



TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

Optimización del protocolo de congelación
del semen de caprino: efectos sobre la
calidad *in vitro*.

Alumna: Rosario Martín Montalbán
Tutor UCV: Ignacio Giménez Nebot
Co-tutora: Eva Mocé Cervera
Curso académico: 4º Biotecnología



GENERALITAT
VALENCIANA

ivia
Instituto Valenciano
de Investigaciones Agrarias



Facultad de Veterinaria
y Ciencias Experimentales
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir

AGRADECIMIENTOS

Mi etapa en la universidad ha sido un período de aprendizaje tanto a nivel académico como profesional. El camino no ha sido fácil y, por ello, me gustaría agradecer a las personas que han estado a mi lado durante esta etapa y que, gracias a ellos, he podido llegar hasta aquí.

A mi familia por estar a mi lado apoyándome y aconsejándome, dándome fuerzas para seguir y mostrándome su amor incondicional en cada momento.

A mis tutores Ignacio Giménez Nebot, tutor UCV, y Eva Mocé Cervera, tutora de las prácticas externas, por dirigir el proyecto, guiarme, ayudarme y aconsejarme a la hora de realizar este Trabajo.

Y, por último, al Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA) por darme la oportunidad de poder realizar las prácticas externas, así como al personal del Centro por el trato recibido durante la estancia.

ÍNDICE

Índice de figuras

Figura 1. Pasos en el protocolo de congelación del semen	9
Figura 2. Percepción gráfica de las velocidades del sistema CASA (Computer Assited Sperm Analysis)	16
Figura 3. Percepción gráfica de las velocidades de los espermatozoides móviles y progresivos a través del sistema CASA	16
Figura 4. Baño programable	21
Figura 5. Biocongelador pogramable	22
Figura 6. Biocongelador programable en funcionamiento	22
Figura 7. Biocongelador programable abierto	22
Figura 8. Vista interior del biocongelador programable	22
Figura 9. Citómetro de flujo	23
Figura 10. Sellado de las pajuelas con PVA	27
Figura 11. Sellado de las pajuelas con PVA en agua	27
Figura 12. Muestra de la curva de congelación utilizada para la congelación del semen caprino en un biocongelador programable	28
Figura 13. Clasificación de los espermatozoides en estáticos, lentos, medios y rápidos, según su velocidad media (VAP)	29
Figura 14. Percepción gráfica del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos con mitocondrias funcionales y no funcionales	33

Índice de tablas

Tabla 1. Composición de los diluyentes TCG y SM1, indicando los ingredientes, el peso molecular y la concentración de cada ingrediente	24
Tabla 2. Calidad del semen fresco de caprino (n = 13 eyaculados) procesado con y sin plasma seminal	36
Tabla 3. Calidad de los eyaculados de caprino (n = 13 eyaculados) congelados con y sin plasma seminal tras la incubación a 37°C durante 180 minutos después de la descongelación (análisis efectuados a 10, 90 y 180 minutos de incubación)	37
Tabla 4. Evolución de la calidad del semen de caprino (n = 13 eyaculados) congelado con y sin plasma seminal en incubación a 37°C después de la descongelación durante 180 minutos (interacción plasma seminal x tiempo de incubación)	40
Tabla 5. Calidad del semen de caprino (n = 2 eyaculados) procesado con o sin plasma seminal en las distintas etapas del protocolo previas a la congelación	42

RESUMEN**ABSTRACT**

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Inseminación artificial (IA)	1
1.2. Conservación del semen	3
1.2.1. Diluyentes seminales	3
1.2.2. Técnicas de conservación del semen	5
a. Conservación del semen refrigerado	5
b. Criopreservación	6
1.3. Etapas del proceso de congelación del semen caprino	8
a. Obtención del eyaculado y valoración de la calidad del semen fresco	9
b. Centrifugación y dilución con el primer diluyente de congelación	10
c. Enfriamiento a 4°C, dilución con el segundo diluyente, equilibrado, envasado y sellado	10
d. Congelación y almacenamiento	12
e. Descongelación	12
1.4. Importancia de los análisis para evaluar la calidad <i>in vitro</i> del semen	14
1.5. El efecto contradictorio del plasma seminal en caprino	17
2. OBJETIVO	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Plan de trabajo	20
3.2. Materiales	20
3.2.1. Reactivos de laboratorio	20
3.2.2. Equipos de laboratorio	21
3.2.3. Diluyentes	23
3.2.4. Animales	24
3.3. Métodos	25
3.3.1. Protocolo de extracción del semen	25
3.3.2. Protocolo de congelación y descongelación del semen	25
3.3.3. Análisis de la calidad seminal <i>in vitro</i>	28

3.3.3.1. Motilidad	29
3.3.3.2. Citometría de flujo	30
3.3.4. Diseño experimental	33
3.3.4.1. Experimento 1. Efecto del plasma seminal sobre la calidad <i>in vitro</i> de los espermatozoides de caprino tras la descongelación	33
3.3.4.2. Experimento 2. Efecto del plasma seminal sobre la calidad <i>in vitro</i> de los espermatozoides de caprino en las distintas etapas del protocolo previas a la congelación	34
3.3.5. Análisis estadístico	35
4. RESULTADOS	36
a. Experimento 1. Efecto del plasma seminal sobre la calidad <i>in vitro</i> de los espermatozoides de caprino tras la descongelación	36
b. Experimento 2. Efecto del plasma seminal sobre la calidad <i>in vitro</i> de los espermatozoides de caprino en las distintas etapas del protocolo previas a la congelación	41
5. DISCUSIÓN	44
6. CONCLUSIÓN	50
7. LÍNEAS FUTURAS	50
8. BIBLIOGRAFÍA Y WEBGRAFÍA	51

RESUMEN

La inseminación artificial (IA) es una técnica de reproducción asistida empleada en programas de mejora genética del ganado. En ella, se utiliza semen refrigerado o congelado. El plasma seminal de la especie caprina contiene enzimas que metabolizan algunos componentes de los diluyentes seminales, dando lugar a metabolitos tóxicos que afectan a la calidad espermática. Por ello, se recomienda la eliminación del plasma seminal en los protocolos de congelación del semen de esta especie. Así pues, el objetivo del trabajo fue estudiar el efecto del plasma seminal sobre la calidad espermática tras el proceso de congelación y descongelación en semen de caprino.

En este proyecto se analizaron 15 eyaculados de 10 machos de raza Murciano-Granadina y se realizó un análisis de la calidad seminal *in vitro* tanto en semen fresco como descongelado. Para ello, se utilizaron el sistema CASA y la técnica de citometría de flujo. Se realizaron dos experimentos, en el primero se estudió el efecto del plasma seminal sobre la calidad *in vitro* de los espermatozoides de caprino tras la descongelación y en el segundo se estudió el efecto del plasma seminal en las distintas etapas del protocolo de congelación, previas a la propia congelación.

