</sup>	70,63 $\pm$ 24,80 <sup>a</sup>	59,02 $\pm$ 12,77 <sup>b</sup>	87,41 $\pm$ 5,25 <sup>a</sup>	73,21 $\pm$ 17,34	72,02 $\pm$ 19,31	74,41 $\pm$ 15,77
<b>Verano</b> n=23	50,15 $\pm$ 13,35 <sup>c</sup>	93,73 $\pm$ 4,84 <sup>b</sup>	67,90 $\pm$ 24,25 <sup>a</sup>	51,27 $\pm$ 10,44 <sup>b</sup>	92,51 $\pm$ 6,01 <sup>a</sup>	72,79 $\pm$ 22,43	71,92 $\pm$ 23,20	73,65 $\pm$ 22,12
<b>Otoño</b> n=41	74,05 $\pm$ 9,75 <sup>c</sup>	88,81 $\pm$ 5,22 <sup>b</sup>	82,25 $\pm$ 10,53 <sup>a</sup>	59,97 $\pm$ 17,67 <sup>b</sup>	86,42 $\pm$ 10,48 <sup>a</sup>	72,87 $\pm$ 19,70	71,80 $\pm$ 19,03	73,95 $\pm$ 20,51
<b>Invierno</b> n=21	64,39 $\pm$ 9,87 <sup>c</sup>	86,92 $\pm$ 5,88 <sup>b</sup>	73,11 $\pm$ 13,98 <sup>a</sup>	68,35 $\pm$ 15,09 <sup>b</sup>	91,58 $\pm$ 10,31 <sup>a</sup>	79,41 $\pm$ 16,52	78,43 $\pm$ 17,81	80,39 $\pm$ 15,50

<sup>a</sup> (p<0.05), <sup>b</sup> (p<0.01), <sup>c</sup> (p<0.001)

N: porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales obtenidos a la precongelación, ND: porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales obtenidos a la descongelación.

**Tabla 20. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro a la precongelación y descongelación según la estación del año por individuo y diluyente (media  $\pm$  desviación típica).**

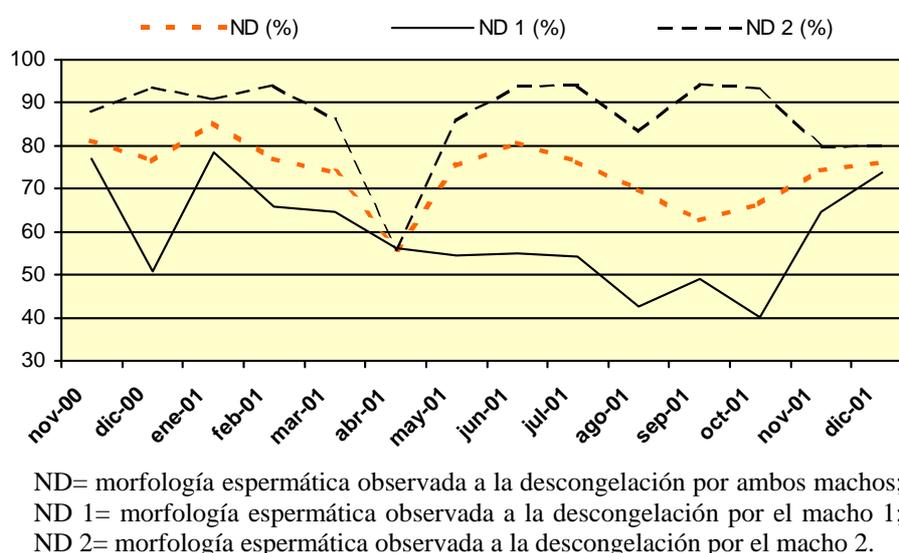
ESTACIÓN	I (%)			ID (%)			ID (%)	
	1	2	Total	1	2	Total	TRIS	LACTEO
<b>Primavera</b> n=14	91,15 $\pm$ 4,37 <sup>b</sup>	92,62 $\pm$ 4,58 <sup>b</sup>	91,88 $\pm$ 4,44 <sup>c</sup>	50,74 $\pm$ 17,15	54,62 $\pm$ 14,88	52,68 $\pm$ 15,88	52,36 $\pm$ 17,14	53,01 $\pm$ 15,15
<b>Verano</b> n=23	86,78 $\pm$ 5,11 <sup>b</sup>	88,57 $\pm$ 4,37 <sup>b</sup>	87,55 $\pm$ 4,81 <sup>c</sup>	48,74 $\pm$ 12,88	47,40 $\pm$ 14,80	48,07 $\pm$ 13,73	41,46 $\pm$ 12,04	54,67 $\pm$ 12,21
<b>Otoño</b> n=41	90,75 $\pm$ 4,71 <sup>b</sup>	91,94 $\pm$ 4,02 <sup>b</sup>	91,36 $\pm$ 4,36 <sup>c</sup>	49,63 $\pm$ 16,03	55,21 $\pm$ 14,33	52,42 $\pm$ 15,36	48,66 $\pm$ 15,73	56,18 $\pm$ 14,21
<b>Invierno</b> n=21	92,24 $\pm$ 4,00 <sup>b</sup>	94,66 $\pm$ 3,00 <sup>b</sup>	92,62 $\pm$ 4,50 <sup>c</sup>	55,26 $\pm$ 12,39	50,68 $\pm$ 15,31	53,21 $\pm$ 13,77	52,02 $\pm$ 15,95	54,29 $\pm$ 11,79

<sup>a</sup> (p<0.05), <sup>b</sup> (p<0.01), <sup>c</sup> (p<0.001)

I: porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro obtenidos a la precongelación, ID: porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro obtenidos a la descongelación.

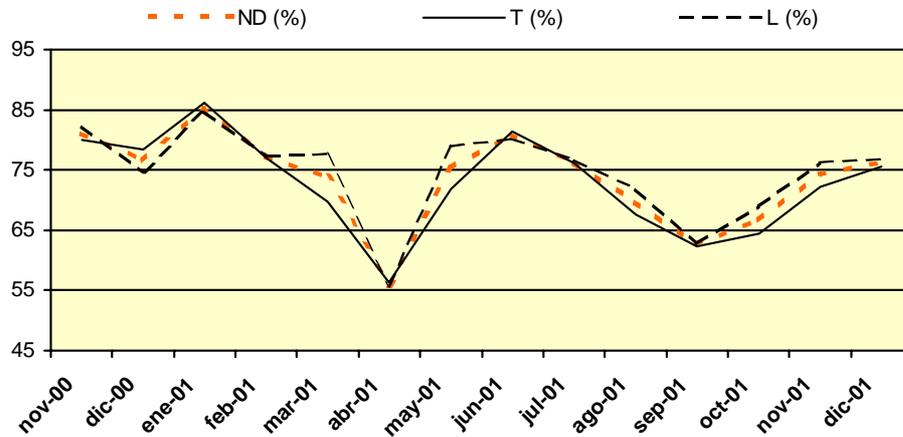
Por otro lado, obtuvimos diferencias significativas en la ND media según el mes del año ( $p < 0.05$ ), registrándose valores similares a lo largo de toda la experiencia (Figura 33), aunque apreciamos un aumento estadísticamente significativo de la ND correspondiente al mes de enero, que disminuyó hasta alcanzar valores mínimos en abril y septiembre. En la figura 33 podemos apreciar también variaciones individuales en la ND ( $p < 0.001$ ) entre donantes de esperma, de manera que el macho 1 mostró valores significativamente inferiores al 2 durante el estudio.

**Figura 33. Variación de la morfología espermática media obtenida a la descongelación (ND) respecto a la media de cada macho.**



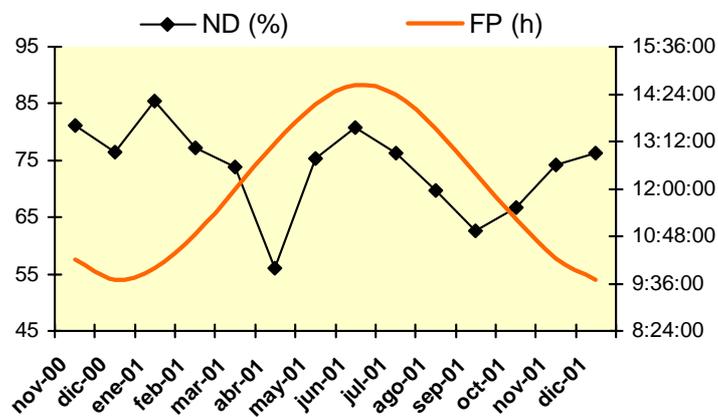
De igual modo, el porcentaje de espermatozoides normales a la descongelación (ND) reflejó variaciones mensuales significativas en ambos machos ( $p < 0.001$ ); así pues, el macho 1 durante los meses de agosto y octubre de 2001 registró valores significativamente menores al resto del año, mientras que en noviembre de 2000, enero y diciembre de 2001 se registraron los valores máximos. Por otra parte, el macho 2 mostró una distribución más uniforme a lo largo de todo el periodo de estudio, aunque se registraran los valores más bajos en noviembre y diciembre de 2001 y los más elevados en diciembre de 2000, febrero, junio, julio, septiembre y octubre de 2001.

**Figura 34. Morfología espermática media obtenida a la descongelación (ND) para cada diluyente respecto a la media.**



ND= morfología espermática observada a la descongelación por ambos machos;  
 T= morfología espermática observada a la descongelación por el Tris; L= morfología espermática observada a la descongelación por el diluyente lácteo.

**Figura 35. Evolución de la morfología espermática a la descongelación (ND) respecto al fotoperiodo durante el estudio por ambos machos.**



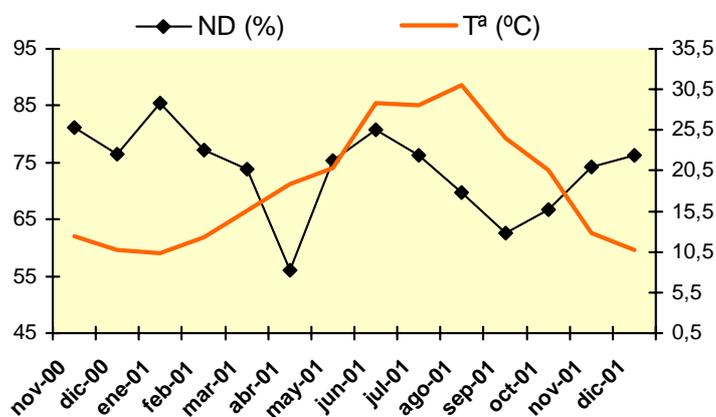
ND= morfología espermática observada a la descongelación por ambos machos; FP= fotoperiodo.

La figura 34 representa la variación de la ND a lo largo del estudio para cada diluyente, no observándose diferencias significativas entre ambos ( $p > 0.05$ ). Del mismo modo, no se observaron variaciones mensuales en los resultados de ND registrados por

ambos diluyentes ( $p>0.05$ ); si bien, se observa un leve aumento en enero, y un pequeño descenso en abril.

En cuanto al efecto del fotoperiodo, sobre la evolución de la ND durante el estudio (Figura 35), no observamos diferencias significativas entre ambos ( $p>0.05$ ), aunque los resultados obtenidos durante el ascendente fueron ligeramente superiores a los registrados en el descendente ( $76.30 \pm 17.24\%$  vs  $73.14 \pm 20.63\%$ ). Se observa un descenso progresivo de la ND a partir del solsticio de invierno, hasta alcanzar el mínimo en abril de 2001; seguido de un importante aumento hasta el solsticio de verano, para volver a descender hasta el siguiente solsticio de invierno. A continuación, aumentó de forma progresiva hasta el final de la experiencia, coincidiendo con el paso de días cortos a largos.

**Figura 36. Morfología espermática media observada a la descongelación (ND) durante el estudio, respecto a la temperatura media ambiental.**



ND= morfología espermática observada a la descongelación por ambos machos; Tª= temperatura ambiental media.

La temperatura ambiental media, mostró una influencia significativa sobre la evolución de la ND a lo largo de los catorce meses de estudio ( $p<0.01$ ), apreciándose un descenso de la misma conforme aumentó la temperatura ambiental, para seguidamente registrar una progresiva elevación, coincidiendo con el descenso de las temperaturas (Figura 36).

### 5.3.3 Resultados de integridad de acrosoma a la descongelación

El porcentaje medio de espermatozoides con acrosomas íntegros a la descongelación, (ID) fue de  $51.61 \pm 14.78$  % para ambos machos, registrándose una pérdida media del 43.29%, tras el proceso de congelación-descongelación, muy similar cuando se consideró la respuesta individual por macho, 43.73% para el macho 1 y 42.91% para el 2 (Tabla 21), y no se observan diferencias individuales significativas ( $p > 0.05$ ); no obstante, el macho 2 registró valores medios ligeramente superiores ( $52.44 \pm 14.82$  %) a los obtenidos por el 1 ( $50.81 \pm 14.78$  %).

**Tabla 21. Resultados de integridad de acrosoma obtenidos en la valoración de espermatozoides pre congelado y descongelado para cada macho y diluyente (media  $\pm$  desviación típica).**

I (%)	MACHO			DILUYENTE	
	1	2	TOTAL	TRIS	LACTEO
<b>congelación</b> n=128	90,30 $\pm$ 4,91	91,85 $\pm$ 4,43	91,00 $\pm$ 4,74		
<b>descongelación</b> n=198	50,81 $\pm$ 14,78	52,44 $\pm$ 14,82	51,61 $\pm$ 14,78	48,17 $\pm$ 15,50 <sup>a</sup>	54,98 $\pm$ 13,28 <sup>b</sup>

Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.01$ )

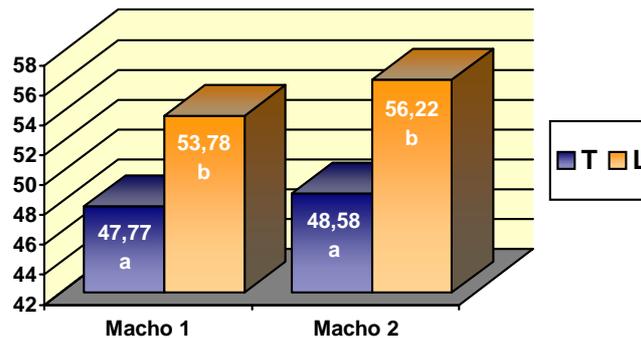
I= porcentaje medio de espermatozoides con acrosoma íntegro a la pre congelación, ID= porcentaje medio de espermatozoides con acrosoma íntegro a la descongelación.

Por el contrario, el diluyente empleado, sí influyó de manera significativa sobre los resultados de ID obtenidos a lo largo del estudio ( $p < 0.01$ ), así el porcentaje medio de espermatozoides íntegros fue significativamente superior con el diluyente lácteo (L) que con el Tris (T) ( $54.98 \pm 13.28$  % vs  $48.17 \pm 15.50$  %). Además, las pérdidas registradas durante el proceso de congelación-descongelación fueron menores para las dosis diluyoconservadas con el diluyente lácteo (39.58%) que en las de Tris (47.07%).

En cuanto al efecto de la estación del año sobre la evolución de la ID a lo largo del estudio (Tabla 20), no obtuvimos diferencias significativas entre estaciones ( $p > 0.05$ ), registrándose valores similares durante dicho periodo, aunque se apreció un ligero descenso en verano ( $48.07 \pm 13.73$  %), que no fue estadísticamente significativo. Por otra parte, se registraron pérdidas del 42.66% en primavera, 45.09% en verano, 42.62%

en otoño y 42.83% en invierno, con respecto a los valores medios obtenidos en cada estación antes de la congelación.

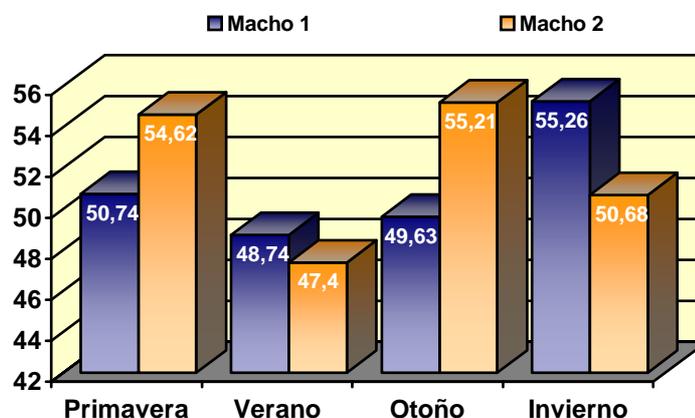
**Figura 37. Integridad de acrosoma observada a la descongelación (ID) en cada individuo, según el diluyente (T= diluyente Tris; L= diluyente lácteo).**



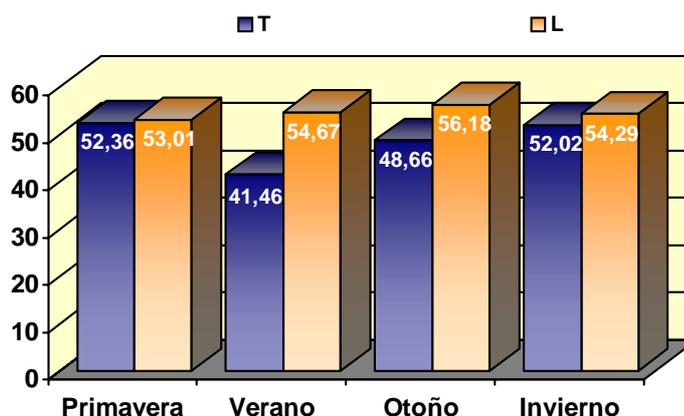
Tras analizar el efecto del macho sobre la ID obtenida por cada diluyente (Figura 37), no observamos variaciones individuales ( $p > 0.05$ ) entre ambos; así, el Tris (T) registró valores de  $47.77 \pm 16.17 \%$  y  $48.58 \pm 14.94 \%$  para los machos 1 y 2, respectivamente; mientras que el diluyente lácteo (L) mostró resultados de  $53.78 \pm 12.74 \%$  para el macho 1 y  $56.22 \pm 13.85 \%$  para el 2. Sin embargo, al valorar el efecto del diluyente sobre los resultados de ID obtenidos en cada macho, si observamos diferencias significativas entre diluyentes ( $p < 0.05$ ), de manera que L registró valores significativamente superiores a los obtenidos por T en ambos machos.

Al analizar de forma individual el efecto de la estación sobre la ID obtenida por cada macho (Figura 38), tampoco obtuvimos diferencias significativas entre estaciones ( $p > 0.05$ ), si bien ambos machos mostraron un ligero descenso en verano ( $48.74 \pm 12.88 \%$  respecto al macho 1 y  $47.40 \pm 14.80 \%$  respecto al 2). Del mismo modo, el diluyente tampoco influyó de manera significativa sobre los resultados de ID obtenidos en las distintas estaciones del año ( $p > 0.05$ ), mostrando ambos diluyentes valores similares a lo largo de dicho estudio (Figura 39).

**Figura 38. Integridad de acrosoma observada a la descongelación (ID) en cada estación por individuo.**

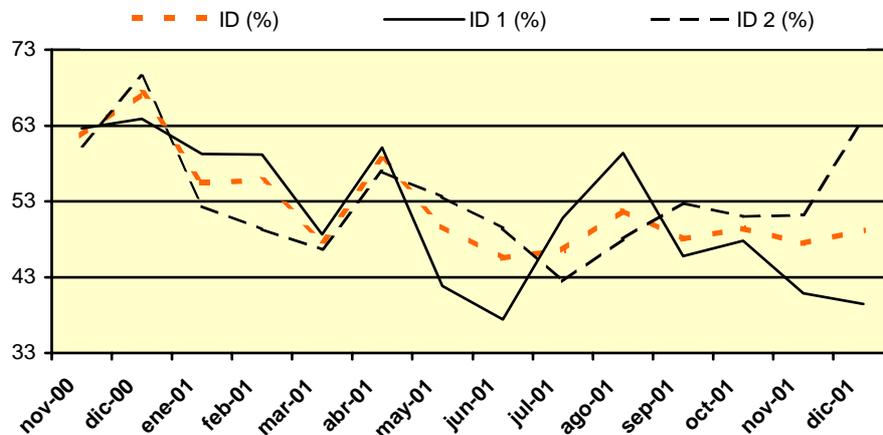


**Figura 39. Integridad de acrosoma observada a la descongelación (ID) en cada estación por diluyente (T= diluyente Tris; L= diluyente lácteo).**



Sin embargo, la representación gráfica de la variación de la ID a lo largo de los catorce meses de estudio (Figura 40), nos permite observar la existencia de variaciones mensuales ( $p < 0.001$ ), correspondiendo los valores más elevados a los meses de noviembre y diciembre de 2000, para descender progresivamente hasta abril, manteniéndose prácticamente constantes hasta el final del periodo de estudio y alcanzando los valores mínimos en junio, julio y noviembre de 2001.

**Figura 40. Variación de la integridad de acrosoma a la descongelación (ID) respecto a la media en cada uno de los machos estudiados.**

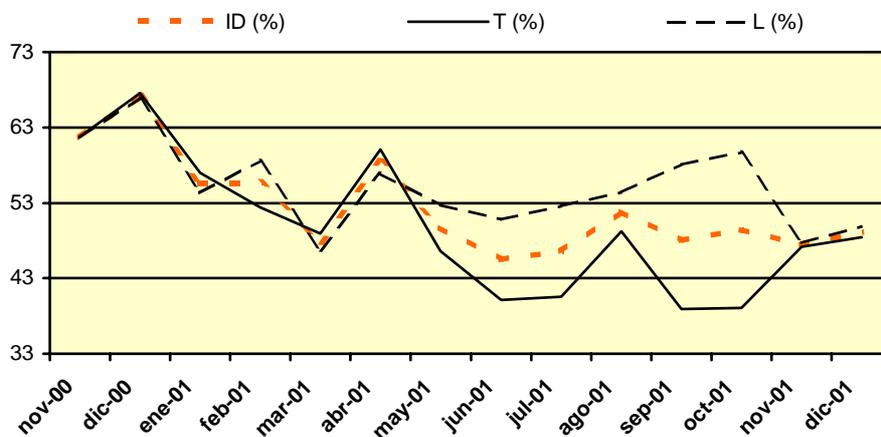


ID= integridad de acrosoma observada a la descongelación por ambos machos;  
 ID 1= integridad de acrosoma observada a la descongelación por el macho 1; ID  
 2= integridad de acrosoma observada a la descongelación por el macho 2.

En la figura 40, no se apreciaban variaciones individuales en los porcentajes de ID ( $p>0.05$ ) en ambos machos. Sin embargo, si se observaron variaciones mensuales en los resultados obtenidos por el macho 1 ( $p<0.01$ ), obteniéndose valores significativamente menores en junio y diciembre de 2001, y mayores en noviembre y diciembre de 2000. Por el contrario, el macho 2 no mostró variaciones mensuales de la ID ( $p>0.05$ ), aunque se apreció un ligero aumento de la misma en diciembre de 2000, que disminuyó hasta registrarse el valor mínimo en julio de 2001.