Tras analizar los resultados, se observó que la calidad espermática disminuía en las muestras procesadas con plasma seminal tras el proceso de congelación-descongelación. En el segundo experimento se observó que la calidad de las muestras procesadas con plasma seminal disminuía drásticamente tras la etapa de adición del glicerol, aunque el tamaño muestral fue muy pequeño.

Por tanto, el plasma seminal es perjudicial para la congelación del semen en la especie caprina y los daños ya se observan antes de la congelación, en concreto, tras la adición del glicerol, aunque esto debe corroborarse en el futuro mediante el procesado de un mayor número de muestras.

Palabras clave: Plasma seminal, caprino, sistema CASA, citometría de flujo, glicerol, crioconservación.

ABSTRACT

Artificial insemination (AI) is an assisted reproductive technique used in livestock breeding programs. Refrigerated or frozen semen are used in AI. The seminal plasma (SP) from goat bucks contains enzymes that metabolize some components of the semen extenders giving rise to toxic metabolites that affect sperm quality. Therefore, the elimination of SP is recommended in the sperm freezing protocols of this species. Thus, the objective of the project was to study the effect of SP on sperm quality after the freezing and thawing process in goat semen.

In this project, 15 ejaculates from 10 males of the Murciano-Granadina breed were used and seminal *in vitro* quality in both fresh and thawed semen was analyzed by CASA system and flow cytometry. Two experiments were carried out: in the first experiment, the effect of SP on the *in vitro* quality of goat sperm after thawing was studied while in the second experiment the effect of SP in the different stages of the freezing protocol, prior to the freeze itself, was determined.

The results showed that the sperm quality decreased in the samples processed with SP after the freeze-thaw process. In the second experiment, it was observed that the quality of the samples processed with SP decreased dramatically after the glycerol addition step, although the sample size was very small.

Therefore, seminal plasma is harmful to the freezing of semen in the goat species and the damages are already observed before freezing, specifically, after the glycerol addition, although this should be corroborated in the future by the analysis of greater number of samples.

Keywords: seminal plasma, goat, CASA system, flow cytometry, glycerol, cryopreservation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Inseminación artificial (IA)

La cabra (*Capra aegagrus hircus*) es un mamífero rumiante, perteneciente a la familia Bovidae y a la subfamilia Capridae. Existen nueve especies del género *Capra*. El ganado caprino ha sido explotado tradicionalmente para la producción de leche, carne, quesos, pieles e incluso, como subproducto, el estiércol producido por esta especie. En España el censo de caprino en el año 2018 fue de alrededor de 2,76 millones de cabezas, representando el 16% del censo total de caprino lechero de UE-28 en el año 2017, solo superada por Grecia. Con una producción de 533 millones de litros en el año 2018 que suponen un valor de alrededor de 323 millones de euros, España es el segundo país de la Unión Europea (UE) y el octavo país a nivel mundial en producción de leche de la especie caprina. Así pues, España es el segundo país de la UE en producción de queso caprino, por detrás de Francia, ocupando el quinto puesto a nivel mundial. La producción de leche de cabra en España es de 530 kg por lactación de cabra lechera y el consumo de queso de cabra en España es de 0,285 kg por habitante/año (Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, 2020).

La IA es una técnica de reproducción asistida empleada en los programas de mejora genética en ganadería. En España, un porcentaje menor al 1% de las gestaciones en cabras de aptitud lechera se obtienen mediante IA (Lopez-Sebastián et al., 2014), utilizándose para ello semen refrigerado o congelado. No obstante, es una técnica cada vez más presente, sobre todo en ganado caprino lechero, ya que es una herramienta útil para el correcto avance de los programas de mejora genética. La IA ha sido una de las técnicas más utilizadas en la reproducción animal (López-Gatiús, 2012). Está asociada al uso de otras técnicas de reproducción asistida, como son las técnicas de extracción de semen y posterior conservación del mismo. Por tanto, la IA depende del desarrollo de estas dos técnicas para poder llevarse a cabo.

La técnica de IA es posible debido a la utilización de machos cabríos. Sin embargo, tiene como objetivo seleccionar aquellos machos que tengan un mayor valor genético para uno o varios caracteres y que produzcan espermatozoides capaces de gestar hembras. La IA es la vía utilizada para propagar los caracteres genéticos seleccionados en la población de destino (Mocé et al., 2019). Mediante los programas de mejora genética

los ganaderos han ampliado sus perspectivas de futuro al mejorar la producción de sus rebaños (Cortés Gallego, 2003) y así obtener animales cuyas producciones (leche, carne, queso, pieles) se ajusten a los requisitos ambientales y de mercado (Amoah & Gelaye, 1997). Su uso en programas de mejora genética permite aprovechar el potencial reproductivo de los machos cabríos, aumentando el número de descendientes por macho de una manera más efectiva, rentable y en menor tiempo. A través de esta técnica es posible distribuir de una manera más eficaz el semen de los machos mediante el reparto de dosis seminales en explotaciones ganaderas con garantías sanitarias, obteniéndose así animales mejorados genéticamente (Leboeuf et al., 2008).

Resulta complejo atribuir las ventajas e inconvenientes de la IA, únicamente a la técnica de inseminación, al ir íntimamente ligada a las dos técnicas mencionadas anteriormente: técnica de extracción de semen y técnica de conservación de semen.

La IA es una técnica que permite mejorar los aspectos zootécnicos, así como la obtención de razas puras y nuevas de gran interés, también previene el contagio de enfermedades venéreas. Otras ventajas que presenta la IA son reducir el coste en machos y resolver los problemas debidos a machos reacios o inactivos a apareamientos (Alcántara Huete & Espinoza Granados, 1999).

Por otra parte, existe una serie de factores que afectan a la técnica de extracción de semen como son los factores ambientales, de nutrición y de manejo. Estos factores pueden afectar negativamente al resultado de fertilidad de las dosis seminales de IA. Por ello, las dosis utilizadas para inseminar cabras deben superar una serie de análisis en el laboratorio que garanticen una percepción de la capacidad fecundante. El uso de esta técnica presenta un riesgo relacionado con el estatus sanitario de los sementales ya que si los machos presentan enfermedades y estas no son controladas, existiría riesgo de diseminar esas enfermedades (Thibier & Guerin, 2000). Además, el manejo del semen en el laboratorio y la técnica de inseminación deben realizarse de forma higiénica y cuidadosa para evitar dañar el tracto reproductivo de las hembras y propagar enfermedades (Leboeuf et al., 2000). Asimismo, se trata de una técnica que precisa de personal y equipos especializados para llevarse a cabo (Alcántara Huete & Espinoza Granados, 1999).

1.2. Conservación del semen

Para la inseminación artificial se utiliza el semen de machos caprinos mejorantes, estos tienen un mayor valor genético para uno o varios caracteres, y de machos en testaje o en prueba de los que todavía no se ha evaluado su valor genético con suficiente certeza debido a que no se ha realizado un número suficiente de inseminaciones. Estos machos se encuentran alojados en centros de sementales. Desde los centros de sementales se pueden expedir dosis de semen fresco, refrigerado o congelado (Palomino et al., 2007).

Con las técnicas de recuperación de semen e inseminación artificial se puede incrementar el número de hembras inseminadas por eyaculado. Sin embargo, el tiempo de vida útil del semen de la especie caprina una vez extraído es corto, disminuyendo su fertilidad a partir de las 2-3 horas. Por ello, el semen en fresco debe utilizarse una vez extraído, ya que la motilidad y viabilidad de los espermatozoides disminuyen conforme aumenta el tiempo de conservación (Palomino et al., 2007). Para evitar este problema, se han desarrollado diluyentes y técnicas que permiten alargar la viabilidad de la célula espermática por un periodo limitado de tiempo si hablamos de refrigeración o indefinidamente si hablamos de congelación (Cortés Gallego, 2003).

1.2.1. Diluyentes seminales

La finalidad de un diluyente seminal es suministrar energía a los espermatozoides, protegerlos de daños relacionados con la temperatura y mantener un ambiente adecuado para que los espermatozoides sobrevivan temporalmente (Purdy, 2005). La composición de los diluyentes utilizados para la refrigeración de semen es similar desde el punto de vista químico y de pH a los empleados para la congelación de semen. Normalmente se diferencian en el uso de crioprotectores permeables (glicerol, normalmente) y no permeables (rafinosa, trehalosa, etc) cuando el propósito es la congelación del semen (Mocé, 2012).

En todo caso, los diluyentes empleados han de cumplir una serie de requisitos como (1) ser isotónico, es decir, tener la misma presión osmótica que el plasma seminal, cuando se utiliza en refrigeración e hiperosmótico en congelación; (2) tener capacidad tampón para mantener un pH neutro; (3) contener moléculas que protejan a los espermatozoides de la congelación clasificadas en sustancias crioprotectoras permeables y no permeables, según su capacidad de atravesar la membrana plasmática; (4) poseer una

fuentes de energía como son la glucosa y fructosa; (5) tener capacidad bacteriostática, por lo que se utilizan antibióticos y (6) aumentar el volumen con la finalidad de facilitar el manejo de cantidades pequeñas de espermatozoides. También deben proteger la viabilidad espermática a una temperatura de 15°C o 5°C durante un mínimo de 6 horas (Cortés Gallego, 2003).

Dentro de los componentes de los diluyentes, los azúcares (glucosa y fructosa) ejercen un efecto positivo sobre la viabilidad espermática aportando energía al espermatozoide, y las proteínas de la leche desnatada y yema de huevo ayudan a mantener el equilibrio osmótico (Cortés Gallego, 2003).

La función específica del azúcar determina su elección como componente de un diluyente. La fructosa es el sustrato primario en plasma seminal caprino, cuya función es realizar la glucólisis (Pellicer-Rubio et al., 1997). Asimismo, la glucosa es un sustrato excelente en el metabolismo de los espermatozoides de la especie caprina y es esencial para proporcionar energía para que las células espermáticas funcionen de manera normal (Fukuhara & Nishikawa, 1973). Ambos azúcares son moléculas de bajo peso molecular, por lo que pueden atravesar la membrana plasmática de los espermatozoides. Hay azúcares, que se añaden a los diluyentes de congelación, que no son capaces de atravesar la membrana plasmática como son la lactosa, sacarosa, rafinosa, trehalosa o dextranos pero, al agregarlos al diluyente, se crea una presión osmótica produciendo la deshidratación celular y, por tanto, una menor formación de hielo intracelular, así como una interacción con los fosfolípidos de la membrana, reorganizando la membrana de forma que los espermatozoides sobrevivan al proceso de criopreservación (Aisen et al., 2002). La inserción de estos disacáridos en la membrana limita la deshidratación y, en consecuencia, limita el daño físico debido a los cambios en el volumen celular asociados con la congelación y descongelación (Cortés Gallego, 2003). Por tanto, al agregarlos en el diluyente, el daño celular es minimizado debido a una menor formación de hielo intracelular y, en consecuencia, se recupera un mayor número de células viables tras la criopreservación (Aboagla & Terada, 2003).

Los crioprotectores no permeables más utilizados son la yema de huevo y la leche desnatada. Las proteínas de la leche desnatada y yema de huevo actúan extracelularmente modificando la membrana plasmática y protegiéndola de los daños provocados por las bajas temperaturas, además de actuar como soluto disminuyendo la temperatura de congelación del medio. La yema de huevo ha sido utilizada durante años en los diluyentes para congelar semen (Salomon & Maxwell, 2000), ya que

presenta cualidades favorables para la criopreservación espermática en especies rumiantes (Tonieto et al., 2010). Sin embargo, presenta variabilidad en la composición entre lotes de huevos y riesgo de contaminación microbiológica (García et al., 2013), además de que en algunos estudios se ha observado que el semen diluido con yema de huevo presenta resultados variables y pésimos en fertilidad (Leboeuf et al., 2000). En cambio, otros estudios obtienen resultados óptimos al emplear semen diluido con leche desnatada (Konyali et al., 2013) y por este motivo, los diluyentes con leche desnatada son ampliamente utilizados en ganado caprino.

Tal y como se ha indicado previamente, los crioprotectores permeables (glicerol, DMSO, metanol, etc) son imprescindibles en los diluyentes de congelación. Estos penetran en la célula disminuyendo el agua extracelular e intracelular, produciendo así la deshidratación de las células espermáticas. Al haber menos cantidad de agua intracelular, el punto de congelación disminuye evitando la formación de hielo, de forma que no se produce la muerte celular ni la disminución de fertilidad de la muestra de semen. Los crioprotectores permeables también estabilizan las membranas lipídicas a través de enlaces de hidrógeno con los grupos polares de la cabeza de los lípidos de membrana, provocando así un aumento de la fluidez de la membrana de las células espermáticas en condiciones deshidratadas y, por tanto, una mayor capacidad para sobrevivir a la criopreservación (Holt, 2000).

Dentro de los crioprotectores permeables, el más utilizado es el glicerol. Varios trabajos han demostrado que el glicerol es más eficaz para la congelación del semen de caprino que otros crioprotectores como el DMSO, obteniéndose un mayor porcentaje de espermatozoides móviles tras la descongelación (31-35% y 15-21% para el glicerol y el DMSO, respectivamente; Kundu et al., 2000; Kundu et al., 2001).