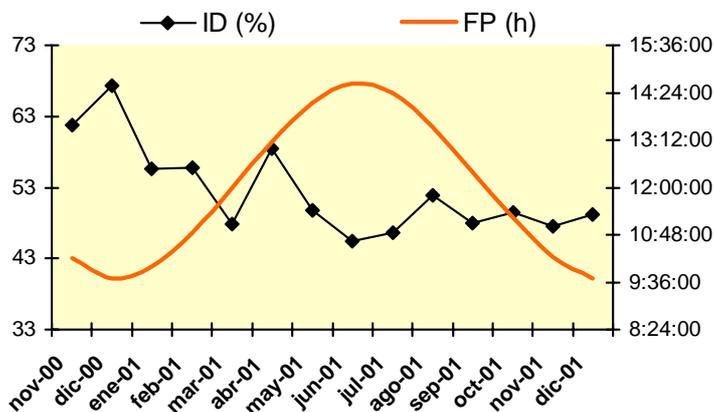
En cuanto a la evolución de la ID, obtenida por cada diluyente durante el estudio (Figura 41), obtuvimos diferencias significativas ( $p<0.01$ ) entre diluyentes, aunque mantuvieron una distribución similar durante los primeros seis meses del estudio (noviembre-abril), momento a partir del cual apreciamos diferencias significativas a favor del diluyente lácteo (L), para volver a hacerse semejantes en los dos últimos meses de estudio (noviembre y diciembre). Por otra parte, T mostró a su vez diferencias mensuales significativas ( $p<0.01$ ), registrándose los valores más elevados en diciembre de 2000 y los mínimos en junio, julio, septiembre y octubre; mientras que el diluyente lácteo no las mostró, aunque los valores de ID registraran un ligero aumento en diciembre de 2000 y descendieran en marzo y noviembre de 2001.

**Figura 41. Integridad de acrosoma apreciada a la descongelación (ID) para cada diluyente respecto a la media.**



ID= integridad de acrosoma observada a la descongelación por ambos machos;  
 T= integridad de acrosoma observada a la descongelación con el diluyente Tris;  
 L= integridad de acrosoma observada a la descongelación con el diluyente lácteo.

**Figura 42. Evolución de la integridad de acrosoma a la descongelación (ID) respecto al fotoperiodo durante el estudio por ambos machos.**

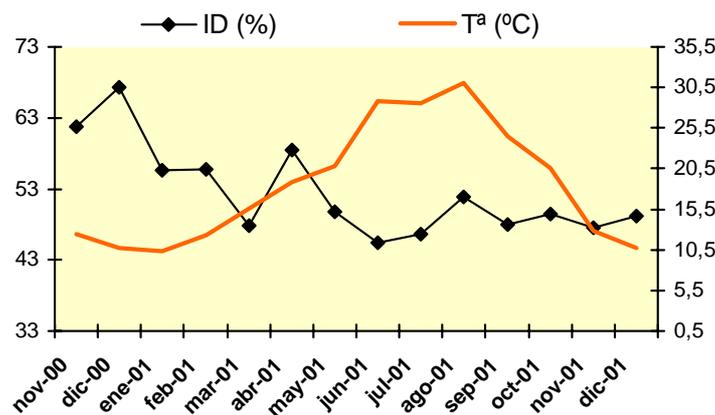


ID= integridad de acrosoma observada a la descongelación por ambos machos; FP= fotoperiodo.

El fotoperiodo no mostró influencia significativa sobre la ID ( $p > 0.05$ ), que mostró un patrón similar, con valores de  $51.62 \pm 15.13$  % durante el descendente y  $51.58 \pm 14.25$  % en ascendente. No obstante, se apreció un ligero descenso de la ID a

partir del solsticio de invierno, que se mantuvo en valores prácticamente constantes durante todo el fotoperíodo ascendente y el descendente, hasta el final del periodo de estudio (Figura 42).

**Figura 43. Integridad de acrosoma observada a la descongelación (ID), respecto a la temperatura ambiental media.**



ID= integridad de acrosoma observada a la descongelación por ambos machos; T<sub>a</sub>= temperatura ambiental media.

Tras analizar el efecto de la temperatura ambiental media sobre la evolución de la ID a lo largo de los catorce meses de estudio (Figura 43), se observaron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), apreciándose un importante descenso en los meses más calurosos (junio y julio).

#### 5.3.4 Correlación entre los distintos parámetros espermáticos a la descongelación.

Al calcular el coeficiente de correlación entre los distintos parámetros seminales a la descongelación, observamos la existencia de correlación entre varios de ellos (Tabla 22), así el MTD mostró correlación significativa con el resto de parámetros espermáticos valorados a la descongelación ( $r = 0.86$ ,  $p < 0.01$  respecto al MRPD;  $r = 0.28$ ,  $p < 0.01$  respecto a la ND;  $r = 0.17$ ,  $p < 0.05$  respecto a la ID).

Asimismo, el MRPD mostró correlación significativa con la ND ( $r=0.30$ ,  $p<0.01$ ), además de con el MTD; mientras que la ND no mostró correlación significativa con la ID ( $p>0.05$ ).

**Tabla 22. Índices de correlación entre parámetros seminales a la descongelación y de éstos con el individuo, estación, mes, diluyente, fotoperiodo y temperatura ambiental media.**

	MTD	MRPD	ND	ID
<b>MTD</b>		,862**	,284**	,166*
<b>MRPD</b>	,862**		,298**	,026 ns
<b>ND</b>	,284**	,298**		,132 ns
<b>ID</b>	,166*	,026 ns	,132 ns	
<b>MACHO</b>	,208**	,278**	,755**	,056 ns
<b>ESTACIÓN</b>	-,070 ns	-,085 ns	,093 ns	,059 ns
<b>MES</b>	-,246**	-,100 ns	-,186**	-,298**
<b>DILUYENTE</b>	-,134 ns	-,058 ns	,053 ns	,231**
<b>FP</b>	,119 ns	,021 ns	,078 ns	-,001 ns
<b>T<sup>a</sup></b>	,058 ns	,186**	-,113 ns	-,215**

\*\* Correlación significativa ( $p<0.01$ ); \* Correlación significativa ( $p<0.05$ ); ns= no significativo

MTD= movimiento total a la descongelación; MRPD= movimiento rápido progresivo a la descongelación; ND= morfología espermática a la descongelación; ID= integridad de acrosoma a la descongelación; FP= fotoperiodo; T<sup>a</sup>= temperatura ambiental media.

Al calcular el coeficiente de correlación de dichos parámetros frente a las variables individuo, estación, mes, diluyente de congelación, fotoperiodo, y temperatura ambiental media, observamos correlación significativa entre el factor individuo y el MTD ( $r=0.21$ ,  $p<0.01$ ), MRPD ( $r=0.28$ ,  $p<0.01$ ) y ND ( $r=0.76$ ,  $p<0.01$ ); sin embargo, no mostró correlación significativa con la ID.

Por otro lado, la estación del año en la que se recoge el esperma y se congela, no mostró correlación significativa frente a los parámetros seminales estudiados a la descongelación; si bien, el mes de estudio mostró una correlación negativa y

significativa con todos los parámetros seminales, a excepción de la MRPD ( $r = -0.25$ ,  $p < 0.01$  respecto al MTD;  $r = -0.19$ ,  $p < 0.05$  respecto a la ND;  $r = -0.30$ ,  $p < 0.01$  respecto a la ID).

El diluyente empleado (L, T) únicamente mostró correlación significativa con la ID ( $r = 0.23$ ,  $p < 0.01$ ). En cuanto a los dos factores ambientales estudiados, el fotoperiodo no mostró correlación con ninguno de los parámetros seminales valorados a la descongelación; mientras que la temperatura ambiental media mostró correlación significativa con el MRPD ( $r = 0.19$ ,  $p < 0.01$ ) y correlación negativa y significativa con la ID ( $r = -0.22$ ,  $p < 0.01$ ).

#### **5.4 Resultados de la Espermatización Manual (EM)**

##### **5.4.1 Resultados obtenidos durante el periodo de control de salida a celo**

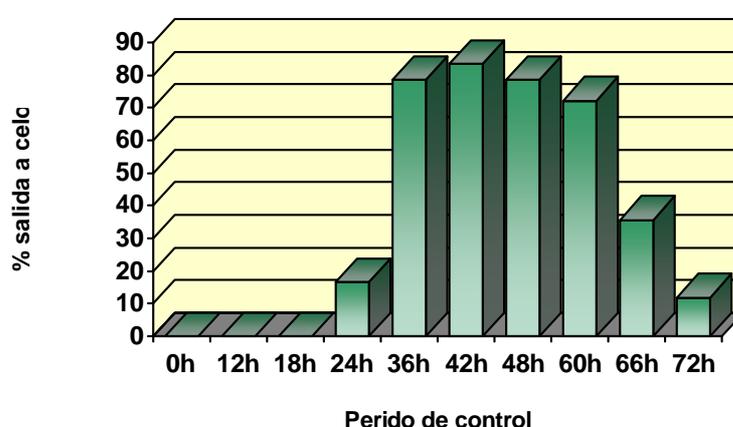
Las manifestaciones de celo fueron detectadas en el 90.48% de las hembras (38/42) a las  $31.86 \pm 1.91$  h., después de la retirada de las esponjas. Cuatro de las cuarenta y dos cabras (9.52%), no mostraron signos de celo durante el período de control, no haciéndolo tampoco en el siguiente ciclo estral (Tabla 23).

**Tabla 23. Resultados de salida a celo de las cabras sincronizadas con esponjas vaginales de 45 mg de FGA durante 11 días y una dosis de eCG y Cloprostenol el día 9.**

<b>Duración celo (h)</b>	<b>Frecuencia (n)</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
6	4	9,52
12	9	21,43
24	12	28,47
30	7	16,67
36	5	11,90
42	1	2,38
Subtotal	38	90,48
No celo	4	9,52
Total	42	100,0

La duración media de los celos observados fue de  $22.42 \pm 1.64$  h, con una duración mínima de 6 horas (9.52%) y máxima de 42 horas (2.38%). Doce, de las cuarenta y dos hembras (28.47%), presentaron celos con una duración de 24 horas, mientras que en nueve (21.43%), siete (16.67%) y cinco (11.90%), sus celos duraron 12, 30 y 36 horas, respectivamente (Tabla 23).

**Figura 44. Distribución del celo inducido y sincronizado con 11 días de esponjas vaginales de 45 mg de FGA (n= 42).**



Durante los dos primeros controles, a las 12 y 18 horas de la retirada de esponjas, no se detectó ninguna hembra con síntomas de celo, sin embargo a las 24 horas el 16.66% (7/42) de las hembras lo manifestaron, mientras que a las 72 horas solamente fue detectado en el 11.90% del total de hembras sincronizadas (5/42). El lote de hembras sincronizadas presentó celos agrupados, de modo que el 78.57% (33/42) del total manifestaron celo entre las 36 y las 48 horas; sin embargo, el máximo porcentaje de presencia de síntomas de celo se registró a las 42 horas después de la retirada de esponjas (83.53%). A partir de las 72 horas después de la retirada de esponjas, se detectaron nuevos signos de celo los días 6 (2.38%), 20 (14.28%) y 21 (7.14%) (Figura 44).

## 5.4.2 Espermatización manual vía cervical

### 5.4.2.1 Dosis empleadas

De los 99 eyaculados congelados-descongelados, únicamente 52 (52.53%) superaron el 30% de MRP exigido, tras un periodo de incubación de 60 minutos a +37°C después de la descongelación en ambos diluyentes, de los cuales 22 pertenecían al macho 1 (42.31%) y 30 al 2 (57.69%), no observándose diferencias significativas entre individuos ( $p>0.05$ ). Sin embargo, al analizar la capacidad de congelación-descongelación de las 198 dosis procesadas, ésta se eleva hasta el 66.67% (132/198). Asimismo, apreciamos la existencia de variaciones individuales ( $p<0.05$ ) para éste parámetro (59% vs 74.49%), así como diferencias significativas ( $p<0.05$ ) según el diluyente (74.75% respecto al Tris, 58.59% respecto al diluyente lácteo). Por otro lado, observamos que de las 66 dosis eliminadas (33.33%), 49 de ellas (74.24%) presentan un MRP a la descongelación comprendido entre el 20%-30%, mientras que sólo en 17 (25.75%) es inferior al 20%, lo que representa un 8.59% del total de dosis procesadas.

De los 52 eyaculados seleccionados, tras la valoración realizada a la descongelación, 16 de ellos se seleccionaron para realizar una prueba de campo, con el fin de valorar la fertilidad *in vivo* de los mismos. De los 16 eyaculados seleccionados se eligieron 84 dosis, 36 que pertenecían al macho 1 y 48 al 2.

### 5.4.2.2 Técnica de EM

Se realizó una doble espermatización manual, vía cervical a tiempo fijo, a las  $36.32 \pm 0.46$  h y a las  $60.11 \pm 0.46$  h., después de la retirada de las esponjas. En el 92.86%, se trató de una espermatización cervical, en 31 animales fue proximal y en 8 distal, en el primer o segundo anillo cervical, respectivamente, mientras que en tres de las cuarenta y dos cabras (7.14%) fue uterina.

Durante la primera espermatización observamos que 27 de las 42 cabras (64.29%) presentaban el ostium cervical externo dilatado; sin embargo, durante la segunda únicamente se visualizó en 24 de ellas (57.14%). En cuanto a la existencia de moco o no y su calidad, observamos que durante la primera espermatización 10 de las hembras no

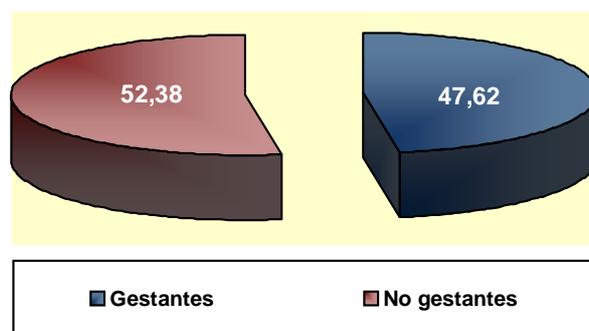
presentaron moco (23.81%), 26 presentaron escaso moco transparente (61.90%), 1 moderado y denso (2.38%) y 5 en gran cantidad (11.90%), siendo en 3 de ellas turbio. Durante la segunda espermatización 22 de las hembras no presentaron moco (52.38%), 18 escaso (42.86%), siendo en 3 de ellas turbio; y 2 en gran cantidad y denso (4.76%).

En cuanto a la visualización de reflujo de esperma hacia vagina tras la espermatización manual, observamos que durante la primera espermatización 15 de las 42 hembras (35.71%) no mostraron reflujo, 13 escaso (30.95%), 7 moderado (16.67%) y 7 profuso (16.67%). Durante la segunda espermatización 13 de 42 hembras (30.95%) no mostraron reflujo, 11 escaso (26.19%), 16 moderado (38.10%) y 2 profuso (4.76%).

#### 5.4.3 Diagnóstico ecográfico de gestación

De las cuarenta y dos hembras espermatizadas, veinte (47.62%) presentaron estructuras propias de la gestación por exploración ecográfica vía rectal, a los 25 días postespermatización.

**Figura 45. Resultados del diagnóstico de gestación por ecografía vía rectal.**



#### 5.4.4 Fertilidad

La fertilidad media obtenida en nuestro estudio fue del 47.62% (20/42), siendo del 55.56% (10/18) para el macho 1 y del 41.67% (10/24) para el 2, aunque no observamos

variaciones individuales en la fertilidad ( $p>0.05$ ) en los dos machos estudiados (Tabla 24).

**Tabla 24. Resultados de fertilidad (%) obtenidos durante el estudio en cada macho.**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Preñadas</b>	10 (55,56%)	10 (41,67%)	20 (47,62%)
<b>No preñadas</b>	8 (44,44%)	14 (58,33%)	22 (52,38%)
<b>TOTAL</b>	18	24	42

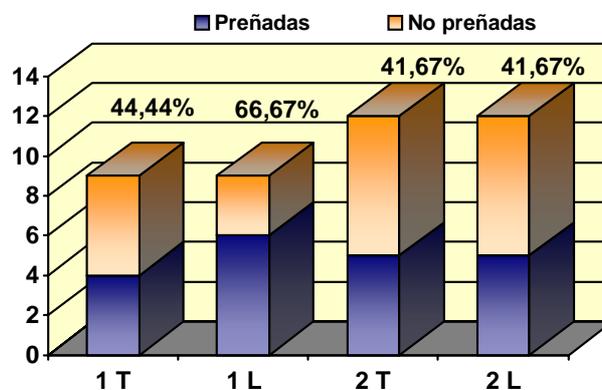
Los resultados de fertilidad obtenidos por ambos diluyentes no mostraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ); no obstante, T registró valores ligeramente inferiores a los obtenidos por L (45% vs 50%) (Tabla 25).

**Tabla 25. Resultados de fertilidad (%) obtenidos durante el estudio para cada diluyente.**

	<b>T</b>	<b>L</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Preñadas</b>	9 (45%)	11 (50%)	20 (47,62%)
<b>No preñadas</b>	11 (55%)	11 (50%)	22 (52,38%)
<b>TOTAL</b>	20	22	42

Al analizar de forma conjunta la fertilidad obtenida por cada macho según el diluyente empleado (Figura 46), no observamos diferencias significativas en los resultados obtenidos ( $p>0.05$ ), de modo que el macho 1 registró índices de fertilidad inferiores cuando su esperma se diluyoconservó con Tris (T) (44.44%), y superiores cuando se empleó el diluyente lácteo (L) (66.67%), pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, el macho 2 mostró valores iguales tanto para el diluyente T como L (41.67%).

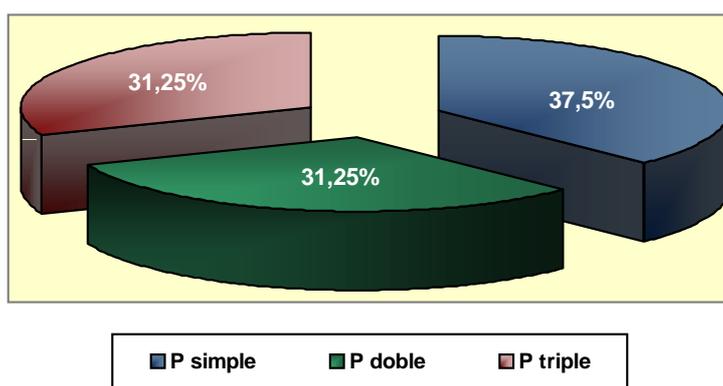
**Figura 46.** Valores medios de fertilidad obtenidos en cada macho (1; 2) según el diluyente de congelación empleado (T= diluyente Tris; L= diluyente lácteo).



#### 5.4.5 Control de parideras

Tras controlar el número de gestaciones a término, hecho en el que basamos el índice de partos, obtuvimos una tasa de fecundidad del 38.10% (16/42), registrándose además 2 abortos (4.76%) y 2 reabsorciones embrionarias (4.76%). En nuestra experiencia observamos una prolificidad media de 2.

**Figura 47.** Frecuencia de partos.



## **6 DISCUSIÓN**

### **6.1 Programa de entrenamiento y selección de los donantes de esperma**

La respuesta obtenida, al programa de entrenamiento, fue similar a la referida por varios autores empleando razas diferentes, en cuanto a la facilidad que esta especie presenta para este tipo de aprendizaje, cuando se comienza a edades tempranas (Pintado y col., 1986; Herrera y col., 1994; Vázquez y col., 1998). En este sentido nuestros resultados son superiores a los obtenidos por Herrera y col. (1994) (50%), pero están por debajo del 90% observado por Pintado y col. (1986), con machos Murciano-Granadinos de 10-12 meses y el 95% apreciado por Vázquez y col. (1998), con machos de 4 meses de edad, y consideramos que estas diferencias se deben a que se utilizaron machos de diferente raza y edades, que se sabe condicionan diferencias en cuanto a la libido, edad a la que alcanzan la pubertad e influencia estacional (Corteel, 1977). Por otro lado, creemos que estas diferencias se deben también, a la influencia ejercida por las condiciones de trabajo en las que se desarrolló esta fase (instalaciones deficientes, animales enfermos, etc), que en muchas ocasiones provocaron la falta de atención por parte del macho frente a la hembra en celo, haciendo que los tiempos obtenidos al primer salto, oscilaran entre 9 segundos y 8 minutos, similares a los referidos por Herrera y col. (1994) en la raza Murciano-Granadina.

### **6.2 Influencia de la estación y factores climáticos sobre la producción y calidad del esperma**

En nuestro estudio, la mayoría de los parámetros espermáticos valorados fueron superiores a los registrados para las razas Boer (Corteel, 1981), Angora (Mendoza y col., 1989), British (Ahmad y Noakes, 1996) y Saanen (Ahmed y col., 1997), y similares a los obtenidos en Murciano-Granadina (Roca y col., 1991a, 1992a y 1992b; Vázquez y col., 1998), Agrupación Caprina Canaria (Cabrera y col., 1998a), Malagueña y Verata (Pérez y col., 1991; Pérez y Mateos, 1996), Alpina, Saanen y Damasco (Karagiannidis y col., 2000), realizados en localizaciones geográficas y condiciones climáticas similares a las acaecidas en nuestra experiencia.

Bien es conocido que, entre otros factores, el volumen eyaculado varía en función del individuo, edad y raza (Corteel, 1975c; Vázquez y col., 1998). Aunque, en nuestra experiencia no observamos fluctuaciones individuales, varios autores recogen que existen diferencias significativas entre individuos (Cabrera y col., 1998b; Roca y col., 1992b; Pérez y Mateos, 1996). Al igual que Vijil y col. (1986) en moruecos Karakul, no apreciamos estacionalidad en los resultados registrados durante el estudio, mostrando una distribución casi constante a lo largo del mismo, a diferencia de lo descrito en otras razas (Delgadillo y col., 1991 en Saanen; Pérez y col., 1991 en Verata, Roca y col., 1992b en Murciano-Granadina; Ahmad y Noakes, 1996 en British; Pérez y Mateos, 1996 en Malagueña y Verata; Cabrera y col., 1998a y b en la Agrupación Caprina Canaria; Karagiannidis y col., 2000 en Alpina, Saanen y Damasco). Por esto consideramos que el volumen eyaculado, ha estado influido más por el grado de madurez de los machos utilizados y por el ritmo de recogida de espermatozoides, que por el propio efecto de la estación (Corteel, 1975c; Summermatter y Fuschini, 1995).