1.2.2. Técnicas de conservación del semen

a. Conservación del semen refrigerado

La refrigeración, asociada al uso de diluyentes adecuados, aumenta el tiempo de conservación del semen debido a que, al disminuir la temperatura de conservación se consigue reducir la tasa metabólica de los espermatozoides. La técnica de refrigeración implica un descenso suave y progresivo de temperatura del eyaculado desde los 20-30°C hasta los 4-5°C, siendo esta última la temperatura de conservación. El proceso de refrigeración del semen a 5°C produce un ahorro de reservas energéticas en las células

espermáticas, disminuyendo así el metabolismo de los espermatozoides, y la adición de compuestos orgánicos como son la yema de huevo o la leche desnatada protege a las células de los efectos de las bajas temperaturas. Estos compuestos orgánicos actúan extracelularmente ya que, debido a su alto peso molecular, no pueden atravesar la membrana plasmática (Salomon & Maxwell, 1995).

Las dosis seminales refrigeradas a 4-5°C deben utilizarse en un determinado tiempo, ya que los espermatozoides de caprino conservados en estado líquido sufren un deterioro rápido, disminuyendo su fertilidad a partir de las 12-24 horas (Leboeuf et al., 2000) aunque otros autores observaron que este plazo es todavía menor (6-10 horas; Cortés Gallego, 2003). De hecho, la mayoría de las inseminaciones realizadas con semen refrigerado se realizan en un plazo de 5-8 horas. Este reducido tiempo limita la distancia a la que pueden ser utilizadas las dosis seminales. Además, supone un problema en los programas de mejora genética nacionales de caprino, dificultando así las conexiones entre rebaños alejados de los centros de sementales (Leboeuf et al., 2008).

b. Criopreservación

En el caso de la congelación de semen, los primeros estudios datan del siglo XVIII, aunque no fue hasta mediados del siglo XX cuando se produjo el desarrollo de la tecnología de crioconservación del semen. Esto fue debido al descubrimiento, por parte de Polge, Smith y Parkes en 1949, del glicerol como crioprotector eficaz para la congelación del semen en algunas especies. Desde entonces son numerosos los investigadores que han trabajado a lo largo de los años para intentar desarrollar y mejorar los protocolos de congelación del semen.

Las dosis seminales congeladas pueden conservarse indefinidamente y, por ello, se pueden utilizar en ganaderías alejadas de los centros de producción de estas dosis. La congelación del semen es imprescindible para conservar razas que se encuentran en peligro de extinción, para conservar semen obtenido de machos mejorantes y, también, para comercio internacional e intracomunitario de dosis de IA. Sin embargo, el proceso de congelación tiene efectos perjudiciales en los espermatozoides, afectando a su calidad *in vitro* (motilidad, viabilidad, etc) y a su capacidad fecundante (Salomon & Maxwell, 2000).

Se ha observado que tras el proceso de crioconservación y descongelación, aproximadamente, el 50% de los espermatozoides resultan dañados/muertos y, respecto al 50% restante de vivos, solo el 10% de los espermatozoides funcionan

correctamente. Aunque tras el proceso de congelación se espera obtener espermatozoides funcionalmente similares a los espermatozoides recién eyaculados, la realidad es que los espermatozoides congelados-descongelados de mamíferos se encuentran en un estado avanzado de capacitación (Mocé, 2012). Los resultados de fertilidad obtenidos con semen congelado son siempre inferiores a los observados en semen refrigerado, aunque varían en función de la composición del diluyente, calidad inicial del semen, tratamiento del mismo, lugar de deposición de la dosis, momento de inseminación, estación del año y raza (Cortés Gallego, 2003). Por este motivo, solo en el 15% de las inseminaciones se utiliza semen congelado, ya que presenta un 35-38% de fertilidad, resultado inferior al del semen fresco o refrigerado que presentan un 55-65% de fertilidad (Contreras-Gómez, 2018).

Para poder llevar a cabo la conservación del semen se tienen que cumplir unos valores mínimos de calidad seminal como son el volumen, movilidad y concentración (Cortés Gallego, 2003). La congelación del semen, como técnica de conservación, facilita el uso de dosis seminales independientemente del año en que hayan sido obtenidas y permite conservar la capacidad fecundante de las dosis por tiempo indefinido, separando de ese modo el momento de extracción del semen y producción de dosis seminales con el momento de uso de las mismas (Cortés Gallego, 2003). Asimismo, este tipo de conservación del semen permite realizar analíticas adecuadas, descartando así los seminales asintomáticos portadores de enfermedades y dando lugar a dosis seminales más seguras desde el punto de vista sanitario (Mocé et al., 2019).

1.3. Etapas del proceso de congelación del semen caprino

En los procesos de congelación del semen, los espermatozoides son finalmente almacenados en tanques con nitrógeno líquido (-196°C). A esta temperatura el metabolismo celular se encuentra inhibido, es decir, no es posible la existencia de reacciones químicas.

Para la congelación del semen caprino se utilizan los protocolos de congelación lenta. En ellos, las velocidades de congelación son lentas y, por ello, el agua extracelular solidifica en cristales de hielo conforme disminuye la temperatura, creando dos fases: cristales de hielo de agua pura y una fracción no congelada en la que coexisten agua líquida, sales, azúcares, crioprotectores y espermatozoides (Hammerstedt et al., 1990).

Durante el proceso de congelación, los espermatozoides son expuestos a cambios de temperatura que provocan alteraciones en la estructura de la membrana, ya que los fosfolípidos que componen la bicapa lipídica de los espermatozoides sufren un cambio de fase de estado líquido a estado gel. Además, la pérdida de agua en forma de hielo incrementa la presión osmótica de la solución en la fracción de agua todavía líquida, provocando daños osmóticos en los espermatozoides (Watson, 1995). Debido a que los espermatozoides carecen de la capacidad de adaptación a bajas temperaturas, se debe añadir a los diluyentes algunos ingredientes como yema de huevo, leche desnatada o glicerol, ayudándoles a sobrevivir en estas condiciones de hipotermia (Purdy, 2005).

El protocolo de congelación del semen caprino consta de varios pasos (*Figura 1*) que, a continuación, se describirán en detalle.



Figura 1. Pasos en el protocolo de congelación del semen. Fuente: adaptación de (Mocé, 2012).

Los protocolos de congelación del semen comienzan con la obtención del eyaculado y la valoración de su calidad. A continuación, se suele eliminar el plasma seminal antes de añadir el primer diluyente de congelación que carece de crioprotector permeable y comienza la fase de enfriamiento a 4°C. Una vez alcanzada la temperatura de 4°C, se añade el segundo diluyente que contiene crioprotector permeable y se deja equilibrar con este diluyente durante un periodo variable. Seguidamente, se envasa el semen en pajuelas y se sellan los envases. Por último, el semen envasado es congelado en vapores de nitrógeno líquido y, posteriormente, es almacenado hasta su descongelación.

a. Obtención del eyaculado y valoración de la calidad del semen fresco

El eyaculado de un macho cabrío está formado por espermatozoides y plasma seminal (Cortés Gallego, 2003). El plasma seminal transporta a los espermatozoides desde el sistema reproductor del macho hasta el tracto genital de la hembra. Se trata de un fluido isoosmótico, tiene la misma presión osmótica que la sangre, y está compuesto por un 75% de agua, fructosa, sorbitol, fosfolípidos, ácido cítrico, prostaglandinas, inositol, enzimas y proteínas, además de iones inorgánicos como sodio, potasio y cloro (Iritani & Nishikawa, 1964).

El semen puede obtenerse por diferentes métodos: post-coital, electroeyaculación, vagina artificial o post-mortem (Cortés Gallego, 2003), aunque el más utilizado es el método de extracción mediante vagina artificial. Tras obtenerlo, se hace una primera valoración de los eyaculados obtenidos para descartar aquellos que presenten baja calidad seminal. El protocolo de congelación siempre empeora la calidad seminal, por lo que es necesario hacer una selección inicial del semen. No obstante, una buena calidad del semen fresco no garantiza una buena calidad después de la descongelación, debido a las diferencias entre machos en la resistencia al proceso de congelación (Holt, 2000).

b. Centrifugación y dilución con el primer diluyente de congelación

En los años '70 se demostró que el plasma seminal de caprino tenía un efecto perjudicial sobre la calidad del semen congelado (Corteel & Baril, 1974). Es por este motivo por el que se recomienda su eliminación previamente a la adición de los diluyentes de congelación.

Una vez eliminado el plasma seminal a través de centrifugación y retirado el sobrenadante, se añade el primer diluyente de congelación que contiene yema de huevo o leche desnatada que protegen a los espermatozoides durante el descenso de temperatura a 4°C pero suele carecer del crioprotector permeable (glicerol, en muchas ocasiones) (Mocé, 2012).

La dilución con el primer diluyente se realiza a temperatura ambiente. Es importante que el material y el diluyente utilizados se encuentren a una temperatura similar a la del semen para evitar choques térmicos.

c. Enfriamiento a 4°C, dilución con el segundo diluyente, equilibrado, envasado y sellado

Cuando la temperatura desciende bruscamente, desde temperatura corporal a 4°C, se producen daños en los espermatozoides como son la pérdida de motilidad, daños en los acrosomas o torsiones en el flagelo, entre otros. La sensibilidad de los espermatozoides al descenso de temperatura depende de la composición de la membrana plasmática, siendo dos los parámetros que determinan la susceptibilidad de los espermatozoides a las bajas temperaturas: el ratio de colesterol:fosfolípidos (C:F) y el ratio de ácidos grasos polinsaturados:ácidos grasos saturados unidos a los fosfolípidos de la membrana (PUFA:SFA) (Mocé, 2012).

Para evitar o minimizar los daños que se producen en los espermatozoides por hipotermia, además de las sustancias protectoras incluidas en los diluyentes, el descenso de temperatura a 4°C se realiza lentamente durante 60 o 120 minutos. Este descenso lento de la temperatura se consigue sumergiendo los tubos con el semen en baños de agua a temperatura similar a la del semen diluido e introduciendo estos tubos en una cámara a 4°C o bien mediante el uso de baños de agua programables que permiten realizar del descenso de la temperatura a una velocidad determinada (Mocé, 2012).

Cuando las muestras han alcanzado la temperatura de 4°C se añade el segundo diluyente, que contiene el crioprotector permeable. Estos crioprotectores ejercen su efecto de proteger las células durante la congelación tanto a nivel intracelular como extracelular, ya que disminuyen la concentración de sal en el fluido extracelular e incrementan el porcentaje de fracción de agua no congelada a cualquier temperatura (Amann & Pickett, 1987). Aunque pueden atravesar la membrana plasmática, la atraviesan a menor velocidad que el agua y, por ello, provocan choques osmóticos en los espermatozoides. Cada vez que se añaden o eliminan los crioprotectores, los espermatozoides sufren cambios de volumen, aumentando o disminuyendo el volumen, y estos cambios pueden ser potencialmente dañinos si los espermatozoides sobrepasan sus límites de resistencia osmótica. Para evitar dañar a los espermatozoides durante la adición del crioprotector, el segundo diluyente se añade en varios pasos evitando que los espermatozoides sufran choques osmóticos y permitiendo así su adaptación progresiva a las nuevas condiciones osmóticas (Gao et al., 1997).

Una vez añadido el segundo diluyente en varios pasos, se dejan equilibrar las muestras durante un periodo de tiempo variable, desde 10-15 minutos hasta 2 horas o más. Esta fase de equilibrado es necesaria para que se produzcan cambios protectores en la membrana (Gao et al., 1997). A continuación, el semen se envasa. Para ello, se suelen utilizar pajuelas de plástico de 0,25 o 0,5 mL. Para el sellado de las pajuelas se puede utilizar polivinil alcohol (PVA), bolas de sellado de vidrio o metal, plastilina o pueden ser selladas por calor o ultrasonidos. Siempre se deja una burbuja de aire entre el semen y el sellador utilizado para evitar que se produzca una sobrepresión en las pajuelas por efecto de la congelación y descongelación (Mocé, 2012).

d. Congelación y almacenamiento

Actualmente, el semen es congelado en vapor de nitrógeno líquido. Para la congelación, las pajuelas se colocan en gradillas y la congelación se puede realizar en cajas de porexpán o en congeladores programables.

Para la congelación en cajas de porexpán, las gradillas son suspendidas a una altura variable sobre la superficie del nitrógeno líquido y el recipiente se cierra evitando la evaporación del vapor de nitrógeno. Cuanto más cerca del nitrógeno líquido se coloque la gradilla, mayor será la velocidad de congelación. En general, las pajuelas son suspendidas sobre el vapor del nitrógeno líquido alrededor de 5-20 minutos (Purdy, 2005). Una vez transcurrido el tiempo de congelación, las pajuelas son depositadas en los tanques de nitrógeno líquido y allí son almacenadas hasta su uso (Leboeuf et al., 2000; Purdy, 2005).

En el caso de los congeladores programables, el congelador está conectado a un contenedor con nitrógeno líquido y a una unidad de control que, en función de la curva de congelación programada, inyecta vapor de nitrógeno líquido dentro del arcón de congelación donde se colocan las pajuelas. Una vez que el programa ha terminado y se han congelado las pajuelas, estas son almacenadas en tanques de nitrógeno líquido hasta su posterior uso (Blash et al., 2000).

Los dos protocolos de congelación son eficaces. La congelación en cajas de porexpán es más barata y se utiliza más en laboratorios con equipamiento limitado o cuando se tienen que realizar congelaciones en lugares con escasos medios. No obstante, los congeladores programables permiten utilizar curvas de congelación más adecuadas, ya que se pueden establecer diferentes velocidades de congelación por tramos de temperatura (Purdy, 2005) y, además, permiten congelar un número elevado de pajuelas al mismo tiempo. Por otra parte, los programas de congelación también permiten guardar las curvas de congelación reales de cada sesión, permitiendo de esa manera una mejor trazabilidad del producto final.

e. Descongelación

La descongelación se realiza en baños de agua a 37-38°C, generalmente durante 30 segundos. No obstante, se han descrito temperaturas de descongelación más altas (70 y 75°C) que permiten que la velocidad de descongelación sea mayor (7 y 10 segundos, respectivamente) (Leboeuf et al., 2000). En el caso de que se utilicen temperaturas

elevadas es necesario controlar muy bien el tiempo de descongelación para evitar que el contenido de la pajuela se sobrecaliente.