En contraposición a lo aportado por Pérez y col. (1991), Pérez y Mateos (1996), Delgadillo y col. (1999) y Karagiannidis y col. (2000) en otras razas, en nuestro estudio los factores climáticos (fotoperiodo y temperatura ambiental) no mostraron influencia alguna sobre el volumen eyaculado, aunque éste fue ligeramente superior durante el fotoperiodo ascendente, apreciándose un ligero descenso durante los meses más calurosos. Dado que la zona en la que se desarrolla el estudio se caracteriza por una variación fotoperiódica poco intensa, estamos de acuerdo con Folch (1984) y Pelletier y col. (1988) en que la influencia del número de horas de luz al día es poco marcada en estas áreas geográficas.

A diferencia del volumen, aunque la concentración espermática no experimentó variaciones individuales, sí mostró una marcada estacionalidad, incrementándose durante el invierno y la primavera, disminuyendo significativamente en verano y otoño pero sin llegar a los niveles registrados inicialmente. Creemos que a pesar de la posible influencia de la edad en nuestros resultados, ésta no fue suficiente como para enmascarar el efecto que la estación posee sobre este parámetro. Estos resultados son

semejantes a los obtenidos por Cabrera y col. (1998a y b) en la Agrupación Caprina Canaria y Karagiannidis y col. (2000) en Alpina, Saanen y Damasco, quienes observaron valores mínimos en otoño y máximos en primavera. Sin embargo, difieren de los obtenidos por Ahmad y Noakes (1996) en British en el Sur de Inglaterra, Ahmed y col. (1997) trabajando con machos Saanen en Sudan y Delgadillo y col. (1999) en machos Criollos en México, que registraron valores máximos en verano y mínimos en otoño e invierno, si bien estas diferencias pueden ser consecuencia de factores raciales, ambientales y geográficos (Roca y col., 1991a; Pérez y Mateos, 1996; Karagiannidis y col., 2000).

La asociación entre la calidad espermática (volumen, concentración y número total de espermatozoides por eyaculado) y el tamaño testicular, o más concretamente el peso testicular ha sido ampliamente documentada en los pequeños rumiantes (Vijil y col., 1986; Lincoln, 1989; Ritar y col., 1992; Pérez y Mateos, 1993, Walkden-Brown y col., 1994; Delgadillo y col., 1995). Ritar (1991) trabajando con machos Angora observó una variación estacional en la circunferencia escrotal, que se manifiesta con un lapso de tiempo diferente para cada uno de los factores ambientales, aunque se desencadena en el solsticio de verano (Lincoln y Davidson, 1977). En un estudio personal previo, realizado con machos de raza Florida en el Sur de la Península Ibérica, encontramos una estacionalidad moderada en cuanto a la evolución de la circunferencia escrotal, a lo largo del año; con valores máximos en primavera cuando los días son largos y mínimos en otoño cuando la duración del día es corta (Dorado y col., 2002a y b), lo que supone que la actividad testicular, comienza antes del principio del fotoperiodo descendente y la regresión testicular antes de que ésta acabe. En este sentido y al igual que Pérez y Mateos (1996), en machos cabríos de las razas Verata y Malagueña, y Karagiannidis y col. (2000) en las razas Alpina, Saanen y Damasco, se aprecia un aumento de la concentración a partir del solsticio de invierno, hasta alcanzar valores máximos en primavera cuando los días son largos, y que coincidieron con los valores máximos de la circunferencia escrotal.

Sin embargo, la concentración espermática no se mostró influenciada de forma significativa por la temperatura ambiental, aunque sufriera un ligero descenso durante los meses más calurosos (julio y agosto de 2001). De este modo, y tras analizar la correlación entre ambos parámetros concluimos que la temperatura ambiental sólo absorbe el 0.25% de la variabilidad total de la concentración espermática.

En consonancia con lo descrito por otros autores en otras razas (Roca y col., 1992 en Murciano-Granadina; Pérez y Mateos, 1996 en Malagueña y Verata; Karagiannidis y col., 2000 en Alpina, Saanen y Damasco) el movimiento espermático mostró diferencias significativas entre individuos (movimiento total y rápido progresivo). No obstante, se apreció una escasa estacionalidad, no sufriendo cambios importantes a lo largo de la experiencia, lo que coincide con lo observado por Cabrera y col. (1998a y b) trabajando con machos de la Agrupación Caprina Canaria variedad Majorera y Vijil y col. (1986) en ovino Karakul. Sin embargo, Karagiannidis y col. (2000) en las razas Alpina, Saanen y Damasco, apreciaron variaciones estacionales en el movimiento rápido progresivo (MRP), registrando los valores más elevados en verano y otoño. En el presente trabajo encontramos también valores de MRP superiores en verano y otoño, pero no estadísticamente significativos.

Coincidiendo con lo descrito por Cabrera y col. (1998a), el movimiento espermático tampoco estuvo influenciado por el fotoperiodo y la temperatura ambiental, mostrando una distribución prácticamente constante a lo largo de todo el periodo de estudio. Sin embargo, los resultados obtenidos por Pérez y col. (1991) en machos Veratos y Karagiannidis y col. (2000) en las razas Alpina, Saanen y Damasco, muestran un incremento del movimiento espermático durante el fotoperiodo descendente, quizás debido a la amplia variabilidad registrada en la respuesta de cada raza a la evolución del fotoperiodo, junto a la trascendencia de otros factores como la localización geográfica, lo que conduce en ocasiones a encontrar conclusiones contradictorias en la bibliografía actual. En este sentido Pérez y Mateos (1996) trabajando con machos Veratos y Malagueños, únicamente apreciaron la influencia significativa del fotoperiodo sobre el movimiento espermático en la raza Verata.

El valor medio del porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales (N) registrado en nuestra experiencia, fue inferior a los observados por otros autores (Mann y Lutwak-Mann, 1981; Evans y Maxwell, 1987; Chemineau y col., 1991; Roca y col., 1992a; Chauhan y col., 1994; Cabrera y col., 1998a; Vázquez y col., 1998; Karagiannidis y col., 2000), si bien creemos que se debió a la elevada proporción de morfoanomalías presentadas durante todo el estudio por el macho 1, ya que los valores obtenidos por el macho 2 si se corresponden con los valores citados por estos autores (85-95%). Para Evans y Maxwell (1987) el esperma de pequeños rumiantes no debe de presentar más de un 15-20% de espermatozoides morfológicamente anormales, para ser considerado normal y con buena capacidad fertilizante.

Por tanto, coincidiendo con otros investigadores (Pérez y col., 1991; Roca y col., 1992b; Cabrera y col., 1998a; Karagiannidis y col., 2000), observamos variaciones individuales en la morfología espermática en los dos machos estudiados, y obtenemos un claro patrón estacional, con valores mínimos en primavera y verano, y máximos en otoño, siendo la estación de invierno un periodo de transición. Estos resultados fueron similares a los recogidos por Ahmed y col. (1997) en Saanen y Karagiannidis y col. (2000) en Alpina, Saanen y Damasco, y que difieren de los aportados por Skalet y col., (1988) en Nubiana, Pérez y col. (1991) en Verata, Roca y col. (1992a) en Murciano-Granadina y Pérez y Mateos (1996) en Verata y Malagueña, que apreciaron un mayor número de morfoanomalías entre los meses de enero y abril. Quizás estas diferencias puedan ser consecuencia de la edad, efectos raciales, ambientales y geográficos.

Las variaciones estacionales, del esperma de pequeños rumiantes, están asociadas, entre otras, a cambios en la duración de los días (horas de luz) y/o variaciones de temperatura ambiental (Corteel, 1981; Colas y col., 1986); sin embargo, las variaciones estacionales causadas por el fotoperiodo serán más o menos intensas, en base a la localización geográfica; de manera que entre los 30°-40° dichas variaciones no son muy marcadas (Skalet y col., 1988; Roca y col., 1992b; Karagiannidis y col., 2000). Las altas temperaturas han sido consideradas como un importante factor limitante de la calidad seminal de los rumiantes. Además, en aquellas zonas geográficas donde las

temperaturas son elevadas se aprecia una mayor proporción de morfoanomalías (Colas, 1980; Corteel, 1981). En nuestra experiencia, observamos un incremento en la proporción de espermatozoides morfológicamente anormales, durante la estación de verano, creemos que como consecuencia del estrés por calor (Chemineau y col., 1991) al que estuvieron sometidos los sementales durante los meses de julio a septiembre de 2001. Al igual que Ritar y Salamon (1991) en la raza Angora, observamos un claro descenso en la libido de los machos, que llegó hasta el punto de no poderse obtener esperma mediante vagina artificial.

Según Colas (1980) y Colas y col. (1986) en morueco, así como Pérez y Mateos (1996) en machos cabríos Veratos y Malagueños, las variaciones estacionales de la calidad espermática son atribuibles entre otros al fotoperiodo, de modo que los mayores porcentajes de morfoanomalías se obtienen durante el fotoperiodo ascendente, hecho que coincide con lo observado en nuestro estudio; si bien, los factores ambientales no influyeron de manera significativa sobre nuestros resultados, absorbiendo el 1.44% respecto al fotoperiodo y el 3.24% respecto a la temperatura ambiental de la variabilidad total de la proporción de espermatozoides morfológicamente normales. En un estudio previo realizado en machos Florida, observamos variaciones estacionales significativas de la circunferencia escrotal, registrándose un aumento de la misma durante el invierno y la primavera (Dorado y col., 2002a y b). Por todo esto consideramos que el aumento de la calidad espermática observado durante el fotoperiodo ascendente es reflejo no sólo del incremento de las horas de luz sino también del aumento de la circunferencia escrotal. Además la asociación entre la calidad espermática y el tamaño testicular ya ha sido documentada en pequeños rumiantes (Lincoln, 1989).

Los valores medios anuales, de espermatozoides con acrosoma íntegro, registrados durante todo el periodo de estudio, fueron superiores a los observados por Ahmed y col. (1997) y similares a los aportados por Chauhan y col. (1994). Este parámetro no mostró variaciones individuales y sí un claro patrón estacional, aumentando las células con acrosoma activado en verano y disminuyendo en otoño, coincidiendo esto con lo descrito por Skalet y col. (1988) en Nubiana, Roca y col.

(1991a) en Murciano-Granadina y Ahmed y col. (1997) en Saanen; diferencias que podrían estar causadas por variaciones en la composición del plasma seminal, como podría ser un aumento de la proporción de fosfolipasa A de las glándulas bulbouretrales (Iritani y col., 1964; Ritar y Salamon, 1982 y 1991); o por efecto de la edad como se ha visto en otras especies (Osinowo y col., 1988; Lotze, 1989).

Por otra parte, los factores climáticos (fotoperiodo y temperatura ambiental) también influyeron significativamente sobre la evolución de la integridad de acrosoma a lo largo del estudio, apreciándose un aumento significativo durante el fotoperiodo ascendente, para disminuir cuando los días eran cortos y la temperatura elevada. Nuestros resultados coinciden con los aportados por Pérez y Mateos (1996) en Verata y Malagueña, aunque quizás el escaso número de eyaculados recogidos en agosto de 2001, pudiera haber influido en el aumento registrado en esa fecha.

Al igual que observaron Cabrera y col. (1998a), la producción espermática depende más del volumen eyaculado, que de la concentración, absorbiendo el 64% y 37.2% de su variabilidad total. A su vez, la concentración únicamente se vio afectada por el fotoperiodo, que absorbió el 43.30% de su variabilidad total.

La duración de los días (fotoperiodo), es el factor ambiental más importante en la determinación de la estación reproductiva, en pequeños rumiantes de latitudes templadas (Folch, 1984; Thimonier y col., 1986). En contraposición a lo descrito por Cabrera y col. (1998b), de los factores ambientales estudiados, el fotoperiodo fue el factor más influyente seguido de la temperatura ambiental, la cual tuvo un papel secundario o restringido a determinadas características seminales y del comportamiento reproductivo (Lindsay, 1969; Colas, 1980; Vijil y col., 1986).

Las variaciones estacionales del comportamiento sexual, tamaño testicular y producción espermática (Pelletier y col., 1988; Branca y Cappai, 1989) causados por el fotoperiodo son más o menos marcados dependiendo de la latitud en la que nos encontremos, junto a la temperatura ambiental. De este modo, la capacidad reproductiva

del ganado caprino localizado en latitudes entre los 30°-40° sufrirá variaciones estacionales moderadas (Skalet y col., 1988; Roca y col., 1992b; Karagiannidis y col., 2000).

En cuanto al movimiento espermático, el factor macho influyó de manera significativa, absorbiendo el 29.81% y el 8.07% de la variabilidad total del movimiento total (MT) y movimiento rápido progresivo (MRP), respectivamente. Además observamos la existencia de correlación entre el MT y MRP, como ya apreciaron Karagiannidis y col. (2000). En este sentido, el porcentaje de espermatozoides móviles depende de la morfología espermática, de modo que esta absorbe el 28.73% y el 8.41% de la variabilidad total del MT y MRP, respectivamente.

La morfología espermática mostró correlación significativa con el factor macho, absorbiendo éste el 61.94% de su variabilidad total, y con la integridad de acrosoma ( $r^2 = 0.06$ ).

Los resultados obtenidos demuestran que el macho cabrío de raza Florida mantuvo, a lo largo de todo el periodo de estudio, unas características espermáticas compatibles con una actividad reproductiva normal; si bien, la producción espermática y la libido disminuyeron significativamente durante los meses de verano y otoño, pero sin llegar a comprometer en ningún momento la viabilidad de los eyaculados. Este hecho ya ha sido demostrado en otras razas autóctonas de la Península Ibérica, siempre que los machos se mantengan con una actividad sexual adecuada (Roca y col., 1992b en Murciano-Granadina; Pérez y Mateos, 1996 en Verata y Malagueña), así como en otras razas no sometidas a grandes variaciones estacionales (Chemineau, 1986 en Criollas; Cabrera y col., 1998a y b).

### **6.3 Congelabilidad del esperma**

Aunque sólo hemos trabajado con dos donantes de esperma, nuestros resultados indican que puede existir una cierta variabilidad individual en la producción de

eyaculados aptos para congelar (apartado 3.1, Pág. 80) y en la capacidad de congelación-descongelación (congelabilidad) (apartado 4.2.1, Pág. 110), ya que se observan diferencias entre machos en el porcentaje de eyaculados recogidos, que cumplen los requisitos exigidos en este estudio para ser congelados (71.43% vs 84.48%), así como, en la respuesta observada en el control del movimiento a la descongelación (42.31% vs 57.69%).

Con el fin de estimar la viabilidad espermática de un eyaculado, se valora el movimiento espermático inicial y a la descongelación (Saacke y White, 1972); sin embargo, para Garde (1993) los parámetros seminales que ofrecen una mayor información y más fiabilidad acerca del poder fecundante del espermatozoide congelado-descongelado son el test de endosmósis celular y la longevidad del movimiento espermático, éste último tras un periodo de incubación de una hora a +39°C.

Gracia y col. (1998) en machos cabríos de la Agrupación Caprina Canaria no observaron variaciones individuales en el movimiento espermático tras el proceso de congelación-descongelación. Por el contrario, al igual que Tuli y Holtz (1995) en machos cabríos Boer, en nuestra experiencia si se observaron diferencias estadísticamente significativas entre individuos, tanto para el movimiento total como en el rápido progresivo, aunque para estos autores no fueron significativas. Por otra parte, apreciamos un importante descenso del movimiento rápido progresivo tras el periodo de incubación, alrededor del 40% respecto a su valor inicial, que puede deberse, entre otros, a factores influyentes, por un lado, al propio proceso de congelación-descongelación, que provoca un daño irreparable sobre la estructura y la funcionalidad del espermatozoide (Parks y Graham, 1992; Watson, 2000) y que ha sido demostrado también en el toro (Ollero y col., 1998), y, por otro, al periodo y temperatura de incubación utilizados en este estudio (Fiser y col., 1991; Valcárcel y col., 1994; Bag y col., 2002a y b en morueco). Se sabe que el grado de congelabilidad del espermatozoide depende, entre otros, de la especie animal (Sanz y col.; 1999), raza (Cochran y col., 1985) e individuo (Garde, 1993) debido a las diferencias que existen en las

características de los lípidos integrantes de las membranas celulares de los espermatozoides.

Durante las fases de dilución y equilibrado del esperma, se registra una ligera pérdida en el movimiento, pero hasta el proceso de refrigeración y congelación-descongelación, esta pérdida no se hace significativa (Chauhan y Anand, 1990; Chauhan y col., 1994; Watson, 2000), y parece que varía significativamente según el diluyente empleado, como observan Dunner (1991a) y Dunner y Vázquez (1991) en la raza Murciano-Granadina. De igual modo, Chauhan y Anand (1990) en machos cabríos Jamunapari, Pintado y col. (1991) en Veratos y Pérez y Mateos (1995) en machos de raza indeterminada, obtienen porcentajes de movimiento espermático a la descongelación superiores cuando utilizan el Tris en vez del diluyente lácteo o citrato, entre otros. En nuestro estudio el Tris mostró resultados ligeramente superiores a los registrados por el diluyente lácteo, no obstante las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas.

Pérez y Mateos (1995) concluyen, que el movimiento obtenido a la descongelación, disminuye drásticamente cuando emplean el diluyente lácteo, hecho que podría ser debido a la precipitación de las proteínas de la leche mantenidas a +37°C, aunque podría deberse también a las interacciones entre la leche y restos del plasma seminal, que al reaccionar con las proteínas lácteas (Nunes, 1982; Pellicer y Conbarnous, 1994) o con la lecitina de la yema de huevo (Roy, 1957; Corteel, 1980), dan lugar a productos tóxicos para el espermatozoide. Además, los mejores resultados obtenidos por el diluyente Tris podrían en parte atribuirse a los efectos beneficiosos que ejercerían el resto de los componentes del mismo como el glicerol (Roy y Bishop, 1954; Masuda y Nishikawa, 1972) y el Sodio dodecil-sulfato (Hellemann y Jara, 1997).

Nuestros resultados indican que la reducción del movimiento espermático a la descongelación, fue menor para el diluyente Tris, al igual que describen Chauhan y Anand (1990) y Pintado y col. (1991), comparándolo con otros diluyentes, aunque las pérdidas registradas por estos autores fueron mayores (50%). Estas diferencias nos

hacen considerar que además de la composición del diluyente empleado, pueden influir su capacidad tamponadora (Pintado y col., 1991) y grado de protección de sus componentes básicos (tipo y cantidad de crioprotectores) del flagelo y resto de estructuras celulares, así como a la capacidad de preservar el metabolismo energético tras el proceso de congelación-descongelación.

Memon y col., (1985) y Deka y Rao (1987) tras diversos estudios comparativos entre varios diluyentes de esperma caprino, concluyen que el Tris-yema de huevo-glicerol, mantiene una mayor proporción de espermatozoides móviles y con acrosoma íntegro a la descongelación. Esto mismo se ha puesto de manifiesto en el cerdo, toro y morueco (Crabo y col., 1972; Grahan y col., 1972; Aguado y col., 1998). En nuestra experiencia, al igual que ocurre en el movimiento total, no apreciamos diferencias estadísticamente significativas en el movimiento rápido progresivo a la descongelación, según el diluyente empleado, si bien es verdad que el Tris mostró resultados ligeramente superiores a los reflejados por el diluyente lácteo, quizás por el efecto crioprotector adicional debido al tensido (Equex-STM<sup>®</sup>) añadido al mismo y que según Hellemann y Jara (1997) ejerce sobre el flagelo, un efecto protector impidiendo el shock osmótico; asimismo, aunque las diferencias no fueron significativas, la mejor respuesta al Tris en uno de los machos, pudiera significar una cierta predisposición individual por uno de los diluyentes empleados, como se conoce que existe en otras especies (Sanz y col., 1999). Sin embargo, sí observamos que el diluyente influyo en el porcentaje de acrosomas íntegros, siendo éste mayor en las dosis en las que se empleó el lácteo.

La estación es un importante factor de variación en la producción y calidad del esperma caprino (Ritar, 1993). Al igual que otros autores (Loubser y Van Niekerk, 1983; Gracia y col., 1998), no observamos diferencias significativas en el grado de congelabilidad del esperma de macho cabrío Florida según la estación en la que se recolectó y procesó; sin embargo, existen otros trabajos que si demuestran este efecto (Corteel, 1981; Nunes y col., 1982; Delgadillo y col., 1992; Tuli y Holtz, 1995), creemos puede estar condicionado por las diferencias raciales y más concretamente de las fluctuaciones existentes entre razas. Por otra parte, consideramos que la pérdida de

movimiento espermático observada en verano, en la que coinciden Corteel (1981), Nunes y col. (1982) y Tuli y Holtz (1995), pudiera deberse a cambios en la composición del plasma seminal, así como al incremento del número de espermatozoides anormales que se observó durante dicho periodo.

Sin embargo, observamos que la estación en la que recolectamos el esperma, tuvo efecto significativo sobre el movimiento total a la descongelación (MTD) registrado por cada macho, de manera que en verano el macho 1 dió valores mínimos, mientras que en el 2 éstos fueron máximos. Estos resultados pudieran deberse al efecto que la temperatura ambiental tiene sobre la libido (Delgadillo y col., 1991; Ritar y Salamon, 1991; Roca y col., 1991b), de manera que el macho 2 fue prácticamente constante a lo largo del estudio, mientras que el 1 registró pérdidas importantes de interés por la hembra durante los meses más calurosos. Dutt (1960) y Lindsay (1969) trabajando en ovino, demostraron que la exposición continuada a temperaturas elevadas provoca un importante descenso en la libido, y por tanto, en la calidad espermática.

Por otro lado, tampoco observamos variaciones estacionales en el MTD registrado por cada diluyente, mostrando ambos una distribución casi constante a lo largo del estudio. Al igual que Tuli y Holtz (1995) en machos cabríos Boer, observamos un efecto significativo del mes y estación de recogida sobre el movimiento rápido progresivo a la descongelación (MRPD), con valores máximos en verano y mínimos en otoño. Sin embargo, varios son los autores que observan un drástico descenso de este parámetro fuera de la estación reproductiva (Corteel y col., 1988 en machos de las razas Alpina y Saanen; Ritar y Salamon, 1991 en Angora; Pintado y col., 1992 en Verata; Tuli y Holtz, 1992 en Boer; Roca y col., 1997 en Murciano-Granadina). Esta variabilidad de resultados pudiera deberse a las diferencias raciales, ambientales y geográficas, y más concretamente a la variabilidad existente entre los parámetros espermáticos a lo largo del año.

Tras valorar de forma individual el efecto de la estación en la que se recolectó y procesó el esperma, sobre el MRPD registrado por cada macho, no observamos

variaciones individuales en el macho 1, el cual mantuvo valores similares a lo largo del estudio. Sin embargo, en el 2 si se observaron variaciones estacionales, apreciándose un incremento en verano, quizás debido, entre otros factores, a la propia variabilidad existente entre individuos, ya que el factor individuo absorbe el 7.28% de la variabilidad total del MRPD. Resultados similares se obtuvieron al valorar el efecto de la estación sobre el MRPD registrado por cada diluyente, de manera que el Tris no mostró diferencias significativas, mientras que el diluyente lácteo registró valores mínimos en otoño y máximos en verano. Estas variaciones estacionales mostradas con el diluyente lácteo pudieran deberse a pequeñas variaciones en la composición del plasma seminal y la interacción de restos del mismo con las proteínas del diluyente lácteo (Nunes, 1982; Pellicer y Combarous, 1994).

El fotoperiodo no influyó significativamente sobre los parámetros cinéticos (MTD y MRPD) registrados durante el estudio, apreciándose valores casi constantes a lo largo de dicho periodo, aunque fueron ligeramente superiores durante el ascendente e inferiores en el descendente. Sin embargo, la temperatura ambiental si influyó de manera significativa, registrándose un incremento del movimiento total y rápido progresivo durante los meses más calurosos, si bien la temperatura ambiental únicamente absorbe el 0.36% y el 3.61% de la variabilidad total del MTD y el MRPD, respectivamente.

Varios trabajos recogen que el proceso de congelación-descongelación provoca entre otros, daños en el acrosoma y la membrana plasmática del espermatozoide (Salamon y Maxwell, 1995a y b; Watson, 1995 y 2000; Maxwell y Watson, 1996; Valcárcel y col., 1996; Ollero y col., 1998), de ahí que la valoración de la integridad del acrosoma, junto al resto de membranas celulares, constituye una prueba laboratorial muy importante a la hora de predecir la fertilidad potencial del espermatozoide (Benoff y col., 1993; Bielsa y col., 1994). Además, bien es conocida la correlación existente entre el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro y la fertilidad (Saacke y White, 1972; Saacke y col., 1980; Juneja y col., 1989), debido a que el acrosoma intacto

contiene las enzimas proteolíticas necesarias para la fertilización del oocito (Crozet y col., 1987; First y Parrish, 1987).

Otros autores, en especies como el morueco, macho cabrío, cerdo y toro han demostrado que se produce un drástico descenso del porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro tras el proceso de congelación-descongelación (Pascual y col., 1993; Chauhan y col., 1994; Singh y col., 1995; García y col., 1996; Ollero y col., 1996). Asimismo, Bag y col. (2002a y b) trabajando con moruecos, concluyen que la temperatura de congelación tiene un efecto significativo sobre la integridad del acrosoma. Por otra parte, también se ha demostrado que dicha integridad no se ve afectada por el proceso de centrifugación realizado durante la separación del plasma seminal (Chauhan y Anand, 1990, Coelho y col., 1995; Pereira y col., 2000), así como la dilución, refrigeración, glicerolización y equilibrado.

En nuestra experiencia también apreciamos incremento en el porcentaje de acrosomas activados, tras el proceso de congelación-descongelación, similar al registrado por Chauhan y col. (1994) (38-43%); sin embargo, es inferior a los referidos en estudios recientes (Valcárcel y col. 1994; Salamon y Maxwell 1995b en moruecos (70%-90%); Azerêdo y col., 2001 en machos cabríos Saanen (83%), si bien estas diferencias podrían deberse, entre otros factores, además de por el método de tinción empleado, por la influencia que tienen sobre este parámetro la temperatura de congelación (Bag y col., 2002a y b), periodos de incubación prolongados (Saacke y White, 1972; Pérez y Mateos, 1995; Glogowski y col., 1998; López y col., 1999; Pereira y col., 2000; Bag y col., 2002a y b), temperatura de incubación (Glogowski y col., 1998; López y col., 1999) y método de descongelación (Hube y Uribe, 1980 en toro; Söderquist y col., 1997 en morueco).

De forma opuesta a lo registrado por López y col. (1999) en morueco, en nuestra experiencia no observamos variaciones individuales en la proporción de espermatozoides con acrosoma íntegro a la descongelación, aunque el macho 2 registró valores ligeramente superiores a los registrados por el 1, si bien estas diferencias

podrían deberse al reducido número de animales estudiados y al efecto de la raza, ambiente y localización geográfica de los machos (Roca y col., 1992b).

Al igual que otros autores (Memon y col., 1985; Deka y Rao, 1987; Chauhan y Anand, 1990; Tuli y Holtz, 1992; Aisen y col., 1995) obtuvimos una influencia significativa del diluyente sobre los valores medios de integridad de acrosoma a la descongelación, apreciándose un menor daño acrosomal en el espermatozoides congelado-descongelado con diluyente lácteo. Nuestros resultados coinciden con los registrados por Singh y col. (1996) en caprino, que mediante determinación enzimática demuestran que aquellos diluyentes que contienen lactosa sola o en combinación con glicerol como crioprotectores, proporcionan una mayor protección durante el proceso de congelación-descongelación con el consiguiente incremento del porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y con acrosoma íntegro frente al resto de diluyentes. Otros estudios han aportado conclusiones similares en otras especies como el toro (Buruiana y col.; 1980), búfalo (Singh y col., 1992) y morueco (Nehring, 1988). Para Fiser y col. (1987) y Aisen y col. (1990 y 1995) la lactosa al ser un azúcar no permeable para la membrana espermática, posee actividad deshidratante lo que implica una disminución del agua intracelular que contribuirá a una mejor preservación a través de una menor formación de cristales de hielo en el interior de la célula.

Según Roca y col. (1992b) trabajando con machos cabríos Murciano-Granadinos, la integridad de acrosoma a la descongelación al igual que la mayoría de los parámetros espermáticos, sigue un patrón estacional pero distinto al presentado por la morfología espermática, con máximos en invierno y primavera. Sin embargo, en nuestra experiencia no observamos influencia significativa de la estación sobre la proporción de espermatozoides con acrosoma íntegro, si bien apreciamos un ligero descenso en verano. De igual modo, tampoco observamos un efecto significativo de la estación en la que se recolectó y procesó el espermatozoides sobre la proporción de espermatozoides íntegros a la descongelación para cada individuo y diluyente.

El fotoperiodo al igual que con el resto de parámetros espermáticos a la descongelación, no mostró influencia significativa sobre la integridad de acrosoma registrada tras el proceso de congelación-descongelación; sin embargo, la temperatura ambiental si influyó significativamente sobre el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro, y al igual que en el esperma precongelado se aprecia un importante descenso en la proporción de espermatozoides íntegros durante los meses más calurosos (junio y julio), fenómeno que puede estar relacionado con la insuficiente capacidad del mecanismo de termorregulación testicular, así como al estrés por calor (Chemineau y col., 1991) al que fueron sometidos los sementales.

Tras calcular el coeficiente de correlación entre los distintos parámetros espermáticos a la descongelación, observamos que el movimiento total muestra una correlación significativa con el movimiento rápido progresivo a la descongelación, y un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 73.96%. Al igual que Fiser y Fairfull (1983) en moruecos, obtuvimos una correlación significativa entre la morfología espermática y el movimiento espermático a la descongelación, concluyendo que una mayor proporción de espermatozoides morfológicamente anormales provocaría un descenso importante en el movimiento espermático.

Al igual que Valcárcel y col. (1994) trabajando con moruecos, observamos una correlación significativa entre la integridad de acrosoma y el movimiento total a la descongelación, de manera que el daño de la membrana acrosomal implicase a su vez una alteración del movimiento espermático (Dunner y Vázquez, 1991).

Por otra parte, el análisis de la correlación entre los parámetros espermáticos y los distintos factores que influyen en la conservación de los mismos durante el proceso de congelación-descongelación, revela que el factor individuo es el más influyente, absorbiendo el 4.41% de la variabilidad total del movimiento total, 2.78% de la variabilidad total del movimiento rápido progresivo y el 57.76% de la variabilidad total de la morfología espermática a la descongelación. Estos resultados son similares a los

aportados por Aguado y col. (1998) en moruecos Manchegos, concluyendo que la diferencia a la susceptibilidad al choque frío viene dada por el individuo.

El factor mes, mostró correlación negativa y significativa con el movimiento total, proporción de espermatozoides morfológicamente normales e íntegros a la descongelación, absorbiendo respectivamente el 6.25%, 3.6% y 9% de la variabilidad total de estos parámetros espermáticos. Varios autores han observado que el porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado aumenta con la edad, pero no de manera significativa (Skalet y col., 1988 en Nubiana; Roca y col., 1991a en Murciana-Granadina). Esto también se ha puesto de manifiesto en otras especies (Osinowo y col., 1988 en morueco Yankasa; Lotze, 1989 en toro y cerdo).

El diluyente empleado mostró correlación significativa con la integridad de acrosoma, hecho que ya ha sido demostrado por otros autores (Memon y col., 1985; Deka y Rao, 1987; Chauhan y Anand, 1990; Tuli y Holtz, 1992), absorbiendo el 5.29% de su variabilidad total, fenómeno que puede estar relacionado con la diferente composición de los mismos.

La temperatura ambiental mostró correlación significativa con el movimiento rápido progresivo a la descongelación y correlación negativa y significativa con la integridad de acrosoma, absorbiendo respectivamente el 3.61% y el 4.84% de la variabilidad total de estos dos parámetros espermáticos.

#### **6.4 Capacidad fecundante del esperma congelado-descongelado**

Una de las principales limitaciones que se presenta en la espermatización manual (EM) del ganado caprino, es el uso de esperma congelado-descongelado, ya que el mismo proceso de congelación-descongelación propicia una reducción de la viabilidad espermática (Roca y col., 1997; Watson, 2000). Por otra parte, con las técnicas actuales existentes para la realización de la EM vía cervical en esta especie, una escasa

proporción de espermatozoides atravesará los pliegues cervicales, lo que acarrea un descenso importante de la fertilidad (Ritar, 1993).

En nuestra experiencia obtuvimos una fertilidad media del 47.62%, resultados que se encuentran englobados entre el 42.5-77.5% establecido por Corteel (1975a y b) tras emplear progestágenos durante la estación reproductiva y el rango de 22.4-69.4% para hembras sincronizadas fuera de la estación reproductiva (Corteel, 1976 y 1980; Chemineau y col., 1987; Baril y col., 1993 y 1996; Karatzas y col., 1997).

Nuestros resultados son superiores a los registrados por Ritar y col. (1990b) en la raza Cashmere (39.1%), Ritar y Ball (1993) en Cashmere (33.3%), Herrera y col. (1994) en Murciano-Granadina (26.6% mediante doble espermatización a tiempo fijo) y Aisen y Medina (2000) en Angora (37.3% a celo detectado y 23.8% a tiempo fijo) mediante espermatización manual (EM) cervical, y similares a los aportados por Singh y col. (1995) trabajando con machos cabríos Beetal y Bengal empleando la EM cervical. Sin embargo, son inferiores a los registrados por Chauhan y Anand (1990) realizando doble espermatización manual cervical en celo natural, así como inferiores a los aportados por Karatzas y col. (1997) en Alpina, Saanen y Damascus mediante EM cervical simple a las 50-55 horas después de la retirada de esponjas o doble a las 36-60 horas (53.4%). No obstante, este último autor obtuvo variaciones raciales en el índice de fertilidad, de manera que la raza Damascus mostró resultados prácticamente idénticos a los registrados en nuestra experiencia (47.4%). Nuestros resultados también fueron inferiores a los aportados por Romano y col. (2000) en la raza Nubiana, realizando una doble EM vía cervical a las 12-24 horas tras la detección del celo (58.7%).

En programas de mejora genética tanto con esperma fresco como diluyoconservado refrigerado o congelado-descongelado, resulta más cómodo espermatizar a tiempo fijo; sin embargo, la detección del celo y la doble espermatización a las 12 horas de la detección del mismo y a las 24 horas de la primera espermatización ayuda a mejorar los índices de fertilidad (Aisen y Medina, 2000). Otros autores han demostrado que la fertilidad obtenida en la espermatización manual del

ganado caprino depende, además de la calidad del esperma utilizado (Karatzas y col., 1997), del método de conservación (Artiga y col., 1993), lugar de depósito (Fougner, 1976; Artiga y col., 1993), número de espermatizaciones (Artiga y col., 1993; Karatzas y col., 1997) y momento de la espermatización con respecto a la ovulación (Salisbury y col., 1978; Ozsar y col., 1988; Rao y Bhattacharyya, 1988; Artiga y col., 1993), número de espermatozoides por dosis (Artiga y col., 1993), entre otros factores.

Otros trabajos concluyen que factores como la raza (Karatzas y col., 1997), estación (Karatzas y col., 1997), climatología, técnica de espermatización (Corteel, 1975a y 1977) y manejo entre otros, afectan al índice de fertilidad (Salisbury y col., 1978), pero sin ningún género de duda el factor más influyente son las propias instalaciones de la ganadería (Alabart y col., 2002). Por otro lado, no debemos de olvidar que existen una serie de factores dependientes de la hembra, que influyen igualmente sobre la fertilidad obtenida mediante espermatización manual cervical, como pueden ser la edad (Artiga y col., 1993; Fantova y col., 1998; Alabart y col., 2002), número de partos, intervalo último parto-espermatización (Fantova y col., 1998), respuesta al tratamiento hormonal (Baril y col., 1993 y 1996) sobre todo cuando se realiza la EM a tiempo fijo, número de tratamientos recibidos (Baril y col., 1992), hormonas empleadas (Espinosa, 1996), entre otros. En este sentido, Baril y col. (1996) obtuvimos una fertilidad media del 61.1% en las razas Alpina y Saanen, si bien ésta disminuía de forma considerable (43.5%) cuando la salida a celo se producía a partir de las 30 horas de la retirada de esponjas y que a su vez dependía no de la edad de las hembras sino del número de tratamientos recibidos previamente.

En nuestra experiencia, el intervalo entre la retirada de esponjas y la salida a celo influye, aunque no significativamente ( $p > 0.05$ ), sobre la fertilidad del esperma congelado, de tal modo, que observamos un 57.14% de gestaciones entre la cabras que se detectaron en celo antes del control de las 36 horas, frente al 45.16% obtenido en las que lo hicieron a partir de dicho control. Resultados similares obtienen Baril y col., (1993) realizando una sola EM a las 43-45 horas, observando una fertilidad muy reducida (33%) en las que salen a celo pasadas 30 horas de la retirada de esponjas.

Por otra parte, la doble espermatización manual se acepta como una técnica reproductiva que aumenta el índice de fertilidad (Corteel, 1975a y 1977; Karatzas y col., 1997); sin embargo, Ritar (1993) concluye que la doble EM no mejora la fertilidad cuando el número total de espermatozoides depositados por EM simple es mayor al administrado por EM doble. Además, Corteel y col. (1988) y Ritar y Ball (1993) apreciaron un descenso de la fertilidad tras la doble espermatización, sugiriendo que estos resultados se debían al estrés adicional al que sometieron a las hembras durante el manejo.

En nuestra experiencia no obtuvimos variaciones individuales en el índice de fertilidad, hecho que coincide también con lo descrito por Delgadillo y col. (1992) en Saanen y en contraposición a lo descrito por Roca y col. (1997) en Murciano-Granadinos; si bien el macho 1 mostró valores ligeramente superiores a los registrados por el 2, quizás debido al escaso número de hembras espermatizadas, así como a la exhaustiva selección de los eyaculados. Asimismo, sabemos que la fertilidad del esperma es una característica extremadamente compleja, que puede verse afectada por múltiples factores y que las diferencias observadas entre parámetros espermáticos a la precongelación en ambos machos han sido determinantes en el índice de fertilidad obtenido.

Al igual que Singh y col. (1995), no obtuvimos diferencias significativas en la fertilidad media obtenida por ambos diluyentes, aunque el diluyente lácteo mostró mejores resultados de fertilidad, quizás debido a que ejerce una mayor protección de la membrana acrosómica, estructura indispensable en el momento de la fecundación (Moraes y col., 1998). Aguado y col. (1998) con esperma refrigerado y Fantova y col. (1998) con esperma congelado-descongelado en morueco, obtuvieron resultados similares, apreciando también una mayor fertilidad del diluyente lácteo frente al Tris. Si bien cabría esperar que el diluyente Tris proporcionara mejores resultados durante el proceso de congelación-descongelación, debido por un lado a que la fructosa, junto a la glucosa, tiene un efecto protector de la membrana más específico que la lactosa presente en el diluyente lácteo (Aisen y col., 1990 y 1995; Foote y col., 1993) y por otro al efecto

crioprotector que el tensido adicionado al Tris (Equex STM<sup>®</sup>) tiene principalmente sobre el movimiento espermático y en menor proporción sobre la integridad acrosómica (Hellemann y Jara, 1997). No obstante, no es suficiente para asegurar el poder fertilizante de una muestra de esperma, mejorar el movimiento espermático y la integridad del acrosoma (Maxwell y Stojanov, 1996), ya que como se ha demostrado en morueco (Garde, 1993) tras evaluar la integridad de la membrana plasmática mediante el Test de endósmosis, con las técnicas de valoración del acrosoma mediante contraste de fases podemos encontrar espermatozoides muertos que presenten el acrosoma intacto y que no van a ser fértiles.

La tasa de fecundidad y prolificidad media obtenidas en nuestra experiencia fueron de 38.10% y 2 respectivamente, y que son ligeramente superiores a las aportadas por Ritar y col. (1990) en la raza Cashmere mediante espermatización manual vía cervical con esperma congelado-descongelado (34% respecto a fecundidad y 1.17 respecto a prolificidad), Herrera y col. (1994) en Murciano-Granadina realizando doble EM cervical con esperma congelado-descongelado a las 30-48 horas tras la retirada de esponjas (26.6% respecto a fecundidad y 1.75 respecto al índice de prolificidad) y Burguete y col. (1998) en Murciano-Granadina mediante EM vía cervical con esperma refrigerado (1.64 de prolificidad), registrándose además, un 37.5% de partos simples, 31.25% dobles y 31.25% triples, y que difieren de los aportados por Burguete y col. (1998), los cuales observaron un alto porcentaje de presentación de partos simples y dobles, así como una baja incidencia de los partos triples (51.05%, 42.51% y 6.48%, respectivamente)

## **7 CONCLUSIONES**

De los resultados obtenidos en el estudio de la respuesta a la congelación-descongelación del esperma caprino, y que han sido expuestos en el presente documento, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La estación del año influye significativamente sobre la concentración y los porcentajes de espermatozoides morfológicamente normales y con acrosoma íntegro, observándose los mayores valores de concentración e integridad en primavera e invierno y de morfología en otoño e invierno; sin embargo, la estación en la que se recoge y congela el esperma no influyó sobre el movimiento y porcentaje de acrosoma íntegro a la descongelación.
2. Los factores ambientales, fotoperiodo y temperatura media, mostraron correlación significativa con varios de los parámetros seminales estudiados, el primero con la concentración espermática e integridad de acrosoma, mientras que la temperatura media manifestó correlación negativa y significativa con la integridad de acrosoma.
3. El diluyente empleado únicamente influyó sobre la integridad del acrosoma, absorbiendo el 5.3% de su variabilidad total, lo cual puede estar relacionado con el mejor efecto crioprotector proporcionado por la combinación de la lactosa y el glicerol.
4. Los factores individuo y diluyente no influyeron de forma significativa sobre el índice de fertilidad, obtenido tras la espermatización manual (EM); si bien podemos mantener que hay tendencia a que existan variaciones individuales y entre diluyentes, esta última, a favor del lácteo, que pudieron ser enmascaradas por el pequeño tamaño de la muestra y por la exhaustiva selección de los eyaculados.

## **8 RESUMEN**

La congelación del esperma, permite preservar por tiempo indefinido su viabilidad y capacidad fecundante; facilitando, entre otros, el control sanitario, optimización en el uso de sementales de alto valor genético, aceleración de programas de selección y mejora de razas y conservación de recursos zoogenéticos. Sin embargo, el proceso de congelación-descongelación altera el movimiento y la velocidad del espermatozoide, así como, provoca una desestabilización de su membrana plasmática y activa la reacción acrosómica, disminuyendo así su capacidad fecundante.

Con el fin de conocer, la respuesta a la congelación-descongelación del macho cabrío de la raza Florida, planteamos un estudio para valorar la influencia del mes, estación del año y temperatura ambiental, utilizando dos diluyentes de diferente composición (tris y diluyente lácteo), siguiendo el mismo protocolo de refrigeración y congelación del esperma en los dos machos durante un año. Asimismo, se realizó una prueba *in vivo* de la capacidad fertilizante, mediante la espermatización manual (EM) de un lote de 42 cabras, sincronizadas con esponjas vaginales.

Los resultados obtenidos revelan que el macho cabrío de la raza Florida, muestra variaciones individuales en los parámetros espermáticos analizados, así como, una ligera estacionalidad de los mismos, pero sin llegar a comprometer la viabilidad de los eyaculados durante los 14 meses en estudio.

El proceso de congelación-descongelación, afectó fundamentalmente a los parámetros de movimiento e integridad de acrosoma, apreciándose además variaciones entre individuos. Por otro lado, el diluyente influyó sobre el grado de protección del acrosoma durante el proceso de congelación-descongelación.

Se determinó la gestación, mediante exploración ecográfica interna el día 25 post-espermatización, con un índice de fertilidad total del 47.62%, apreciándose una ligera tendencia a existir variaciones individuales, así como, resultados ligeramente superiores para el diluyente lácteo.

## **9 SUMMARY**

Cryopreservation maintains semen viability and fertility by indefinite time, and is a basic need for control sanitary, maintain a buck of high genetic value, selection schema and genetic improvement and preserves endangered species. Although, cryopreservation disturbs spermatozoa motility and velocity, as well as injury plasmatic membranes and acrosome reaction are induced, and finally pregnancy rates decreases.

The aim of this work was to determine the effect of cryopreservation on Florida buck semen. Moreover, studies have been carried out to assess the effect of month, season and ambient temperature, using two different diluents (tris and milk extenders), under equal cooling and freezing protocol, in two bucks for a year. Also, the oestrus were induced and synchronized with vaginal sponges, and 42 goats were inseminated using frozen-thawed semen.

The results indicate that Florida buck show individual and seasonal variation in semen parameters, but not to compromise the sperm quality.

The cryopreservation affects motility and acrosomal integrity with individual variation. The influence of diluents was significant on the degree acrosome damage during freeze thawing.

Pregnancy diagnosis was determinate by internal ultrasonography at day 25 after insemination. The fertility rate was 47.62% with individual variation, as well as milk extender showed light high results.