Previamente se ha indicado que el proceso de congelación-descongelación induce daños en los espermatozoides y que el producto final (semen descongelado) es siempre de menos calidad que el producto de partida (semen fresco). Por ello, es necesario valorar la calidad del semen tras la descongelación y así eliminar todas las pajuelas de los eyaculados que no presenten unos valores mínimos de calidad. Las pajuelas que presentan una calidad adecuada tras la descongelación pueden ser utilizadas en inseminaciones posteriormente (Mocé, 2012).

1.4. Importancia de los análisis para evaluar la calidad *in vitro* del semen

Desde el desarrollo y uso de la IA, se han realizado trabajos con la finalidad de conocer el potencial de fecundación de una muestra de semen. Sin embargo, el objetivo ha sido difícil de conseguir debido a que en la fertilidad final influyen multitud de factores que complican la capacidad de evaluar la fertilidad y el establecimiento de buenos modelos de predicción.

El espermatozoide es una célula compleja que debe poseer un conjunto de cualidades para fecundar: (1) motilidad; (2) mitocondrias activas para suministrar la energía necesaria para la motilidad; (3) membranas acrosómicas intactas capaces de sufrir cambios durante la capacitación permitiendo la reacción acrosómica en el momento en el que este se una a la zona pelúcida del óvulo; (4) receptores que permitan que el espermatozoide se una a la zona pelúcida y al oolema; (5) membranas plasmáticas que permiten la fusión con el oolema y (6) núcleo capaz de realizar una adecuada descondensación, reorganización nuclear y rendimiento genético para mantener el desarrollo del cigoto y embrionario (Graham & Mocé, 2005).

No obstante, la fertilidad no depende solo del macho donante de semen sino también de las hembras, así como del manejo que se realice tanto de las dosis de semen como de las hembras antes y después de la inseminación artificial. Las cabras deben encontrarse en estado óptimo de salud, tener una alimentación adecuada y factores ambientales favorables para que puedan ser capaces de producir, almacenar y ovular ovocitos normales y fecundables (Graham & Mocé, 2005).

La forma más adecuada de determinar la fertilidad de las muestras de semen es mediante los estudios de fertilidad *in vivo*. Para ello, es necesario realizar IA y determinar la fertilidad mediante la confirmación de gestación (2 semanas si se observan retornos a estro y 45 días mediante diagnóstico por ecografía en caprino) o bien a parto (5 meses después de la IA en caprino). No obstante, estos estudios son caros y los resultados no se obtienen de forma inmediata. Por ello, se han desarrollado técnicas para evaluar la calidad seminal *in vitro* que, si bien no permiten predecir la capacidad fecundante de las dosis seminales, sí permiten realizar una selección de las dosis a través del análisis de una serie de características o funcionalidades de los espermatozoides, evitando utilizar dosis que puedan presentar una fertilidad muy baja (Graham & Mocé, 2005).

La calidad del semen se determina a través de variables como la motilidad, viabilidad, concentración y morfología espermática (Hafez & Hafez, 2013), entre otras. Los análisis se pueden realizar de forma visual mediante la observación de los espermatozoides en un microscopio que, en ocasiones, conlleva cierto grado de subjetividad en las evaluaciones, o bien de forma automatizada que minimiza o, incluso, elimina la subjetividad de las analíticas. En este último caso se utilizan los sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) y la citometría de flujo (Graham & Mocé, 2005).

La técnica de citometría de flujo permite evaluar distintas estructuras de los espermatozoides mediante su marcaje con tinciones fluorescentes obteniendo los resultados en muy poco tiempo, además de detectar cambios en la intensidad de la fluorescencia que de forma visual no se observan. A través de marcadores fluorescentes se pueden conocer las características de cada célula como su estructura (superficie, citoplasma, mitocondria y núcleo), su tamaño y complejidad, obteniendo resultados específicos y sensibles (Barrera et al., 2004). La citometría, asociada al uso de fluorocromos, permite estudiar varias estructuras espermáticas a la vez en un gran número de células y en un breve espacio de tiempo. Por ello, su uso es cada vez mayor en los laboratorios de andrología, ya que cada vez se dispone de un mayor número de marcadores celulares y de unos equipos de citometría más avanzados que permiten la evaluación de múltiples estructuras simultáneamente sobre un mismo espermatozoide, mejorando con ello la capacidad de predicción del potencial fecundante de las muestras (Graham, 2001; Martínez-Pastor et al., 2010).

Para la evaluación de la motilidad de las muestras se utilizan los sistemas CASA que permiten cuantificar el movimiento de la muestra, obteniéndose el porcentaje de espermatozoides que son móviles o que presentan movilidad progresiva, así como cualificar la calidad de ese movimiento mediante la valoración de parámetros cinéticos. Esto se consigue colocando la muestra en cámaras y capturando los espermatozoides en movimiento en el microscopio con objetivos de contraste de fases con el fin de guardarlos como imágenes digitalizadas. Dentro de los parámetros cinéticos que se obtienen con estos sistemas se encuentran varias velocidades (*Figura 2*), varios ratios que evalúan la relación entre las velocidades y otros parámetros cinéticos. La velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$) es la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo, la velocidad lineal (VSL, $\mu\text{m/s}$) es la distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer punto y el último de su trayectoria y la velocidad media del trayecto (VAP, $\mu\text{m/s}$) es la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media. En cuanto a los ratios, el índice de linealidad (LIN, %)

es la relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la velocidad curvilínea ($LIN = VSL/VCL * 100$), el índice de rectitud ($STR, \%$) es la relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la velocidad lineal ($STR = VSL/VAP * 100$) y el índice de oscilación ($WOB, \%$) es la relación porcentual entre la velocidad media y la velocidad rectilínea ($WOB = VAP/VCL * 100$). Respecto a otros parámetros cinéticos, la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ($ALH, \mu m$) es el desplazamiento que efectúan las cabezas de los espermatozoides en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de su trayectoria media lineal y la frecuencia de batido (BCF, Hz) es la frecuencia con que la trayectoria curvilínea atraviesa la trayectoria lineal media en función del tiempo, todo ello sobre la población de móviles y sobre el total (móviles e inmóviles) (Fraser et al., 2001) (Figura 3).

Los análisis mediante citometría de flujo y el análisis de motilidad mediante los sistemas CASA son los más utilizados para evaluar la calidad de las dosis seminales debido a su rapidez y facilidad, respectivamente.