## **10 BIBLIOGRAFÍA**

- AAMDAL J., AMDERSEN K., 1968: Freezing of ram semen in straws. Proc. 6<sup>th</sup> Int. Congr. On Anim. Reprod. And AI, 2, pp: 977-981.
- AGUADO M.J., GARCIA-CERVIGON M., MANSO A., PEREZ-GUZMAN M.D., GARDE J., MONTORO V., 1998: Estudio preliminar del poder fecundante del semen de ovino Manchego mantenido durante 24 horas en refrigeración. Producción Ovina y Caprina, n° XXIII, SEOC, pp: 521-524.
- AHMAD K., 1987: Antibiotics for bull semen: effects of new antibiotics on post-thaw survival and fertility of frozen bull spermatozoa. Dissertation Abstracts International, 47, pp: 2689.
- AHMAD N., NOAKES D.E., 1996: Seasonal variations in the semen quality of young British goats. Br. Vet. J., 152 (2), pp: 225-236.
- AHMED M.M.M., MAKAWI S.A., GADIR A.A., 1997: Reproductive performance of Saanen bucks under tropical climate. Small Ruminant Research, 26, Issues 1-2, pp: 151-155.
- AISEN E.G., ALVAREZ H.L., VENTURINO A., GARDE J.J., 2000: Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. Theriogenology, 53, pp: 1053-1061.
- AISEN E.G., ALVAREZ H.L., VENTURINO A., LARREGUY D., GARDE J.J., VAZQUEZ I., 1995: Efecto comparativo de diluyos conservadores de diferente composición y tonicidad sobre la criopreservación del semen ovino. Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim., vol. 10 (3), pp: 223-231.
- AISEN E.G., CISALE H., FERNÁNDEZ H., 1990: Criopreservación de semen ovino. Nueva técnica. Vet. Arg., VII(63), pp: 176-182.
- AISEN E.G., MEDINA V., 2000: Inseminación artificial de cabras Angora de la Patagonia con semen congelado. Producción Ovina y Caprina, n° XXV, SEOC, pp: 591-594.
- AITKEN R.J., 1990: Evaluation of human sperm function. British Med. Bull., 46(3), pp: 654-674.
- ALABART J.L., FOLCH J., CIUDAD M.A., FANTOVA E., SEVILLA E., QUINTIN F.J., EQUIPO VETERINARIO DE CARNES OVIARAGON S.C.L., 2002: Efecto de la edad en la oveja Rasa Aragonesa sobre la fertilidad en la Inseminación Artificial (IA) dentro del esquema de mejora de la UPRA-OVIARAGON S.C.L.. XXVII Jornadas Científicas y VI Jornadas Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, pp: 965-972.
- ALTHOUSE G.C., HOPKINS S.M., 1995: Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores. Theriogenology, 43, pp: 595-603.
- AMIR D., GACITUA H., RON M., LEHRER A.R., 1986: Seasonal variation in semen characteristics and fertility of Finn cross rams subjected to frequent ejaculation. Anim. Reprod. Sci., 10, pp: 75-84.
- ANCHORDOGUY T.J., RUDOLPH A.S., CARPENTER J.F., CROWE J.H., 1987: Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. Cryobiology, 24, pp: 324-331.
- ANEL E., 1999: Automatización en la contrastación espermática. II Congreso Ibérico de Reproducción animal, pp: 292-296.
- ANEL E., ANEL L., BOIXO J.C., CARBAJO M., DOMÍNGUEZ J.C., CHAMORRO C., OLMEDO J.A., CELORRIO I., 1996: Automated evaluation of frozen-thawed ram semen. 13<sup>th</sup> Int. Cong. Anim. Reprod., Sydney, 2, pp: 2-8.
- ANEL E., ALVAREZ M., KAABI M., PAZ J.C., ANEL L., 1998: Influencia de la adición de algunos antibióticos en las características del semen descongelado de morueco. Producción Ovina y Caprina, n° XXIII, SEOC, pp: 513-515.
- ARMITAGE W.J., 1986: Osmotic stress as a factor in the detrimental effect of glycerol on human platelets. Cryobiol., 23, pp: 116-125.

ARTIGA C.G., GARDE J., PEREZ FUENTES J., MARTINEZ E., VAZQUEZ I., 1994: Correlaciones entre los distintos parámetros utilizados a nivel de laboratorio para determinar la calidad del semen de morueco. 7ª Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, pp: 116.

ARTIGA C.G., VAZQUEZ I., MARTINEZ E., GARDE J., PEREZ J., 1993: Inseminación Artificial en Pequeños Ruminantes. Mundo Ganadero 6, pp: 40-44.

AZERÊDO G.A., ESPER C.R., RESENDE K.T., 2001: Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. Small Ruminant Research 41, pp: 257-263.

BAG S., JOSHI A., NAQVI S.M.K., RAWAT P.S., MITTAL J.P., 2002a: Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. Animal Reproduction Science 72, pp: 175-183.

BAG S., JOSHI A., RAWAT P.S., MITTAL J.P., 2002b: Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in a semi-arid tropical environment. Small Ruminant Research 43, pp: 23-29.

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, pp: 621-628.

BARIL G., REMY B., LEBOEUF B., BECKERS J.F., SAUMANDE J., 1996: Synchronization of estrus in goats: the relationship between eCG binding in plasma, time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. Theriogenology 45 (8), pp: 1553-1559.

BARIL G., REMY B., LEBOEUF B., VALLET J.C., BECKERS J.F., SAUMANDE J., 1992: Comparison of porcine FSH, caprine FSH and ovine FSH to induce repeated superovulation in goats. 8<sup>th</sup> Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, France, 1, pp: 126 (Abstract).

BARRIOS B., PEREZ-PEREZ R., FERNANDEZ I., GALLEGO M., PELEATO M., MUIÑO-BLANCO T., CEBRIAN-PEREZ J., 1998: Purificación de proteínas del plasma seminal ovino. Capacidad reversora del daño producido por frío sobre espermatozoides. Producción Ovina y Caprina, nº XXIII, SEOC, pp: 507-511.

BENOFF S., HURLEY I., COOPER G.W., MANDEL F.S., HERSHLAG A., SCHOLL G.M., ROSENFELD D.L., 1993: Fertilization potential in vitro is correlated with head-specific mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content. Hum Reprod., 8(12), pp: 2155-2166.

BIELSA M.A., ANDOLZ P., GRIS J.M., MARTINEZ P., EGOZCUE J., 1994: Which semen parameters have a predictive value for pregnancy in infertile couples?. Hum Reprod., 9(10), pp: 1887-1890.

BLANCH E.L., AMANN R.P., BOWEN R.A., 1988: Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: plasma membrane integrity and motion characteristics. Theriogenology, 21, pp: 233-241.

BLANCO O., VAZQUEZ J.M., ROCA J., MARTINEZ E., LUCAS X., GIL M.A., PARRILLA I., 1999: Fuentes de variación en el análisis de diferentes parámetros de la motilidad espermática en verracos utilizando el sistema Sperm Class Analyzr (SCA). II Congreso Ibérico de Reproducción Animal, pp: 329-331.

BOIXO J.C., 1994: Valoración laboratorial de la calidad seminal. Correlación con la fertilidad. 7ª Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, pp: 61-69.

BOIXO J.C., RUIZ-POVEDA M., RODRÍGUEZ M., GONZALO C., VIJIL E., 1987: Valoración espectrofotométrica de la concentración espermática del semen de verraco. III Jornadas Int. Reprod. Anim. INSEM. Artif., pp: 211-216..

- BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO (BOE N° 279/97 del 21/11/1997). RD 1682/1997, 7 de noviembre. Actualización del catálogo oficial de razas de ganado de España.
- BONGSO T.A., JAINUDEEN M.R., SITI A., 1982: Relationship of scrotal circumference to age, body weight and onset of spermatogenesis in goats. *Theriogenology* 18 (5), pp: 513-524.
- BRANCA A., CAPPAL P., 1989: Osservazioni sul controllo della riproduzione nelle specie caprina: esperienze effettuate in Sardegna. *Symp. Int. La Riproduzione nei piccoli ruminanti: basi fisiologiche e aspetti applicative*. pp: 115-129.
- BURGUETE I., QUILES A., RAMIREZ A., HEVIA M.L., VALLEJO M., 1998: Effect of buck, year and season of insemination on prolificacy of Murciano-Granadina goats. *Small Ruminant Research* 29, pp: 121-123.
- BURUIANA L.M., KHALIL M., SEICIU F., NICULESCU S., 1980: Effect of freeze preservation on acrosin and hyaluronidase activity of bull spermatozoa. *Anim. Breed Abstr.*, 50, pp: 3711.
- CABRERA F., GONZALEZ F., BATISTA M., FORGA J., CALERO P.O., GRACIA A., 1998a: Estudio sobre la producción seminal del macho de la Agrupación Caprina Canaria (variedad Majorera) a lo largo del año. *Archivo de Reproducción Animal*, pp: 6-11.
- CABRERA F., GONZALEZ F., BATISTA M., FORGA J., CALERO P.O., GRACIA A., 1998b: Influencia de la edad y los factores ambientales sobre la producción seminal del macho de la Agrupación Caprina Canaria (Variedad Majorera) a lo largo de todo el año. *Producción Ovina y Caprina*, n° XXIII, SEOC, pp: 525-528.
- CAMACHO M.E., RODERO E., DELGADO J.V., RODERO A., 1990: Aspectos sociales de la conservación de razas autóctonas ovinas y caprinas andaluzas. *XV Jornadas Científicas SEOC*, pp: 31-33.
- CAMPBELL J.W., HARVEY T.G., MC DONALD M.F., SPARKSMAN R.I., 1996: Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. *Theriogenology* 45 (8), pp: 1535-1544.
- CARRIZOSA J., GOMEZ A., LAFUENTE A., HABA E., LOPEZ A., FALAGAN A., 1997: Nota sobre el anoestro estacional de las cabras Murciano-Granadina en Murcia pertenecientes a la paridera tardía. *Avances en Alimentación y Mejora Animal*, 37(4-5), pp: 27.
- CHAKRABORTY P.K., STUART L.D., BROWN J.L., 1989: Puberty in the male Nubian goat: Serum concentration of LH, FSH and testosterone from birth through puberty and semen characteristics at sexual maturity. *Anim. Reprod. Sci.*, 20, pp: 91-101.
- CHANDLER J.E., PAINTER C.L., ADKISON R.W., MEMON M.A., HOYT P.G., 1988: Semen quality characteristics of dairy goats. *J. Dairy Sci.*, 71(6), pp: 1638-1646.
- CHAUHAN M.S., ANAND S.R., 1990: Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Theriogenology* 34 (5), pp: 1003-1013.
- CHAUHAN M.S., KAPILA R., GANDHI K.K., ANAND S.R., 1994: Acrosome damage and enzyme leakage of goat spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *Andrología* 26 (1), pp: 21-26.
- CHEMINEAU P., 1986: Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. 2. Male mating behaviour, testis diameter, ejaculate characteristics and fertility. *Reprod. Nutr. Develop.*, 26, pp: 453-460.
- CHEMINEAU P., COGNIE Y., GUERIN Y., ORGEUR P., VALLET J.C., 1991: Training manual on artificial insemination in sheep and goats. Food and agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, pp: 222.
- CHEMINEAU P., DAVEAU A., MAURICE F., DELGADILLO J., 1987: Effects of tropical photoperiod on sexual activity of Alpine goats. *Proc. IVth Int. Conf. On goats*, pp: 269.
- CHEMINEAU P., NORMANT E., RAVVAULT J.P., THIMONIER J., 1986. Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goat after a

treatment combining a skeleton period melatonin and the male effect. *L. Reprod. Fertil.*, 78, pp: 497-504.

COCHRAN J.D., AMANN R.P., FROMAN D.P., PICKETT B.W., 1984: Effect of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, 21, pp: 25-39.

COCHRAN R.C., JUDY J.K., PARKER C.F., HALLFORD D.M., 1985: Prefreezing and post-thaw semen characteristics of five ram breeds collected by electroejaculation. *Theriogenology*, 23(3), 431-440.

COELHO L.A., ESPER C.R., GARCIA J.M., MALHERIOS E.B., 1995: Sperm evaluation for in vitro fertilization procedures. *Ars Veterinária*, 11, pp: 31-39.

COGNIE Y., GUERIN Y., GYADER C., POULIN N., CROZET N., 1991: In vitro fertilization of sheep oocytes matured in vivo. *Theriogenology*, 25, pp: 146-149.

COLAS G., 1975: Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J. Reprod. Fert.*, 42, pp: 277-285.

COLAS G., 1979: *Livestock Production Science*, 6, pp: 153-166.

COLAS G., 1980: Variations saisonnières de la qualité du sperma chez la bélier Ile-de-France. I. Etude de la morphologie cellulaire et de la qualité du massale. *Reprod. Nutr. Develop.*, 20 (6), pp: 1789-1799.

COLAS G., BRICE G., 1976: Seasonal variations of the fertilizing capacity of the deep-frozen ram semen. *Proc. 8<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. And AI. Krakov. Poland.*, 4, pp: 346-350.

COLAS G., GUERIN Y., LEMAIRE Y., MONTASSIER Y., DESPIERRES J., 1986: Variations saisonnières du diamètre testiculaire et de la morphologie des spermatozoïdes chez la bélier Texel. *Reprod. Nutr. Dev.*, 26 (3), pp: 863-875.

CORTEEL J.M., 1974: Viabilité des spermatozoïdes de boucs conservés congelés avec ou sans leur plasma seminal. Effect du glucose. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 14, pp: 741-745.

CORTEEL J.M., 1975a: The use of progestagen to control the estrous cycle of the dairy goat. *Ann. Biol. Biochim. Biophys.*, 15, pp: 353-363.

CORTEEL J.M., 1975b: Effect du lavage sur la conservation des spermatozoïdes de bouc à basse température. *Ann. Biol. Biochim. Biophys.*, 15, pp: 525-528.

CORTEEL J.M., 1975c: Production du sperm chez le bouc: variation saisonnière de la quantité et de la qualité du sperm récolte selon l'âge des animaux. *1<sup>eres</sup> journées de la recherche ovine et caprine*, tome 1, pp: 4-17.

CORTEEL J.M., 1976: Variations de la motilité et de la fécondance de spermatozoïdes de bouc. *Ann. Zootech.*, 25, pp: 567-571.

CORTEEL J.M., 1977: Production, storage and artificial insemination of goat semen. *Proc. Symposium on Management of Reproduction in Sheep and Goats. Madison, Wisconsin (USA)*, pp: 41-57.

CORTEEL J.M., 1980: Effects of seminal plasma on the survival and fertility of spermatozoa kept in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.*, 20 (4a), pp: 1111-1123.

CORTEEL J.M., 1981: *Goat Production: Collection, Processing and Artificial Insemination of Goat semen*. Ed. Academic Press (London), pp: 171-191.

CORTEEL J.M., 1990: Maîtrise de la reproduction chez les caprins à vocation laitière. *5<sup>a</sup> Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, Zaragoza*, tomo I, pp: 191-274.

CORTEEL J.M., 1992: Involvement of seminal plasma in goat sperm preservation. *5<sup>th</sup> Intern. Confer. On Goats, New-Dheli, India, II, parts II*, pp: 290-297.

CORTEEL J.M., LEBOEUF B., 1990: Evolution technico-economique de l'insémination artificielle caprine. *Elevage et Insémination*, 237, pp: 3-17.

- CORTEEL J.M., LEBOEUF B., BARIL G., 1988: Artificial breeding of adult goat and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Rum. Res.*, 1, pp: 19-35.
- CRABO B.G., GRAHAM E.F., BROWN K.I., 1972: The effect of some zwitterion buffers on the freezing and storage of boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.*, 35, pp: 37-382.
- CROSS N.L., MORALES P., OVERSTREET J.W., HANSON F.W., 1986: Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res.*, 15, pp: 213.
- CROZET N., THERON MCP, CHEMINEAU P., 1987: Ultrastructure of in vivo fertilization in the goat. *Gamete Res.*, 18, pp: 191-199.
- DAS K.K., RAJKONWAR C.K., 1994: Morphological changes of acrosome during equilibration and after freezing of buck semen with raffinose egg yolk glycerol extender. *Indian Vet. J.*, 71, pp: 1098-1102.
- DEKA B.C., RAO A.R., 1986: Effect of glycerol level in Tris-based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. *Theriogenology*, 26(2), pp: 231-238.
- DEKA B.M., RAO A.R., 1987: Effect of storage at -196°C on quality of goat semen frozen with and without seminal plasma in Tris-based extender. *Cherion* 16 (2), pp: 65-69.
- DELGADILLO J.A., CANEDO G.A., CHEMINEAU P., GUILLAUME D., 1999: Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male Creole goats in subtropical northern Mexico. *Theriogenology* 52, pp: 727-737.
- DELGADILLO J.A., CHEMINEAU P., 1992: Abolition of sexual release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. *J. Reprod. Fertil.*, 94, pp: 45-55.
- DELGADILLO J.A., HOCHEREAU-DE REVIERS M.T., DAVEAU A., CHEMINEAU P., 1995: Effect of short photoperiodic cycles on male genital tract and testicular parameters in male goats (*Capra hircus*). *Reprod. Nutr. Dev.*, 35(5), pp: 549-558.
- DELGADILLO J.A., LEBOEUF B., CHEMINEAU P., 1991: Decrease in the seasonality of sexual behavior and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology* 36 (5), pp: 755-770.
- DELGADILLO J.A., LEBOEUF B., CHEMINEAU P., 1992: Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. *Small Ruminant Research* 9 (1), pp: 47-59.
- DIDION B.A., DOWRINSKY J.R., GILES J.R., GRAVES C.N., 1990: Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res.*, 22, pp: 51-57.
- DIDION B.A., GRAVES C.N., 1986: In vivo capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrous and diestrous cows. *J. Anim. Sci.*, 62, pp: 1029-1033.
- DORADO J., PEREZ C., HIDALGO M., RODRIGUEZ I., SANZ J., SANTIAGO J., SANCHEZ M., 2002a: Medidas de circunferencia escrotal y rubor inguinal sexual en el macho cabrío de raza Florida. *Archivos de Zootecnia* 51, pp: 393-396.
- DORADO J., RODRIGUEZ I., PEREZ C.C., HIDALGO M., MOLINA A., SANZ J., SANCHEZ M., 2002b: Evolución de la circunferencia escrotal y "skin flush sexual" en el macho cabrío de raza Florida. XXVI Jornadas Científicas y VI Internacionales de la SEOC, Valencia, pp: 1028-1033.
- DORADO J., RODRIGUEZ I., PEREZ C.C., HIDALGO M., SANZ J., SANTIAGO J., SANCHEZ M., 2002c: Respuesta de la cabra Florida al tratamiento de once días con esponjas vaginales. XXVI Jornadas Científicas y VI Internacionales de la SEOC, Valencia, pp: 1022-1027.
- DORADO J., RODRIGUEZ I., HIDALGO M., PEREZ C.C., CORRAL S., SANZ J., SANCHEZ M., 2003: Estudio del efecto de la estación sobre la calidad del esperma del macho

cabrío de raza Florida. XXVIII Jornadas Científicas y VII Internacionales de la SEOC, Cáceres (in press).

DRESDNER R.D., KATZ D.F., 1981: Relationship of mammalian sperm motility and morphology to hydronamic aspects of cell function. *Biol. Reprod.*, 25, pp: 920-930.

DROBNIS E.Z., NELSON E.A., LIN T.Y., 1982: The effect of freezing rate on motility and GOT release of frozen goat spermatozoa. *Proc. 3<sup>rd</sup> Int. Conf. On Goat Prod. And Disease. Arizona*, pp: 282.

DUNNER S., 1991a: Calidad del semen de macho cabrío refrigerado en diluyentes a base de sustancias zwitteriónicas. I Motilidad. ITEA, vol. 11, pp: 34-36.

DUNNER S., 1991b: Calidad del semen de macho cabrío refrigerado en diluyentes a base de sustancias zwitteriónicas. II Endósmosis, formas normales y acrosomas normales. ITEA, vol. 11, pp: 37-39.

DUNNER S., 1993: Freezing buck semen diluted in amine-organic buffers. *Anim. Prod.* 56 (3), pp: 387-391.

DUNNER S., VAZQUEZ I., 1991: Effects de milieu 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. *Archivos de Zootécnia*, vol. 4, n° 149, pp: 391-401.

DUTT R.H., 1960: Temperature and light as factors in reproduction among farm animals. *J. Dairy Sci.*, 43, pp: 123-144.

EGGERT-KRUSE W., KLINGA K., SCHWALBACH B., TILGEN W., ROHR G., RUNNEBAUM B., 1993: Evaluation of polyacrylamide gel as substitute for human cervical mucus in the sperm penetration test. *Fertil. Steril.*, 60(3), pp: 540-549.

ENTWISTE K.W., MARTÍN I.C.A., 1972: *Aust. J. Agric. Res.*, 23, pp: 467-472.

ERICSSON S.A., GARNER D.L., JHONSON L.A., REDELMAN D., AHMAD K., 1990: Flow cytometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa processed using a new antibiotic combination. *Theriogenology*, 33, pp: 1211-1220.

ESPINOSA E., 1996: Biotecnologías Reproductivas aplicadas a la producción ovina y caprina I. *Archivos de Reproducción Animal*, 11, pp: 58-72.

EVANS G., MAXWELL W.M.C., 1987: *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworth, London, 123pp.

EVANS G., MAXWELL W.M.C., 1990: *Inseminación Artificial de ovejas y cabras*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza.

FANTOVA E., CIUDAD M.A., SEVILLA E., QUINTIN F.J., FOLCH J., ALABART J.L., EQUIPO VETERINARIO DE CARNE ARAGON S.C.L., 1998: Resultados de inseminación artificial en el marco del esquema de selección por prolificidad en las ganaderías de Carne Aragón. *Producción Ovina y Caprina*, XXIII, SEOC, pp: 541-545.

FARREL P.B.Y COL, 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, 49 (4), pp: 871-879.

FIRST NL., PARRISH J.J., 1987: In vitro fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 34, pp: 151-165.

FISER P.S., AINSWORTH L., FAIRFULL R.W., 1987: Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 28, pp: 599-607.

FISER P.S., FAIRFULL R.W., 1983: Effects of changes in photoperiod on freezability of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 20(6), pp: 684-689.

FISER P.S., HANSEN C., UNDERHILL H., MARCUS G.J., 1991: New thermal stress test to asses the viability of cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, 28, pp: 454-459.

FOLCH J., 1984: The influence of age, photoperiodism and temperature on semen production of rams. In: Courot M (ed), *The male in Farm Animal Reproduction*. Amsterdam, pp: 141-160..

FOOTE R.H., 1978: Factors influencing the quantity and quality of semen harvested from bulls, rams, boars and stallions. *J. Anim. Sci.*, 47 (2), pp: 1-11.

FOOTE R., CHEN Y., BROCKETT C., KAPROTH M., 1993: Fertility of bull spermatozoa frozen in whole milk extender with trehalose, taurine, or blood serum. *J. Dairy Sci.*, 76(7), pp: 1908-1913.

FOUGNER J.A., 1976: Uterine insemination with frozen semen in goats. VII Int. Congr. Anim. Reprod. and AI., IV, pp: 987.

FOULKES J.A., WATSON P.A., 1995: Hyaluronidase activity in seminal plasma as a method of assessing bull sperm integrity. *J. Reprod. Fert.*, 43, pp: 349-353.

FRANCAVILLA S., GABRIELE A., ROMANO R., GIANAROLI L., FERRARETTI A.P., FRANCAVILLA F., 1994: Sperm-zona pellucida binding of human sperm is correlated with the immunocytochemical presence of proacrosin and acrosin in the sperm heads but not with the proteolytic activity of acrosin. *Fertil. Steril.*, 62(6), pp: 1226-1233.

FULKERSON W.J., SYNNOTT A.L., LINDSAY D.R., 1982: Number of spermatozoa required to effect normal rate of conception in naturally mated Merino ewes. *J. Reprod. Fert.*, 66, pp: 129-132.

GALINA M.A., SILVA E., MORALES R., LOPEZ B., 1985: Reproductive performance of Mexican dairy goats under various management systems. *Small Ruminant Research*, 18, pp: 249-253.

GARCIA ARTIGA C., VAZQUEZ I., GARDE J., MARTINEZ E., 1993: Estudio in vitro de la viabilidad del semen congelado de morueco. *Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animales*, 8(1), pp: 33-43.

GARCIA J., RUTTLE J., 1987: Artificial insemination of goats with diluted fresh semen. Proc. IV Int. Confer. Goats, Brasilia, II, pp: 1502-1503.

GARCIA-LOPEZ N., OLLERO M., MUIÑO-BLANCO T., CEBRIAN-PÉREZ J.A., 1996: A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma. *Theriogenology*, 46(1), pp: 141-151.

GARDE J., 1993: Congelación de semen en la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 137 pp.

GARNER D.L., THOMAS C.A., JOERG H.W., DEJARNETTE J.M., MARSHALL C.E., 1997: Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 57, pp: 1401-1406.

GLOGOWSKI J., DEMIANOWICZ W., PIROS B., CIERESZKO A., 1998: Determination of acrosin activity of boar spermatozoa by the clinical method: Optimization of the assay and changes during short-term storage of semen. *Theriogenology* 50, pp: 861-872.

GRACIA A., CABRERA F., GONZALEZ F., BATISTA M., FORGA M., CALERO P., 1998: Efecto de la proporción de yema sobre la conservación del semen congelado en la Agrupación Caprina Canaria (Variedad Majorera). *Producción Ovina y Caprina*, nº XXIII, SEOC, pp: 517-520.

GRAHAM E.F., CRABO B.G., BROWN K.I., 1972: Effect of some zwitter ion buffers on the freezing and storage of spermatozoa. I. *Bull. Journal of Dairy Science*, 55, pp: 372-378.

GRAHAM E.F., CRABO B., PACE M.M., 1978. XII Biennial symposium on Anim. Reprod., 47 suppl. II, pp: 80-118.

GRAHAM J.K., FOOTE R.H., 1987: Dilaurylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and in vitro penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm: II. A fertility assay for frozen-thawed semen. *Gamete Res.*, 16, pp: 147-158.

- GRAHAM E.F., NELSON D.S., SCHMEHL M.K., 1982: Development of extender and techniques for frozen turkey semen. 1. Development. *Poult. Sci.*, 61(3), pp: 550-557.
- GRAHAM E.F., RAJAMANNAN A.H., SCHMEHL M.K.L., MAKILAUROLA M., BOWER R., 1971: Preliminary report on procedure and rationale for freezing boar semen. *AI Digest.*, 1, pp: 12-25.
- GRAHAM E.F., SCHMEHL M.K.H., NELSON D.S., 1980: Problems with laboratory assays. 8<sup>th</sup> NAAB Tech. Conf. *Reprod. & AI*, Milwaukee, pp: 67-70.
- GRAHAM J.K., KUNZE E., HAMMERSTEDT R.H., 1990: Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol. Reprod.*, 43, pp: 55-64.
- GRAHAM E.F., VAZQUEZ I.A., SCHMEHL M.K.L., EVENSEN B.K., 1976: An assay of semen quality by use of sephadex filtration. VIII Int. Cong. Anim. *Reprod. Artif. Insem.* Kracow., 4, pp: 896-899.
- GROOTTE O., GRAFFER T., OLESEN I., 1992: Artificial insemination with frozen ram semen in Norway. *Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod.*, 3, pp: 1557-1559.
- HAFEZ E.S.E., 1987: Artificial insemination. In: Hafez E.S.E. (ed). *Reproduction in Farm Animals*. Philadelphia: Lea & Febiger, pp: 481-506.
- HAMMERSTEDT R.H., GRAHAM J.K., NOLAN J.P., 1990: Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.*, 11, pp: 73-87.
- HARRISON R.A., VICKERS S.E., 1990: Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 88, pp: 343-352.
- HELLEMANN C., JARA C., 1997: Efecto de un surfactante sobre la integridad de espermatozoides ovinos criopreservados. *Arch. Med. Vet.* N° 1, pp: 153-160.
- HERRERA J., TAPIA A., SUBIRES E., 1994: Inseminación artificial con semen congelado en ganado caprino (raza Murciano-Granadina). 7<sup>o</sup> Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, pp: 315.
- HIDALGO M., RODRIGUEZ I., PEREZ C.C., DORADO J., SANZ J., SANCHEZ M., 2002: Parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide de macho cabrío. XXVI Jornadas Científicas y VI Internacionales de la SEOC, Valencia, pp: 1053-1058.
- HIDALGO M., RODRIGUEZ I., DORADO J., PEREZ C.C., SANZ J., CORRAL S., SANCHEZ M., 2003: Influencia del método de tinción en la valoración morfométrica de la cabeza del espermatozoide de macho cabrío de raza Florida. XXVIII Jornadas Científicas y VII Internacionales de la SEOC, Cáceres (in press).
- HOLT W.V., PALOMO M.J., 1996: Optimisation of a continuous real-time computerized semen analysis system for rum sperm motility assessment and evaluation of four methods of semen preparation. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8, pp: 219-230.
- HUBE A., URIBE H., 1980: Efecto de diferentes temperaturas de descongelación sobre acrosomas y movimiento progresivo en semen bovino. 9<sup>th</sup> Intern. Cong. of Anim. *Reprod. & AI*, pp: 233-236.
- HUNTER R.H.F., WILMUT I., 1984: Sperm transport in the cow: periovalutary redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod. Nutr. Dev.*, 24, pp: 597-603.
- HUNTON J.R., FLECKER S.E., MXWELL W.M.C., 1987: Pregnancy rates following intra-uterine insemination with pellet or straw-frozen ram semen. *J. Agric. Sci.*, 109, pp: 189-191.
- IRITANI A., NISHIKAWA Y., 1961: Proceedings for the Silver Jubilee. *Lab. Anim. Husbandry*, Coll. of Agric., Kyoto University, Japan.
- IRITANI A., NISHIKAWA Y., 1963: Studies on the egg-yolk coagulating factor in goat semen. V. Purification of the egg-yolk coagulating enzyme. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 8, pp: 118-121.

IRITANI A., NISHIKAWA Y., NAGASAWA S., 1964: Studies on the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen. VII. Variations in the enzyme activity of the semen between breeding season, and in each ejaculate collected three times successively. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 10, pp: 52-56.

JASKO D.J., BEDFORD S.J., COOK N.L., MUMFORD E.L., SQUIRES E.L., PICKETT B.W., 1993: Effects of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 40, pp: 885-893.

JENNINGS J.J., MCWEENEY J., 1976: Effect of frequent ejaculation on semen characteristics in rams. *Vet. Rec.*, 98, pp: 230-233.

JOHNSON L.A., MAXWELL W.M.C., DOBRINSKY J.R., WELCH G.R., 1996: Staining sperm for viability assessment. *Reprod. Dom. Anim.*, 31, pp: 37-47.

JONES R.C., 1965: The use of dimethyl sulphoxide, glycerol and reconstituted skim milk for the preservation of ram spermatozoa. II. The influence of diluent composition and processing time during freezing to  $-79^{\circ}\text{C}$  with dimethyl sulphoxide or glycerol or both compounds. *Aust. J. Biol. Sci.*, 18, pp: 887-900.

JOSHI A., 1990: Factors affecting metabolic behaviour of ram spermatozoa during cryopreservation. *Indian J. Anim. Sci.*, 60, pp: 1336-1337.

JUNEJA S.C., SWANSON R.J., ROUDEBUSH W.E., DODSON M.G., 1989: Routine human sperm function analysis and the sperm hypo-osmotic swelling test. *Biol. Reprod.*, 40(1), pp: 115.

KARAGIANNIDIS A., VARSAKELI S., KARATZAS G., 2000: Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born raised in Greece. *Theriogenology* 53, pp: 1285-1293.

KARATZAS G., KARAGIANNIDIS A., VARSAKELI S., BRIKAS P., 1997: Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology* 48 (6), pp: 1049-1059.

KAYA A., AKSOY M., TEKELI T., 2002: Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Ruminant Research* 44, pp: 153-158.

KAYSER J.P., AMANN R.P., SHIDELER R.K., SQUIRES E.L., JASKO D.J., PICKETT B.W., 1992: Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 38 (4), pp:601-614.

KRISHNAMOORTHY R., 1981: Studies on certain sugars as cryoprotectants in semen extenders without and with reduced levels of glycerol for freezing the bull spermatozoa in straws. *HAU Thesis abstr*, pp: 106-107.

KUSUNOKI H., KATO S., KANDA S., 1989: Induction of the acrosome reaction in goat spermatozoa in simple physiological salt solution. *J. Exp. Zool.*, 250(3), pp: 346-8.

LAGHFORD G.H., 1982. *J. Anim. Sci.*, 59, pp: 685-691.

LEBOEUF B., 1989: L'insemination artificielle caprine en France, état actuel et perspectives d'avenir. *Proceedings Simposio Internazionale. La Riproduzione nei Piccoli Ruminanti*. Varese, Italia, pp: 87-113.

LEBOEUF B., 1992: Extensive application of Artificial Insemination in goats. *Proceedings V<sup>th</sup> International Conference on Goats, New-Dheli, India, II part II*, pp: 298-308.

LEBOEUF B., MANFREDI E., BOEU P., PIACERE A., BRICE G., BARIL G., BROQUA C., HUMBLLOT P., TERQUI M., 1998: L'insémination artificielle et l'amélioration génétique chez la chèvre laitière en France. *INRA Prod. Anim.* 11 (3), pp: 171-181.

LIGHTFOOT R.J., SALAMON S., 1969: Freezing of ram semen by the pellet method. II. The effect of method of dilution, dilution rate, glycerol concentration, and duration of storage at  $5^{\circ}\text{C}$  prior to freezing on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 22, pp: 1547-1560.

- LINCOLN G.A., 1980: Photoperiodic control of seasonal breeding in rams. The significance of short-day refractoriness. VI Inter. Congr. Of Endocrinol., pp: 283-287.
- LINCOLN G.A., 1987: Long-term stimulatory effects of a continuous infusion of LHRH agonist on testicular function in male red deer (*Cervus elaphus*). J. Reprod. Fertil., 80(1), pp: 257-61.
- LINCOLN G.A., 1989: Seasonal aspects of testicular function. In: Burguer H. Krester D (eds). The testis. New York, pp: 329-385.
- LINCOLN G.A., DAVIDSON W., 1977: The relationship between sexual and aggressive behaviour, and pituitary activity during the seasonal sexual cycle of rams, and the influence of photoperiod. J. Reprod. Fert. 49, pp: 267-276.
- LINDSAY D.R., 1969: Sexual activity and semen production of rams at high temperatures. J. Reprod. Fétil., 18, pp: 1-18.
- LOPEZ A., SÖDERQUIST L., RODRIGUEZ-MARTINEZ H., 1999: Efecto de la temperatura y del tiempo de incubación sobre la evaluación de la integridad de la membrana en semen congelado de carnero. Archivos de Reproducción Animal 10, pp: 30-35.
- LORENZO M, FRESNO M., DARMAIN N., MOLINA A., RAMOS R., 1997: Estudio del comportamiento reproductivo y calidad seminal de los machos y de la fertilidad mediante inseminación artificial en la Agrupación caprina Canaria. XXII Jornadas Científicas SEOC. Avances en Alimentación y Mejora Animal 37 (4-5), pp:26.
- LOTZE A., 1989: Investigations on the effect of age on sperm motility and morphology in bulls and boars. Thesis. Universität Münn-chen. 79pp.
- LOUBSER P.C., VAN NIEKERK C.H., 1983: Seasonal changes in sexual activity and semen quality in the Angora ram. 1. Libido and male hormone concentration. South African J. Anim. Sci. , 13, pp: 133-131.
- MACHADO R., SIMPLICIO A.A., 1992: Effects of two washing solutions on sperm survival of the bucks. In: Proc. Int. Conf. On goats. New Delhi, 5. Proc. Recent Advances in goat production. New Delhi. Indian Council of Agricultural Research, 2, pp: 1089-1094.
- MANCINI R.E., ALONSA A., BACQUET J., AVEREJ B., NEMIROVSKY M., 1964: Histoimmunological localization of hyaluronidase in the bull testis. J. Reprod. Fert., 8, pp: 325-330.
- MANN T., LUTWAK-MANN C., 1981: Male reproductive function and semen. New York: Springer-Verlag, pp: 269-326.
- MARECO G., AROSTEGUY R.P., 1994: Exitosa congelación de semen caprino en pajuelas. VII Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias.
- MARTI J.I., PEREZ-PEREZ R., FERNANDEZ M., CEBRIAN-PEREZ J.A., MUIÑO-BLANCO T., 1998: Inducción de la reacción acrosómica en semen ovino fresco. Marcaje mediante la Lectina de *Ricinus Communis* (RCA). Producción Ovina y Caprina, XXIII, SEOC, pp: 535-539.
- MARTÍN J.C., KLUG E., GÜNZEL A.R., 1978: Investigations on centrifugation of stallion semen and storage in large volume straws. 2<sup>nd</sup> Int. Symposium on Equine Reprod. Davis, California, pp: 24-28.
- MARTÍN I.C.A., WATSON P.F., 1976. Theriogenology, 5, pp: 29-35.
- MASCARENHAS R., 1994: Estado actual da inseminação artificial em caprinos. 7<sup>a</sup> Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, pp: 271-277.
- MASUDA H., NISHIKAWA Y., 1972: Studies on the substances in egg yolk effective on viability and metabolism of spermatozoa. IV. Effect of various aminoacids on the respiration and glycolysis of goat spermatozoa. Jap. J. Zootech. Sci., 43(7), pp: 360-365.
- MATEOS E., PEREZ B., 1994: Influencia del "lavado" en la calidad del semen caprino congelado. 7<sup>a</sup> Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, pp.: 320.

- MATTNER P.E., KENTWISTLE K.W., MARTÍN I.C.A., 1969: Passage, survival, and fertility of deep-frozen ram semen in the genital tract of the ewe. *Australian J. Biol. Sci.*, 22, pp: 181-188.
- MAXWELL W.M.C., LANDERS A.J., EVANS G., 1995: Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straw and minitubes. *Theriogenology* 43 (7), pp: 1201-1210.
- MAXWELL W.M.C., STOJANOV T., 1996: Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction, Fertility and Dev.*, 8, pp: 1013-1020.
- MAXWELL W.M.C., WATSON P.F., 1996: Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 42, pp: 55-65.
- MAXWELL W.M.C., WELCH G.R., JOHNSON L.A., 1997: Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8, pp: 1165-1178.
- MAZUR P., 1985: Basic concepts in freezing cells. In: Johnson L.A. and Larsson K. (eds). *Deep freezing of boar semen*. Swedish University of Agriculture Sci., Uppsala, pp: 91-111.
- MCKELVEY W.A.C., 1994: Recent research on Ai and MOET in sheep and their commercial application in the UK. *Proc. NZ Embryo Transfer Workshop*, 1, pp: 16-17.
- MCRORIE R.A., WILLIAMS W.L., 1974: Biochemistry of mammalian fertilization. *Ann. Rev. Biochem.*, 43, pp: 777.
- MEMON M.A., BRETZLAFF K.N., OTT R.S., 1982: Freezability of washed and unwashed goat semen in different extenders. *Proc. 3<sup>rd</sup> Int. Conf. On Goat Prod. And Disease*. Tucson. Arizona, pp: 282.
- MEMON M.A., BRETZLAFF K.N., OTT R.S., 1985: Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 46 (2), pp: 473-475.
- MEMON M.A., OTT R.S., 1981: Methods of semen preservation and artificial insemination in sheep and goats. *World Rev. Ani. Prod.*, 17, pp: 19-25.
- MENDOZA G., WHITE I.G., CHOW P., 1989: Studies of chemical components of Angora goat seminal plasma. *Theriogenology* 32 (3), pp: 455-466.
- MERCADO R.B., 1978: Efecto de la adición de un surfactante al diluyente tris para conservación de semen bovino. Tesis de Magíster en Ciencias Veterinarias, Mención Reproducción Animal, Universidad Austral de Chile.
- MERYMAN H.T., 1966: Crioprotective agents. *Cryobiology*. Ed. Academic Press.
- MITCHELL J.R., SENGER P.L., ROSENBERGER J.L., 1985: Distribution and retention of spermatozoa with acrosomal and nuclear abnormalities in the cow genital tract. *J. Anim. Sci.*, 61, pp: 956-963.
- MIYAMOTO A., UMEZU M., HAMANO K., MASSAKI J., 1987: Seasonal changes in inhibin activity in seminal plasma and serum concentration of FSH, LH and testosterone in male goat (*Capra hircus*). *Theriogenology*, 28, pp: 67-76.
- MOLE J.R., FITZGERALD J.A., 1990: Comparison of ram semen sperm interaction with bovine cervical mucus. *Theriogenology* 33(5), pp: 1031-1043.
- MOLINIA F.C., EVANS G., MAXWELL W.M.C., 1994: Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology* 42, pp: 849-858.
- MONJI Y., 1988: Studies on deep freezing storage of bull, goat and boar semen. *J. Agric. Sci. Tokio Nogyo Daigoku*, 32, pp: 224-234. *Anim. Breed Abstr.*, 56, pp: 6710.
- MORAES C.N., NEVES J.P., GONÇALVES P.B., OLIVEIRA J.F., SCHWEITZER C.M., 1998: Criopreservação do semen ovino em pellets com etileno glicol. *Ciencia Rural*, 28 (2), pp: 287-292.

MULLINS J., SAACKE R.G., 1989: Study of the functional anatomy of the bovine cervical mucosa with special reference to mucus secretion and sperm transport. *The Anat. Record*, 225, pp: 106-117

NEHRING H., 1988: Evaluation of acrosome integrity during semen storage. *Wiss. Zeitschrift der Humboldt Universität Zu Berlin, R. Med.*, 371, pp: 109-116.

NUNES J.F., 1982: Etude des effets du plasma seminal sur la survie in vitro des spermatozoides de bouc. Tesis Doctoral. Université Pierre et Marie Curie. París.

NUNES J.F., CORTEEL J.M., COMBARNOUS Y., BARIL G., 1982: Role of seminal plasma in the in vitro survival of goat sperm. *Reprod. Nutr. Dev.* 22 (4), pp: 611-620.

OLLERO M., BESCOS O., CEBRIAN-PÉREZ J.A., MUIÑO-BLANCO T., 1998: Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology* 49, pp: 547-555.

OLLERO M., MUIÑO-BLANCO T., LOPEZ-PÉREZ M.J., CEBRIAN-PÉREZ J.A., 1996: Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current distribution in an aqueous two-phase system. Effect of different cryoprotectants. *J. Chrom.*, pp: 157-164.

OSINOWO O.A., AHMED M.S., EKPE G.A., 1988: Semen quality and sperm output of Yankasa rams at different agens. *Theriogenology*, 29 (2), pp: 381-386.

OZSAR S., GUVEN B., EKICL A., KALKENDELEN G., ERKOK F.U., 1988: Artificial insemination with frozen-thawed semen in the Angora goat in Turkey. *Proc. 11<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. And AI, Dublin*, 3, pp: 283.

PACE M.M., SULLIVAN J.J., ELLIOT F.I., GRAHAM E.F., COULTER G.H., 1981: Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoa quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 0.5 ml French straws. *J. Anim. Sci.*, 53(3), pp: 693-701.

PALMER E., MAGISTRINI M., 1992: Automated analysis of stallion semen post-thaw motility. *Acta Vet. Scand.*, 88, pp: 137-152.

PARKS J.E., GRAHAM J.K., 1992: Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38 (2), pp: 209-222.

PASCUAL M.L., MUIÑO-BLANCO T., CEBRIAN-PÉREZ J.A., LOPEZ-PÉREZ M.J., 1993: Sperm cell heterogeneity revealed by centrifugal counter current distribution in an aqueous two-phase system. *J. Chrom.*, 617, pp: 51-57.

PELLETIER J., CHEMINEAU P., DELGADILLO J.A., 1988: Seasonality of sexual activity and its photoperiodic control in the adult ram and he-goat. *Proc. 11<sup>th</sup> Int. Cong. Anim. Reprod. AI, Dublin*, 5, pp: 211-219.

PELLICER M.T., COMBARNOUS Y., 1994: Efecto negativo sobre la viabilidad espermática del enzima triacilglicerol lipasa presente en la secreción de las glándulas bulbouretrales del macho cabrío. 7as Jornadas Internacionales de Reproducción Animal. Murcia, pp: 128.

PELLICER-RUBIO M.T., COMBARNOUS Y., 1998: Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *J. Reprod. Fertil.* 112 (1), pp: 95-105.

PEREIRA R.J., TULI R.K., WALLENHORST S., HOLTZ W., 2000: The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. *Theriogenology* 54 (2), pp: 185-192.

PÉREZ B., 1992: Estudio de los parámetros de valoración del rendimiento reproductivo en macho cabrío de las razas Verata y Malagueña. Thesis, Veterinary School, Complutense University, Madrid, Spain, 200pp.

PEREZ B., MATEOS E., 1993: Evolución del tamaño testicular en machos cabríos de las razas Verata y Malagueña. *Prod. Sanid. Anim.*, vol. 8 (3), pp: 257-268.