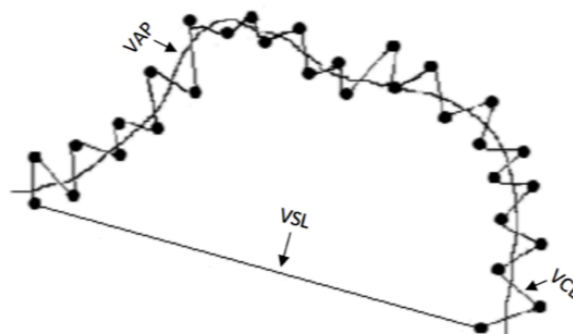


Figura 2. Percepción gráfica de las velocidades del sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). Fuente: (Contreras Gómez, 2018).

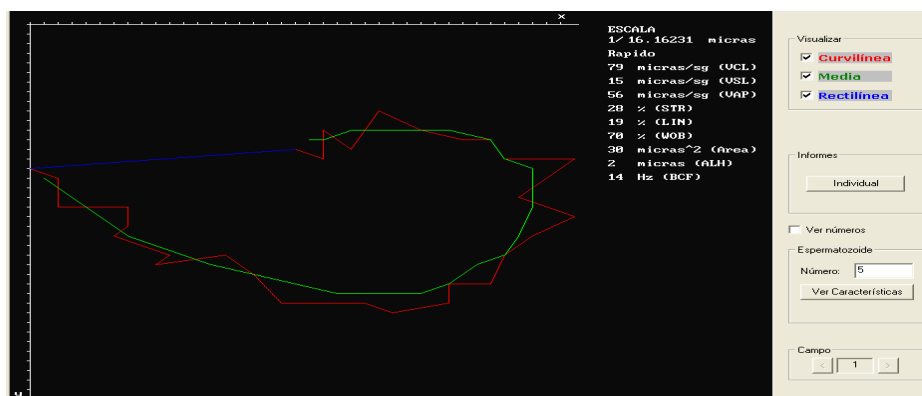


Figura 3. Percepción gráfica de las velocidades de los espermatozoides móviles y progresivos a través del sistema CASA. Fuente: elaboración propia.

1.5. El efecto contradictorio del plasma seminal en caprino

El plasma seminal no es solo un fluido necesario para que los espermatozoides puedan abandonar el tracto reproductivo de los machos durante la eyaculación, sino que es un fluido rico en componentes que facilitan la supervivencia de los espermatozoides y que participan en distintos procesos de señalización celular. El plasma seminal contiene fructosa, glucosa y lípidos que aportan energía a los espermatozoides (Lahnsteiner et al., 1993), además de haberse observado una relación de estos azúcares con la fertilidad (Willians & Ford, 2001). También contiene sustancias que proporcionan soporte a las células espermáticas, como sodio y potasio que estabilizan el balance osmótico y calcio, este último necesario para la estimulación de la esteroidogénesis (Cupps, 1991). Aparte de su interacción con los polisacáridos, fosfolípidos o lipoproteínas de la membrana plasmática, también contiene proteínas que reconocen los receptores de la membrana plasmática del espermatozoide y de la zona pelúcida (Mogielnicka-Brzozowska & Kordan, 2011). Por otra parte, también contiene una serie de enzimas como la lactato deshidrogenasa (LDH), la aspartato amino transferasa (AST) y la fosfatasa alcalina (ALP) que son esenciales para los procesos metabólicos que suministran energía para la motilidad, supervivencia y fertilidad de los espermatozoides (Rodríguez et al., 2016).

En caprino, además, el plasma seminal es rico en fosfatasa ácida y alcalina, ambas secretadas por la próstata, además de contener fosfolipasa A, producida en la glándula bulbouretral o de Cowper (Roy, 1957). La fosfolipasa A es una enzima capaz de producir la coagulación de la yema de huevo mediante la hidrólisis de las lecitinas de la yema de huevo dando lugar a lisolecitinas y ácidos grasos libres a través de la escisión de esta molécula. Estos productos resultantes provocan la inmovilización y muerte de los espermatozoides (Pellicer, 1996). La fosfolipasa A se activa en presencia de iones calcio y disminuye su acción con la presencia de citratos u oxalatos en el medio (Roy, 1957).

Por otra parte, el plasma seminal caprino también contiene una lipasa secretada por la glándula bulbouretral llamada BUS III. Esta lipasa actúa sobre los componentes de la leche desnatada hidrolizando los triglicéridos de la misma y dando lugar al ácido oleico, responsable del deterioro de los espermatozoides de la especie caprina diluidos en leche desnatada (Leboeuf et al., 2000).

Aunque existen diferencias en la composición del plasma seminal en función de la época del año en que se extraen los eyaculados, siendo más perjudicial el plasma seminal de

los eyaculados producidos en estación no reproductiva (Leboeuf et al., 2000), en varios estudios se constató que el efecto tóxico de la fosfolipasa A y la lipasa BUS III sobre los espermatozoides se reducía al eliminar el plasma seminal a través de una centrifugación (Pellicer, 1996). Así, la eliminación del plasma seminal mediante la centrifugación de los eyaculados inmediatamente después de su extracción y previamente a la dilución con el diluyente de conservación, provoca un incremento en el porcentaje de espermatozoides vivos y en la motilidad durante el tiempo de conservación cuando se utilizan diluyentes con yema de huevo o leche desnatada (Leboeuf et al, 2000).

Como se ha descrito previamente, tanto los diluyentes para preparar dosis de semen de caprino refrigeradas como congeladas contienen yema de huevo o leche desnatada. No obstante, la presencia de plasma seminal no afecta a la fertilidad de las dosis refrigeradas de caprino preparadas con estos diluyentes siempre que las dosis se inseminen en un plazo de 12-24 horas tras la extracción del semen (Leboeuf et al, 2000). Sin embargo, el plasma seminal es perjudicial en las dosis de semen congelado de esta especie (Corteel & Baril, 1974) y, por este motivo, el protocolo de congelación de semen incluye un paso de centrifugación antes de la adición de los diluyentes de congelación. No obstante, ninguno de los protocolos de congelación descritos en esta especie tiene una duración que supere el plazo de 12-24 horas en el que el plasma seminal no afecta a la fertilidad de las dosis de semen refrigerado.

Es necesario destacar que la eliminación del plasma seminal acarrea algunos perjuicios, ya que su eliminación también implica la eliminación de algunos de sus factores beneficiosos que son importantes estabilizadores del metabolismo espermático como son la fructosa, el ácido cítrico y el zinc, así como los factores decapacitantes, provocando con ello una capacitación prematura de los espermatozoides (Cortés Gallego, 2003).

Debido a la aparente contradicción entre el protocolo de refrigeración y congelación en cuanto al efecto del plasma seminal, está justificado revisar de nuevo el efecto del plasma seminal en el protocolo de congelación, puesto que el protocolo data de los años 70. Además, en el caso de que se confirme el efecto perjudicial del plasma seminal, todavía falta por determinar en cuál de las etapas del proceso previas a la congelación se producen esos daños.