- PEREZ B., MATEOS E., 1994: Influence of photoperiod on the secretion of testosterone as a response to sexual stimulus in male goats. *Theriogenology* 42, pp: 127-135.
- PEREZ B., MATEOS E., 1996: Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malagueña breeds. *Small Ruminant Research* 23 (1), pp: 23-28.
- PÉREZ J.V., 1988: Importance of various semen treatments used in the freezing of goat semen. *Anim. Breedg. Abstr.*, 56(3), pp: 11491 abstr.
- PEREZ L.J., VARCARCEL A., DE LAS HERAS M.A., MOSES D., BALDESSARE, 1997: The storage of pure ram semen at room temperature results in capacitation of a subpopulation of spermatozoa. *Theriogenology* 47, pp: 549-557.
- PEREZ LLANO B., MATEOS REX E., 1995: Efecto del tipo de crioprotector externo y del porcentaje de glicerol sobre la calidad in vitro del semen congelado de macho cabrío. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.*, vol. 10 (3), pp: 211-221.
- PEREZ LLANO B., MATEOS REX E., PINTADO B., 1991: Características seminales del ganado caprino de la raza Verata. *ITEA*, vol. 11, pp: 40-42.
- PÉREZ B., PINTADO B., MATEOS E., 1992: Development of seminal parameters during growth in the Verata goat Breed. In: *Proc. 43<sup>rd</sup> Annual meeting of the EAAP*, Madrid, Spain, pp: 276-277.
- PHILLIPS P.H., LARDY H.A., 1940: A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J. Dairy Sci.*, 23, pp: 399-404.
- PINTADO B., 1991: Estudio físico-químico de cinco diluyentes de semen caprino con distintos métodos de conservación. *ITEA*, vol. 11, pp: 28-30.
- PINTADO B., PEREZ B., GIL L., 1991: Efecto de cinco diluyentes en la conservación in vitro de semen de macho cabrío Verato. *ITEA*, vol. 11, pp: 31-33.
- PINTADO SANJUANBENITO B., CRUZ LOPEZ M., ALCAIDE M., 1986.: Puesta a punto de un sistema de recogida de semen para machos cabríos. *XI Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*, pp: 191-193. Palencia, 22, 23 y 24 de septiembre.
- PINTADO SANJUANBENITO B., PEREZ LLANO B., 1992: Effect of glutaraldehyde concentration and fixative temperature on number of spermatozoa with normal acrosomes in goat semen. *Theriogenology* 38 (3), pp: 527-533.
- POLGE C., SMITH A.U., PARKES A.S., 1949: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164, pp: 666-668.
- RAJAMAHEDRAN R., AMBROSE J.D., LEE C.Y.G., 1994: Anti-human sperm monoclonal antibody HS-11: a potential marker to detect bovine sperm capacitation and acrosome reaction in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 101, pp: 539-545.
- RAO V.H., BHATTACHARYYA N.K., 1988: Ovulation in Black Bengal nanny goats. *J. Reprod. Fertil.*, 58(1), pp: 67-69.
- RITAR A.J., 1991: Seasonal changes in LH androgen and testes in the male Angora goat. *Theriogenology*, 36, pp: 969-972.
- RITAR A.J., 1993: Control of ovulation, storage of semen and artificial insemination of fibre-producing goats in Australia: a review. *Austral. J. Experim. Agric.*, 33, pp: 807-820.
- RITAR A.J., BALL P.D., 1993: The effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at a high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination. *Animal Reproduction Science*, 31 (3-4), pp: 249-262.
- RITAR A.J., BALL P.D., O'MAY P.J., 1990a: Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reprod. Fertil. Dev.* 2 (1), pp: 27-34.
- RITAR A.J., BALL P.D., O'MAY P.J., 1990b: 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 (4), pp: 377-384.

RITAR A.J., MENDOZA G., SALAMON S., WHITE I.G., 1992: Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (*Capra hircus*). *J. Reprod. Fertil.*, 95 (1), pp: 97-102.

RITAR A.J., SALAMON S., 1982: Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* 35 (3), pp: 305-312.

RITAR A.J., SALAMON S., 1983: Fertility of fresh and frozen-thawed semen of Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.*, 36, pp: 49-59.

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 (1), pp: 29-37.

ROCA J., CARRIZOSA J.A., CAMPOS I., LAFUENTE A., VAZQUEZ J.M., MARTINEZ E., 1994: Inseminación artificial con semen refrigerado en la raza caprina Murciano-Granadina: adecuación del diluyente. 7ª Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, pp: 329.

ROCA J., CARRIZOSA J.A., CAMPOS I., LAFUENTE A., VAZQUEZ J.M., MARTINEZ E., 1997: Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Ruminant Research* 25, pp: 147-153.

ROCA J., MARTINEZ E., SÁNCHEZ-VALVERDE M.A., RUIZ S., VAZQUEZ J.M., 1992a: Seasonal variations of semen quality in male goats: study of sperm abnormalities. *Theriogenology*, vol. 38 (1), pp: 115-125.

ROCA J., MARTINEZ E., VAZQUEZ J.M., COY P., 1992b: Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. *Animal Reproduction Science*, vol. 29 (3-4), pp: 255-262.

ROCA J., MARTINEZ E., VAZQUEZ J.M., RUIZ S., COY P., 1991a: Influencia de la edad sobre los parámetros reproductivos de machos cabríos de raza Murciano-Granadina. *Archivos de Zootecnia*, Vol. 40, pp: 173-179.

ROCA J., MARTINEZ E., VAZQUEZ J.M., RUIZ S., COY P., 1991b: Influence of season on testicle size and libido in male goats from the Mediterranean area. *Anim. Prod.* 52 (2), pp: 317-321.

RODRIGUEZ I., DORADO J., HIDALGO M., PEREZ C.C., CORRAL S., SANZ J., 2003: Influencia de la circunferencia escrotal y de los factores ambientales sobre la producción seminal del macho cabrío de raza Florida. IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal, Arucas (Las Palmas), (in press).

RODRÍGUEZ-MARTINEZ H., LARSON B., PERTOFT H., 1997: Evaluation of sperm and techniques for sperm clean-up. *Reprod. Fertil. Dev.*, 9, pp: 297-308.

RODRÍGUEZ O.L., BERNDTSON W.E., ENNEN B.D., PICKETT B.W., 1975: *J. Anim. Sci.*, 41(1), pp: 129-136.

ROMANO J.E., 1993: Effect of service in estrus duration in dairy goats. *Theriogenology*, 40, pp: 77-84.

ROMANO J.E., 1994: Effects of different stimuli of service on estrus duration in dairy goats. *Theriogenology* 42 (5), pp: 875-879.

ROMANO J.E., CRABO B.G., CHRISTIANS C.J., 2000: Effect of sterile service on estrus duration, fertility and prolificacy in artificially Dairy goats. *Theriogenology* 53 (6), pp: 1345-1353.

ROMANO J.E., FERNANDEZ-ABELLA, 1997: Effect of service on duration of Oestrus and ovulation in dairy goats. *Anim. Reprod. Sci.*, 47, pp: 107-112.

ROY A., 1957: Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature* 79, pp: 318-319.

- ROY A., BISHOP M.W.H., 1954: Effect of glycine on the survival of bull spermatozoa in vitro. *Nature*, 174, pp: 746-747.
- RUGG C.D., BERNDTSON W.E., MORTIMER R.G., PICKETT B.W., 1977: *J. Anim. Sci.*, 44, pp: 266-270.
- SAACKE R.G., 1970: Morphology of the sperm and relationship to fertility. Proc. 3<sup>rd</sup> Technical Conference, Animal Reproduction and Artificial Insemination. National Association of Animal Breeders, 1970, pp: 16.
- SAACKE R.G., 1982: Components of semen quality. *J. Anim. Sci.*, 55(2), pp: 1-13.
- SAACKE R.G., 1984: Semen quality: importance of and influencing factors. Proc. 10<sup>th</sup> Tech. Conf. AI Reprod. National Association of Animals Breeders, pp: 30-36.
- SAACKE R.G., MARSHALL C.E., VINSON W.E., O'CONNOR M.L., CHANDLER J.E., MULLINS K.J., AMANN R.P., WALLACE R.A., VINCEL W.N., KELLGREN H.C., 1980: Semen quality and heterospermic insemination in cattle. IX Int. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem. Madrid., 5, pp: 75.
- SAACKE R.G., WHITE J.M., 1972: Semen quality test and their relationship to fertility. Proc. 4<sup>th</sup> tech. Conf. Artif. Insem. Reprod. NAAB, pp: 22.
- SALAMON S., 1968: Deep freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods. *Aust. J. Biol. Sci.*, 21, pp: 355-360.
- SALAMON S., MAXWELL W.M.C., 1995a: Frozen storage of ram semen: I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 37, pp: 185-249.
- SALAMON S., MAXWELL W.M.C., 1995b: Frozen storage of ram semen: II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.*, 38, pp: 1-36.
- SALAMON S., RITAR A.J., 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 (3), pp: 295-303.
- SALISBURY G.W., VANDEMARK N.L., LODGE J.R., 1978: *Physiology of Reproduction and artificial Insemination of Cattle*. G.W. Salisbury ed. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- SALLES M.G.F., NUNES J.F., 1993: Agua de coco in natura, adicionada de zeatina e de JYP, como diluidores do sémen caprino. 6<sup>o</sup> congreso Internacional de Medicina Veterinaria em Língua Portuguesa. Salvador, Brasil, K6, pp: 419-420.
- SANCHEZ RODRIGUEZ M., 1988: Aprovechamiento de los recursos naturales con caprino lechero en la sierra norte de Sevilla. Tesis doctoral. Fac. Vet. Córdoba.
- SANCHEZ RODRIGUEZ M., CAPOTE ALVAREZ J., FALAGAN PRIETO A., 1995: Razas y sistemas de producción. *Ovis (Aula veterinaria)*, Vol. 38, pp: 11-21.
- SANCHEZ RODRIGUEZ M., GOMEZ CASTRO A.G., DOMENECH GARCIA V., 1992: Caprino lechero de Andalucía. Informe del sector agrario en Andalucía, 1991. Unicaja, 1992.
- SANCHEZ RODRIGUEZ M., HERRERA GARCIA M., SÁNCHEZ ROMERO J.A., ALVAREZ NÚÑEZ J.J., 1990: Origen, censo y distribución de la cabra florida. XV Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Córdoba.
- SANZ J., RODRÍGUEZ I., ACOSTA M., PÉREZ C., MOTA J., 1999: Situación actual de la congelación de esperma equino. II Congreso Ibérico de Reproducción Animal, pp: 175-178.
- SCHINDLER H., AMIR D., 1973. *J. Reprod. Fert.*, 34, pp: 191-196.
- SHINA N.K., WANI G.M., SAHNI K.L., 1981: Effect of seasons and age on seminal attributes of Jamunapari buck. *Indian Vet. J.*, 58(12), pp: 963-965.
- SINGH J., PANGAWKAR G.R., BISWAS R.K., KUMAR N., 1991: Studies on buffalo sperm morphology during various stages of freezing in certain extenders. *Indian J. Anim. Reprod.*, 12, pp: 126-129.

SINGH J. PANGAWKAR G.R., SHRIVASTAVA A.K., 1992: Efficacy of certain extenders on leakage of phosphatase from buffalo spermatozoa during deep freezing. *Indian J. Anim. Reprod.*, 13, pp: 35-38.

SINGH M.P., SINHA A.K., SINGH B.K., 1995: Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology* 43 (6), pp: 1047-1053.

SINGH M.P., SINHA A.K., SINGH B.K., PRASAD R.L., 1996: Effect of cryoprotectants on release of various enzymes from buck spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 45, pp: 405-416.

SKALET L.H., RODRIGUES H.D., GOYAL H.O., MALONEY M.A., VIG M.M., NOBLE R.C., 1988: Effects of age and season on the type and occurrence of sperm abnormalities in Nubian bucks. *Am. J. Vet. Res.*, 49 (8), pp: 1284-1289.

SMITH J.F., PARR J., BEAUMONT S., OLIVER J.E., UPRETI G.C., 1995: Proc. 27<sup>th</sup> Ann. Conf. Austr. Soc. Repro. Biol., pp: 18.

SNEDEKER W.H., GAUNYA W.S., 1970: Dimethyl sulfoxide as a cryoprotective agent for freezing bovine semen. *J. Anim. Sci.*, 30, pp: 953-956.

SÖDERQUIST L., MADRID-BURY N., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H., 1997: Assessment of ram membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology* 48 (7), pp: 1115-1125.

STRZEZEK J., KORDAN W., GLOGOWSKI J., WYSOCKI P., BORKOWSKI K., 1995: Influence of semen collection frequency on perm quality in boars, with special reference to biochemical markers. *Reprod. Dom. Anim.*, 30, pp: 85-94.

SUKHIJA S.S., 1984: Studies on certain morphological and biochemical changes in buffalo spermatozoa during freeze preservation. Ph.D. Dissertation. Haryana Agric. University. Hisar. India.

SUMMERMATTER P., FUSCHINI E., 1995: Semen productivity of different Swiss goat breeds. *Reprod. In Domestic Anim.*, 30(3), pp: 129-132.

TALBOT P., CHACON R.S., 1981: A triple technique for evaluating acrosome reaction of human sperm. *J. Exp. Zool.*, 215, pp: 201-208.

TAPIA A., HERRERA J., 1995: Valoración del semen refrigerado durante doce horas en el macho cabrío Murciano-Granadino. XX Jornadas Científicas SEOE, pp: 93-98.

THIMONIER J., TERQUI M., CHEMINEAU P., 1986: Conduite de la reproduction des petits ruminants dans les différents parties du monde. In: Proc. Int. Atomic Energy Agency, (Editors), Nuclear and related techniques in animal production and health, pp: 135-147.

TULI R.K., HOLTZ W., 1992: The effect of zwitterions buffers on the freezability of Boer goat semen. *Theriogenology*, 37, pp: 947-951.

TULI R.K., HOLTZ W., 1994: Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and got-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology* 42 (3): 547-555.

TULI R.K., HOLTZ W., 1995: Effect of season on the freezability of Boer goat semen in the northern temperate zone. *Theriogenology* 43 (8): 1359-1363.

TULI R.K., SCHMIDT-BAULIN R., HOLTZ W., 1992: Computer-Assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of the bull. Boar and goat. *Theriogenology* 38, pp: 487-490.

UWLAND J., 1984: Possibilities and limitations of semen evaluation for the prognosis of male fertility. In: *The male in farm animal reproduction*, edited by M. Courot, pp: 269-289.

VALCÁRCEL A., DE LAS HERAS M.A., PÉREZ L., MOSES D.F., BALDASSARRE H., 1994: Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology* 41 (2), pp: 483-489.

VALCARCEL A., HERAS M.A., PÉREZ L., MOSES D.F., BALDASSARRE H., HERAS M.A., 1996: Assessment of the acrosomal status of membrane intact ram spermatozoa after freezing and thawing by simultaneous lectin-Hoechst 33258 staining. *Anim. Reprod. Sci.*, 45, pp: 299-309.

VARNER D.D., WARD C.R., STOREY B., KENNEY R., 1987: Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.*, vol. 48 (9).

VAZQUEZ I., CORTES S., BORQUE C., 1998: Conservación del semen de macho cabrío. *Producción Ovina y Caprina*, XXIII: Ponencia 2, pp: 31-36.

VAZQUEZ J.M., MARTINEZ E., ROCA J., COY P., RUIZ S., 1992: Use of Triple stain technique for simultaneous assessment of vitality and acrosomal status in boar spermatozoa. *Theriogenology* 38 (5), pp: 843-852.

VIJIL E., GONZALO C., RUIZ-POVEDA J., CIUDAD C., 1986: Evolución estacional del diámetro testicular en el ovino Karakul: Repercusión sobre el comportamiento copulatorio y características seminales. *CENSYRA de Valdepeñas*, pp: 132-149.

WALKDEN-BROWN S.W., RESTALL B.L., HENNIAWATI, 1993: The male effect in the Australian cashmere goat. 3. Enhancement with buck nutrition and use of estrous females. *Anim. Reprod. Sci.*, 32, pp: 67-84.

WALKDEN-BROWN S.W., RESTALL B.J., TAYLOR W.A., 1994: Testicular and epididymal sperm content in grazing Cashmere bucks: seasonal variation and prediction from measurements in vivo. *Reprod. Fertil. Dev.*, 6 (6), pp: 727-736.

WATSON P.F., 1995: Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Repro. Fertil. Dev.*, 7, pp: 871-891.

WATSON P.F., 2000: The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60-61, pp: 481-492.

WATSON P.F., MARTIN I.C.A., 1975: Effects of egg yolk, glycerol and freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. *Australian J. Biol. Sci.*, 28, pp: 153-159.

WEITZE K.F., 1977: Untersuchungen zur Tiefgefrierung von Kaninchensperma. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Habil.-Schr.

WEITZE K.F., PETZOLDT R., 1992: Preservation of semen. *Reprod. Sci.*, 28, pp: 229-235.

WHITFIELD C.H., PARKINSON T.J., 1992: Relationship between fertility of bovine semen and in vitro induction of acrosome reactions by heparin. *Theriogenology*, 38, pp: 11-20.

WOELDERS H., 1991: Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. In: LA Johnson and D: Rath Editors, *Reproduction of domestic animals. Proc. 2<sup>nd</sup> Int. Conf. On Boar Semen Preservation*, Beltsville, MD, Paul Parey, Berlin, suppl. 1, pp: 145-164.

YANAGIMACHI R., 1994: *The physiology of reproduction*, 1, pp: 135-1876. E. Knobil, J.D. Neill. Raven Press Ltd. New York. EEUU.

ZLATAREV S.T., 1976. *Proc. 8<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. INSEM*. Cracow,

## **11 ABREVIATURAS**

<b>C:</b>	Concentración espermática	<b>MRPD:</b>	Movimiento rápido progresivo a la descongelación
<b>Ca:</b>	Calcio	<b>MT:</b>	Movimiento total
<b>cc:</b>	Centímetros cúbicos	<b>MTD:</b>	Movimiento total a la descongelación
<b>cm:</b>	Centímetros	<b>n:</b>	Número de muestras
<b>cm<sup>2</sup>:</b>	Centímetros cuadrados	<b>N:</b>	Porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales
<b>col:</b>	Colaboradores	<b>ND:</b>	Porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales a la descongelación
<b>eCG:</b>	Gonadotropina coriónica equina	<b>ns:</b>	No significativo
<b>EM:</b>	Espermatización manual (véase Inseminación Artificial)	<b>p:</b>	Nivel de confianza
<b>FP:</b>	Fotoperiodo	<b>r:</b>	Coefficiente de correlación
<b>gr:</b>	Gramos	<b>r<sup>2</sup>:</b>	Coefficiente de determinación
<b>h:</b>	Horas	<b>SD:</b>	Standart Desviation
<b>hCG:</b>	Gonadotropina coriónica humana	<b>sem:</b>	Error típico
<b>I:</b>	Integridad de acrosoma	<b>spz:</b>	Espermatozoides
<b>ID:</b>	Integridad de acrosoma a la descongelación	<b>T:</b>	Diluyente Tris
<b>Km:</b>	Kilómetros	<b>T<sup>a</sup>:</b>	Temperatura ambiental media
<b>l:</b>	Litros	<b>UI:</b>	Unidades internacionales
<b>L:</b>	Diluyente lácteo	<b>VA:</b>	Vagina artificial
<b>m:</b>	Metros	<b>VE:</b>	Volumen eyaculado
<b>m<sup>2</sup>:</b>	Metros cuadrados	<b>vs:</b>	Versus
<b>mg:</b>	Miligramos	<b>µg:</b>	Microgramo
<b>Mhz:</b>	Megahertzios	<b>µl:</b>	Microlitros
<b>min:</b>	Minutos		
<b>mm:</b>	Milímetros		
<b>ml:</b>	Mililitros		
<b>mod:</b>	Modelo		
<b>MRP:</b>	Movimiento rápido progresivo		

**12 ANEXO 1**

Tabla 26: Ficha de entrenamiento para el salto en vagina artificial.

<u>Fecha:</u>	<u>Nº crotal:</u>	<u>Edad:</u>
<b><u>Recogida esperma:</u></b>	<b>1º Eyaculado</b>	<b>2º Eyaculado</b>
Hora		
Técnico		
Tª vagina		
Observaciones		
<b><u>Comportamiento sexual:</u></b>		
Líbido		
Tiempo a la 1ª erección		
Tiempo al 1º salto		
Tiempo eyaculación		
Nº saltos para eyaculación		
Observaciones		
<b><u>Control esperma:</u></b>		
Aspecto (d,f,a)		
Color/olor		
V (ml)		
pH		
MT		
MRP		
C (mill. spz/ml)		
Observaciones		
<b><u>Morfología espermática (Tinción)</u></b>		
% macrocabezas/filiforme		
% microcabezas/piriforme		
% cabeza doble		
% cabezas caídas		
% cabezas sueltas		
% inserción abaxial		
% pieza intermedia doblada		
% pieza intermedia engrosada		
% gota citoplasmática p-d		
% cola lazo		
% cola gancho		
% cola en ovillo		
Otras células		
Observaciones		
<b><u>Tinción Acrosoma</u></b>		
% íntegros		
% activados		
% desnudos		
Observaciones		

VE= volumen eyaculado; MRP= movimiento rápido progresivo; C= concentración espermática;

**Tabla 27: Ficha de trabajo para la valoración de la morfología espermática y de la integridad de acrosoma.**

<i>Macho:</i>		<i>Identificación:</i>			<i>Fecha estudio:</i>			<i>Tinción:</i>			<i>Fecha congelación:</i>			<i>Observaciones:</i>			
		<u>MORFOLOGIA</u>									<u>ACROSOMA</u>						
<u>% Normales:</u>		<u>% Anormales:</u>	<u>% Anomalías Primarias:</u>					<u>% Anomalías secundarias:</u>			<u>% Integro:</u>	<u>% Activado:</u>	<u>% Desnudo:</u>				
N	Cb suelt	Cb caíd	Cb dobl	Macro/ filif	Mic/ Pir	In Abx.	GC P-D	PID	PIE	C lazo	C Ganc	C Ovil		I	A	D	
1																	
2																	
3																	
4																	
5																	
6																	
7																	
8																	
9																	
10																	
11																	
12																	
13																	
14																	
15																	
16																	
17																	
18																	
19																	
20																	

Totales:

N= espermatozoides normales; Cb suelt= cabeza suelta; Cb caid= cabeza caída; Cb dobl= cabeza doble; Macr= macrocabeza; Filif= cabeza filiforme; Mic= microcabeza; Pir= cabeza piriforme; In Abax= inserción abaxial; GCP= gota citoplasmática proximal; GCD= gota citoplasmática distal; PID= pieza intermedia doblada; PIE= pieza intermedia engrosada; C lazo= cola lazo; C Ganc= cola gancho; C Ovil= cola ovillo; I= acrosoma íntegro; A= acrosoma activado; D= acrosopma desnudo.

**Tabla 28: Ficha de trabajo para la congelación de esperma.**

**CONGELACION ESPERMA MACHO CABRIO**

Fecha: \_\_\_\_\_ Nº crotal macho: \_\_\_\_\_ Identificación: \_\_\_\_\_

Volumen eyaculado:  
 Volumen procesado:

Dilución: 0.5 ml. esperma + 2 ml. DPBS ( h.)

<u>Nº caso:</u>	<u>Nº caso:</u>
1: h.	1: h.
2: h.	2: h.

Lavado: ml esperma + Biladyl 1/9 ( 2500 rpm= 20 min.) = h.

Concentración Espermática:

Media:  
 M.R.P.:  
 Dosis 125 mill spz MRP/ml en 0.5 ml:

Añadir diluyente:

Refrigeración (+5° C): Preparación de Equitainer ( h.).  
 -refrigeración de a h.

Envasado:  
 -de a h. | dosis 0.5 ml  
 | dosis 0.5 ml

Vapores de Nitrógeno líquido (20 min):  
 -dosis de a h.

Almacenaje en Bombona de Nitrógeno líquido:

- dosis	goblets	Canister:
- dosis	goblets	

1= tiempo inicio control; 2= tiempo fin del control

**Tabla 29: Ficha de trabajo para la descongelación de esperma.**

**DESCONGELACIÓN MACHO CABRÍO**

**DOSIS T:**

Fecha Congelación:		Fecha Descongelación :	
Dosis 0.5 ml:	Canister:	Sello:	
Hora:	h. (39° C= 30").		
Dilución:	1 ml. Merk I ( h.) a lo anterior 1 ml. Merk I (1 mim)		
Control 5' : ( h.)		3 series	Control 60' ( h). 3 series
1ª gota	↑ 1 h.	↑	1ª gota
Id:	↓ 2 h.	↓	Id:
2ª gota :	↑ 1 h.	↑	2ª gota
Id:	↓ 2 h.	↓	Id:

**DOSIS L:**

Fecha Congelación:		Fecha Descongelación:	
Dosis 0.5 ml:	Canister:	Sello:	
Hora:	h. (39° C= 30").		
Dilución:	1 ml. Merk I ( h.) a lo anterior 1 ml. Merk I (1 min)		
Control 5' : ( h.)		3 series	Control 60' ( h). 3 series
1ª gota	↑ 1 h.	↑	1ª gota
Id:	↓ 2 h.	↓	Id:
2ª gota I:	↑ 1 h.	↑	2ª gota
Id:	↓ 2 h.	↓	Id:

1= tiempo inicio control; 2= tiempo fin del control

Tabla 30: Ficha de trabajo para el control de salida a celo.

**FICHA DE RECELA**

*Fecha:* \_\_\_\_\_

*Nº crotal del macho:* \_\_\_\_\_

*Hora de inicio:* \_\_\_\_\_

Crotales	Orden de detección	Hora de detección	Signos de celo

**13 ANEXO 2**

**Tabla 31: Datos referentes al tratamiento de sincronización de las hembras: Aplicación de esponjas vaginales de 45 mg FGA.(Intervet®) durante 11 días.**

Nº CROTAL	PE	VULVA	MOCO	eCG/PG	VULVA	MOCO	RE	VULVA	MOCO
121	20:07	peq	no	20:37	peq	no	20:04	peq	mucho
163	20:12	peq	no	20:43	peq	no	20:55	peq	medio
176	20:48	media	húmeda	21:18	peq	no	20:45	muy peq	mucho sangre
209	20:10	peq	no	20:39	peq	no	20:53	peq	medio
213	20:25	peq	no	20:54	peq	no	20:48	media	mucho
811	20:47	media	no	21:11	media	no	20:13	media	mucho
832	20:30	muy peq	no	21:03	muy peq	no	20:22	peq	poco
880	20:40	media	no	21:07	peq	no	20:16	peq	mucho
901	20:44	media	no	21:09	peq	no	20:35	peq	mucho
909	20:33	media	húmeda	21:04	peq	no	20:10	media	mucho
4	19:48	media	no	20:50	grande	no	20:03	media	mucho
141	19:20	peq	no	20:40	peq	no	20:31	media	mucho
147	20:00	media	no	20:15	media	húmed	20:09	grande	medio
156	19:45	media	no	19:51	media	poco	19:50	media	no
167	20:10	media	no	20:32	media	no	19:58	media	mucho
179	20:16	media	no	20:00	media	no	19:51	media	no
180	20:01	peq	no	20:05	peq	no	20:46	peq	poco
188	20:07	media	no	19:54	peq	poco	19:53	media	mucho
198	20:10	media	no	20:49	media	no	20:31	media	medio
216	19:46	peq	no	20:10	peq	no	20:07	peq	mucho
803	20:12	media	no	20:28	media	no	20:20	media	mucho
810	19:59	peq	no	20:20	media	no	20:00	muy peq	mucho
837	19:55	peq	no	20:08	peq	no	20:18	peq	mucho
878	20:21	peq	no	20:35	peq	no	20:47	peq	medio
929	20:20	media	no	19:55	media	no	19:59	media	poco
942	19:57	peq	no	19:57	media	no	20:02	media	mucho
291	20:03	peq	no	19:54	peq	no	20:03	peq	mucho
306	20:06	peq	no	19:56	media	no	20:15	media	medio
811	20:17	peq	no	20:12	peq	no	20:23	media	medio
832	20:12	muy peq	no	20:11	muy peq	no	20:20	muy peq	poco
841	20:19	media	no	20:40	peq	no	20:26	media	poco
846	20:22	peq	no	20:16	peq	no	20:27	peq	poco
901	20:29	peq	no	20:46	peq	no	20:29	media	mucho
947	20:53	peq	no	20:32	peq	no	20:43	peq	mucho
952	20:10	peq	no	21:06	peq	no	20:18	media	poco
958	20:08	peq	no	20:00	peq	no	20:16	muy peq	poco
959	21:02	peq	no	20:37	peq	no	20:52	peq	mucho
960	20:38	peq	no	20:25	peq	no	20:36	media	mucho
961	20:57	media	no	20:35	peq	no	20:46	media	mucho
2	20:32	peq	no	20:21	peq	no	20:32	peq	mucho
18	20:43	peq	no	20:30	peq	no	20:41	peq	mucho
28	20:41	peq	no	20:27	peq	no	20:31	media	mucho

PE= hora de colocación de las esponjas; eCG/PG= hora de aplicación de 300 UI de eCG y 125 µg de cloprostenol a los 9 días de la colocación de las esponjas; RE= retirada de esponjas; peq = pequeña.

Tabla 32: Control de salida a celo tras la retirada de las esponja vaginales.

Nº CROTAL	0 h	12 h	18 h	24 h	36 h	42 h	48 h	60 h	66 h	72 h	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 20	DÍA 21	PC	DC (h)
121	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	12
163	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	30
176	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	6
209	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	12
213	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	36
811	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6
832	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	12
880	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	24
901	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
909	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
141	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	36
147	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	12
156	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	24
167	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	24
179	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	30
180	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	42
188	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	36
198	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	24
216	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	12
803	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	36
810	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	30
837	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	24
878	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	24
929	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	24
942	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	24
291	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	24

PC = presencia de signos de celo; DC = duración del celo.

Tabla 32: Control de salida a celo tras la retirada de las esponja vaginales (Continuación).

Nº CROTAL	0 h	12 h	18 h	24 h	36 h	42 h	48 h	60 h	66 h	72 h	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 20	DÍA 21	PC	DC (h)
306	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	24
811	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	12
832	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	24
841	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	36
846	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	30
901	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6
947	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	30
952	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	30
958	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
959	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6
960	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	12
961	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	24
2	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	30
18	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	12
28	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	12

PC = presencia de signos de celo; DC = duración del celo.

**Tabla 33: Características de las dosis de espermatozoides congelado-descongelado empleadas en la espermatización manual vía cervical de las cabras sincronizadas y resultados del diagnóstico de gestación a los 25 días.**

MACHO	FECHA	DOSIS	VE	C	NEE	MT	MRP	N	I	DG
2	03/01/01	Precongelación	1,40	3204	4486	89,15	65,01	82,1	95,5	
		21 0301 T			125	52,75	38,21		60,6	-
		21 0301 G			125	63,08	42,72		58,5	+
1	07/02/01	Precongelación	1,30	4988	6484	83,11	56,27	73,7	91,8	
		200702 T			125	50,19	20,66		57,5	-
		200702 G			125	62,40	38,8		62,9	+
2	08/02/01	Precongelación	1,30	4504	5855	86,78	59,99	92	93,4	
		21 0802 T			125	58,96	34,65		59,3	+
		21 0802 G			125	63,57	43,57		59,9	-
1	13/02/01	Precongelación	1,50	4352	6528	93,19	68,02	76,4	92	
		20 1302 T			125	71,19	31,57		57,3	+
		20 1302 G			125	63,57	43,46		72	-
2	14/02/01	Precongelación	1,00	3552	3552	79,43	50,28	80,4	95,4	
		21 1402 T			125	68,84	39,11		34,1	+
		21 1402 G			125	53,33	35,93		41,2	+
1	22/03/01	Precongelación	1,10	4956	5452	88,74	55,63	78,1	94,7	
		20 2203 T			125	68,63	36,82		58,6	+
		20 2203 G			125	67,65	37,96		68,9	+
2	12/09/01	Precongelación	1,30	4228	5496	86,23	63,23	90,4	84,9	
		20 120901 T			125	50,00	37,41		44,8	-
		20 120901 G			125	56,83	43,59		60,5	+
1	20/09/01	Precongelación	1,10	4400	4840	79,99	55,69	78,2	86,7	
		20 200901 T			125	56,19	37,69		41,8	-
		20 200901 T			125	56,19	37,69		41,8	-
		20 200901 G			125	51,61	36,83		50,51	+
		20 200901 G			125	51,61	36,83		50,51	+

VE = volumen eyaculado; C = concentración espermática; NEE = número de espermatozoides por eyaculado/dosis; MT = movimiento total; MRP = movimiento rápido progresivo; N = morfología espermática; I = integridad de acrosoma; DG = diagnóstico de gestación.

**Tabla 33: Características de las dosis de espermatozoides congelado-descongelado empleadas en la espermatización manual vía cervical de las cabras sincronizadas y resultados del diagnóstico de gestación a los 25 días (Continuación).**

MACHO	FECHA	DOSIS	VE	C	NEE	MT	MRP	N	I	DG
2	26/09/01	Precongelación	0,90	3484	3136	87,27	57,94	93,6	86,6	
		21260901 T			125	59,15	36,88		30	-
		21260901 G			125	60,84	39,9		63,7	+
1	16/10/01	Precongelación	1,70	3320	5644	86,01	66,96	70	87,6	
		20 161001 T			125	66,49	46,28		50	-
		20 161001 T			125	66,49	46,28		50	-
		20 161001 G			125	55,43	33,02		64,9	+
		20 161001 G			125	55,43	33,02		64,9	+
2	18/10/01	Precongelación	1,50	3080	4620	92,77	69,7	80,4	90,7	
		21181001T			125	69,31	42,85		38,2	-
		21181001G			125	53,25	30,32		73,4	-
2	07/11/01	Precongelación	1,30	4356	5663	93,18	75	80,66	91,7	
		21071101T			125	68,11	51,68		39,5	+
		21071101T			125	68,11	51,68		39,5	-
		21071101G			125	68,38	50,55		48,2	-
		21071101G			125	68,38	50,55		48,2	+
2	08/11/01	Precongelación	1,50	3396	5094	91,09	60,25	83,3	86,4	
		21081101T			125	55,16	41,64		42,1	+
		21081101G			125	54,80	39,2		49,2	-
2	22/11/01	Precongelación	1,60	3908	6253	91,99	66,44	89	94,4	
		21221101T			125	68,03	49,09		59,6	+
		21221101T			125	68,03	49,09		59,6	-
		21221101G			125	64,05	43,51		50,5	-
		21221101G			125	64,05	43,51		50,5	-

VE = volumen eyaculado; C = concentración espermática; NEE = número de espermatozoides por eyaculado/dosis; MT = movimiento total; MRP = movimiento rápido progresivo; N = morfología espermática; I = integridad de acrosoma; DG = diagnóstico de gestación.

**Tabla 33: Características de las dosis de espermatozoides congelado-descongelado empleadas en la espermatización manual vía cervical de las cabras sincronizadas y resultados del diagnóstico de gestación a los 25 días (Continuación).**

MACHO	FECHA	DOSIS	VE	C	NEE	MT	MRP	N	I	DG
2	29/11/01	Precongelación	1,30	3372	4384	91,02	74,99	82,2	88,6	
		21291101T			125	77,66	48,37		55,1	-
		21291101G			125	44,42	34,89		63,4	-
1	19/12/01	Precongelación	0,90	4360	3924	90,44	59,74	84,9	92,1	
		20191201T			125	67,61	41,47		62,8	-
		20191201T			125	67,61	41,47		62,8	+
		20191201G			125	78,51	61,78		37,90	-
		20191201G			125	78,51	61,78		37,90	-

VE = volumen eyaculado; C = concentración espermática; NEE = número de espermatozoides por eyaculado/dosis; MT = movimiento total; MRP = movimiento rápido progresivo; N = morfología espermática; I = integridad de acrosoma; DG = diagnóstico de gestación.

**Tabla 34: Datos referentes a las espermatizaciones manuales realizadas con esperma congelado y resultados del diagnóstico de gestación a los 25 días.**

Nº CROTAL	FECHA DOSIS	MACHO	DILUY	1ªEM	MC	R	LD	2ªEM	MC	R	LD	DG	DC(h)
121	07-feb-01	1	L	37:36:00	poco medio	poco	iu	60:26:00	no/abierto	mucho	ic prox.	1	12
163	13-feb-01	1	T	36:20:00	mucho espeso	medio	ic prox.	59:22:00	poco abierto	medio	ic distal.	1	30
176	07-feb-01	1	L	36:35:00	mucho	medio	ic prox.	59:35:00	no/abierto	no	iu	0	6
209	03-ene-01	2	T	36:04:00	mucho medio	poco	ic prox.	59:01:00	poco abierto	medio	ic prox.	0	12
213	13-feb-01	1	L	36:17:00	poco cerrado	poco	ic prox.	59:24:00	no/abierto	poco	ic prox.	0	36
811	03-ene-01	2	L	35:38:00	no/abierto	poco	ic distal.	59:38:00	no/abierto	no	ic distal.	1	6
832	08-feb-01	2	T	36:17:00	poco medio	medio	ic prox.	59:19:00	no/abierto	no	ic prox.	1	12
880	14-feb-01	2	L	36:04:00	poco abierto	medio	ic prox.	61:54:00	poco abierto	no	ic prox.	1	24
901	14-feb-01	2	T	35:50:00	mucho abierto	medio	ic prox.	58:55:00	poco abierto	no	ic prox.	1	
909	08-feb-01	2	L	36:22:00	mucho abierto	medio	ic prox.	59:35:00	espeso cerrado	poco	ic prox.	0	
4	20-sep-01	1	L	36:26:00	poco abierto	no	ic prox.	60:14:00	no cerrado	mucho	ic prox.	1	
141	18-oct-01	2	L	36:58:00	poco abierto	medio	ic prox.	60:49:00	poco medio	poco	ic prox.	0	36
147	20-sep-01	1	T	38:20:00	poco abierto	medio	ic distal.	61:22:00	poco cerrado	poco	ic prox.	0	12
156	16-oct-01	1	L	36:43:00	poco abierto	no	ic distal.	60:33:00	poco abierto	poco	ic distal.	1	24

Diluy = diluyente; 1ªEM= intervalo retirada esponjas y 1ª espermatización manual; 2ªEM= intervalo retirada esponjas y 2ª espermatización manual; MC= presencia de moco en el fondo de vagina y características del cuello; R= reflujo de esperma; LD= lugar de depósito del esperma; hCG = gonadotropina coriónica humana; DG= diagnóstico de gestación; DC= duración del celo; ic = intracervical; iu = intrauterino; prox = proximal.

**Tabla 34: Datos referentes a las espermatizaciones manuales realizadas con espermatozoides congelados y resultados del diagnóstico de gestación a los 25 días (Continuación).**

Nº CROTAL	FECHA DOSIS	MACHO	DILUY	1ªEM	MC	R	LD	2ªEM	MC	R	LD	DG	DC(h)
167	26-sep-01	2	L	37:36:00	no/abierto	no	ic distal.	61:28:00	no/medio	poco	ic prox.	1	24
179	20-sep-01	1	T	36:12:00	poco abierto	poco	ic prox.	59:57:00	poco abierto	no	ic distal.	0	30
180	20-abr-01	1	L	35:35:00	poco medio	medio	ic distal.	59:19:00	poco cerrado	poco	ic prox.	1	42
188	12-sep-01	2	L	37:25:00	poco cerrado	medio	ic prox.	61:14:00	turbio cerrado	mucho	ic prox.	1	36
198	12-sep-01	2	T	36:26:00	poc/cerrad	no	ic prox.	60:07:00	no/cerrad	no	ic prox.	0	24
216	22-mar-01	1	L	36:07:00	no/abierto	poco	ic prox.	59:54:00	turbio cerrado	medio	ic prox.	1	12
803	16-oct-01	1	L	36:18:00	poco abierto	no	iu	60:08:00	turbio abierto	no	ic prox.	1	36
810	22-mar-01	1	T	38:12:00	poco abierto	mucho	ic prox.	61:22:00	poco abierto	mucho	ic prox.	1	30
837	16-oct-01	1	T	38:15:00	poco abierto	no	ic prox.	61:25:00	poco abierto	mucho	ic distal.	0	24
878	26-sep-01	2	T	36:22:00	poco cerrado	medio	ic prox.	60:13:00	no/abierto	mucho	ic prox.	0	24
929	18-oct-01	2	T	37:06:00	poco cerrado	mucho	ic prox.	60:56:00	no cerrado	medio	ic prox.	0	24
942	16-oct-01	1	T	38:33:00	poco cerrado	poco	ic prox.	61:46:00	no cerrado	no	ic prox.	0	24
291	07-nov-01	2	T	35:50:00	poco cerrado	no	ic prox.	59:40:00	poco cerrado	poco	ic prox.	1	24

Diluy = diluyente; 1ªEM= intervalo retirada esponjas y 1ª espermatización manual; 2ªEM= intervalo retirada esponjas y 2ª espermatización manual; MC= presencia de moco en el fondo de vagina y características del cuello; R= reflujo de espermatozoides; LD= lugar de depósito del espermatozoides; hCG = gonadotropina coriónica humana; DG= diagnóstico de gestación; DC= duración del celo; ic = intracervical; iu = intrauterino; prox = proximal.

**Tabla 34: Datos referentes a las espermatizaciones manuales realizadas con espermatozoides congelados y resultados del diagnóstico de gestación a los 25 días (Continuación).**

Nº CROTAL	FECHA DOSIS	MACHO	DILUY	1ªEM	MC	R	LD	2ªEM	MC	R	LD	DG	DC(h)
306	07-nov-01	2	L	35:54:00	poco abierto	poco	ic prox.	59:40:00	no/medio	poco	ic prox.	0	24
811	07-nov-01	2	L	36:49:00	turbio cerrado	medio	ic prox.	60:38:00	mucho abierto	medio	ic prox.	1	12
832	07-nov-01	2	T	36:19:00	no/abierto	no	ic prox.	60:02:00	no/cerrad	poco	ic prox.	0	24
841	29-nov-01	2	T	36:28:00	no/cerrad	medio	ic prox.	60:13:00	no/cerrad	no	ic prox.	0	36
846	29-nov-01	2	L	36:50:00	turbio medio	medio	ic prox.	60:38:00	mucho cerrado	medio	ic prox.	0	30
901	19-dic-01	1	T	36:47:00	mucho medio	medio	ic prox.	60:35:00	poco abierto	poco	ic prox.	0	6
947	08-nov-01	2	T	35:43:00	poco abierto	poco	ic prox.	59:26:00	no/abierto	no	iu	1	30
952	22-nov-01	2	T	36:45:00	no/abierto	no	ic distal.	60:35:00	no/medio	poco	ic prox.	1	30
958	19-dic-01	1	L	36:32:00	poco abierto	poco	ic prox.	60:19:00	no/abierto	no	iu	0	
959	22-nov-01	2	L	35:32:00	turbio cerrado	poco	ic prox.	59:13:00	no/abierto	no	ic distal.	0	6
960	22-nov-01	2	L	35:37:00	no/abierto	medio	ic prox.	60:23:00	no/medio	poco	ic prox.	0	12
961	08-nov-01	2	L	36:13:00	no/medio	no	ic prox.	60:04:00	no/cerrad	mucho	ic prox.	0	24
2	19-dic-01	1	T	36:19:00	no/cerrad	no	ic prox.	60:06:00	no/cerrad	medio	ic prox.	1	30
18	19-dic-01	1	L	35:43:00	poco abierto	no	ic distal.	59:26:00	no/abierto	no	iu	0	12
28	22-nov-01	2	T	36:05:00	no/abierto	no	iu	59:47:00	denso medio	no	ic distal.	0	12

Diluy = diluyente; 1ªEM= intervalo retirada esponjas y 1ª espermatización manual; 2ªEM= intervalo retirada esponjas y 2ª espermatización manual; MC= presencia de moco en el fondo de vagina y características del cuello; R= reflujo de espermatozoides; LD= lugar de depósito del espermatozoides; hCG = gonadotropina coriónica humana; DG= diagnóstico de gestación; DC= duración del celo; ic = intracervical; iu = intrauterino; prox = proximal.

Tabla 35: Resultados de los partos de las cabras espermatisadas con espermatozoides congelados y duración de la gestación.

N° CROTAL	SEMENTAL	NP	FP	DG	NNAC	NVIV	OBSERV
0002	1	2	02/08/2001	147,5	1	1	
0004	1	2	23/03/2002	143,5	2	2	
0018	1	1					
121	1	5	02/08/2001	151,5	3	3	
147	1	5					
156	1	5	03/04/2002	154,5	1	1	
163	1	3					
176	1	4					
179	1	4					
180	1	5	28/03/2002	148,5	3	3	
213	1	4					
216	1	4	30/03/2002	150,5	1	0	
8003	1	3	29/03/2002	149,5	2	2	
8010	1	3	23/02/2002	115,5	2	0	aborto
8037	1	3	03/04/2002	154,5	4	2	
9001	1	2					
9042	1	1					
9058	1	1					
0028	2	1					
141	2	6					
167	2	5	31/03/2002	151,5	2	2	
188	2	5	04/04/2002	155,5	1	1	
198	2	4					
209	2	3					
291	2	3	22/07/2002	145,5	3	3	

NP= número de partos anteriores; FP= fecha del parto; DG= duración gestación; NNAC= número de nacidos; NVIV= número de nacidos vivos; OBSERV= observaciones.

Tabla 35: Resultados de los partos de las cabras espermatizadas con espermatozoides congelados y duración de la gestación (Continuación).

Nº CROTAL	SEMENTAL	NP	FP	DG	NNAC	NVIV	OBSERV
306	2	3					
8011	2	4	01/08/2002	155,5	1	1	
8032	2	2	04/08/2001	149,5	3	0	
8032	2	2					
8041	2	3					
8046	2	2					
8078	2	3					
8080	2	1					
9001	2	2	05/08/2001	151,5	2	2	
9009	2	2					
9029	2	2					
9047	2	2	28/07/2002	151,5	1	1	
9052	2	2	01/07/2002	124,5	2	0	aborto
9059	2	1					
9060	2	1					
9061	2	1					

NP= número de partos anteriores; FP= fecha del parto; DG= duración gestación; NNAC= número de nacidos; NVIV= número de nacidos vivos; OBSERV= observaciones.