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del plasma seminal sobre la calidad espermática tras el proceso de congelación y descongelación en semen de caprino y determinar en qué etapa del protocolo de congelación se producen los daños.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Plan de trabajo

El estudio se realizó durante los meses de enero a marzo del año 2020 en el Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA) del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) ubicado en Segorbe (Castellón).

3.2. Materiales

3.2.1. Reactivos de laboratorio

Los productos químicos empleados para la preparación de los medios fueron de grado reactivo (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Las tinciones fluorescentes empleadas fueron Mitotracker Deep Red FM (Invitrogen, Barcelona, España) y Yoduro de Propidio (PI), Hoechst 33342 y aglutinina de cacahuete marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA) (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se prepararon las siguientes soluciones madre de las tinciones: Hoechst 33342 (0,1 mg/mL en agua Mili-Q), Yoduro de Propidio (1 mg/mL en agua Mili-Q), FITC-PNA (1 mg/mL en agua Mili-Q) y Mitotracker Deep Red FM (1 mM en dimetil sulfóxido).

La tinción Hoechst 33342 penetraba en todas las células y se fijaba al ADN, diferenciando a los espermatozoides de otros eventos o artefactos de tamaño similar, era excitada con el láser de color violeta (405 nm) y la tinción presentaba un color violeta a simple vista. En cuanto a la tinción MitoTracker Deep Red FM, se acumulaba y teñía todas las mitocondrias indicando su correcta funcionalidad conforme aumentaba la intensidad de la tinción, era excitada con el láser de color rojo (638 nm) y presentaba un color rojo a simple vista. Respecto a la tinción de PI, al tratarse de una tinción vital, penetraba en la célula cuando presentaba la membrana plasmática dañada y se unía a los ácidos nucleicos, era excitada con el láser de color azul (488 nm) y la tinción presentaba un color rojo a simple vista. Por último, la tinción fluorescente FITC-PNA se unía a residuos glicosídicos de la membrana acrosomal, marcando aquellos espermatozoides con acrosomas dañados o reaccionados, era excitada también con el

láser de color azul (488 nm) y presentaba un color verde a simple vista (Martínez-Pastor et al., 2010).

Además, se utilizó una combinación de antibióticos a base de gentamicina, tilosina, lincomicina y espectinomocina (Minitüb; Minitube Ibérica SL, Tarragona) recomendada por la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OMSA) para el semen de rumiantes en su Código Sanitario para los Animales Terrestres (2006). Se preparó una solución de trabajo mediante la dilución del contenido del vial (660 mg de espectinomocina, 550 mg de gentamicina, 330 mg de lincomicina y 110 mg de tirosina) en 22 mL de agua Mili-Q. Posteriormente, se prepararon alícuotas de 0,2 mL en criotubos que fueron congelados hasta su uso.

3.2.2. Equipos de laboratorio

- Baño programable: para refrigerar las muestras de semen a una determinada velocidad. Una vez añadido el primer diluyente, las dosis de semen se introducían en el baño programable donde eran enfriadas desde 20°C a 4°C en 90 minutos a una velocidad de -0,18 °C/min.



Figura 4. Baño programable. Fuente: elaboración propia.

- Biocongelador programable: se utilizó para congelar las pajuelas, a velocidades controladas, con vapores de nitrógeno líquido. Estaba unido a un tanque presurizado de nitrógeno líquido y conectado a una unidad de control controlada a través de un ordenador mediante el programa WIN3T, específico para ese biocongelador. Primero era atemperado a 4°C para evitar choques térmicos y, posteriormente, se introducían las pajuelas que eran congeladas de 4°C a -5°C a una velocidad de -4°C/min, de -5°C a -110°C a una velocidad de -25°C/min y de -110°C a -140°C a una velocidad de -35°C/min.



Figura 5. Biocongelador programable. Fuente: elaboración propia.



Figura 6. Biocongelador programable en funcionamiento. Fuente: elaboración propia.

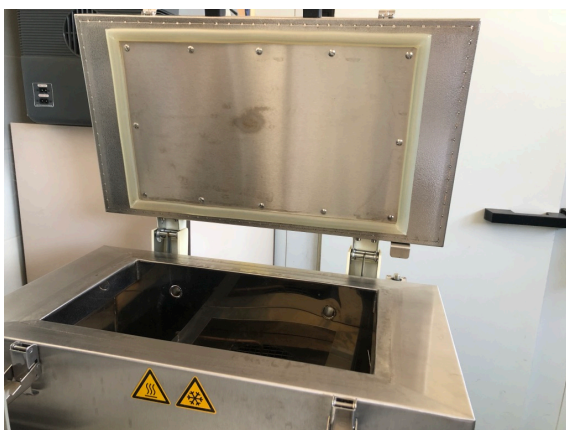


Figura 7. Biocongelador programable abierto. Fuente: elaboración propia.

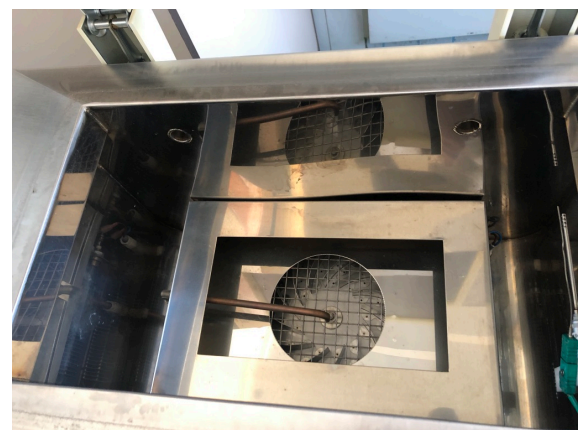


Figura 8. Vista interior del biocongelador programable. Fuente: elaboración propia.

- Citómetro de flujo: basado en la utilización de tres láseres (violeta, rojo y azul), empleados en el recuento y clasificación de células en función del fluorocromo utilizado en la tinción. La tinción Hoechst 33342 presentaba un color violeta y penetraba en todas las células, fijándose al ADN, diferenciando a los espermatozoides de otros eventos o artefactos de tamaño similar; la tinción MitoTracker Deep Red FM se acumulaba y teñía todas las mitocondrias indicando su correcta funcionalidad conforme aumentaba la intensidad de la tinción, presentaba un color rojo a simple vista; la tinción PI penetraba en la célula cuando presentaba la membrana plasmática dañada y se unía a los ácidos nucleicos, presentaba un color rojo a simple vista, y la tinción fluorescente FITC-PNA se unía a residuos glicosídicos de la membrana acrosomal, marcando aquellos espermatozoides con acrosomas dañados o reaccionados, presentando un color verde a simple vista.



Figura 9. Citómetro de flujo. Fuente: elaboración propia.

3.2.3. Diluyentes

Para la determinación de la concentración espermática se realizaron diluciones en suero fisiológico (Konyali et al., 2013). Para evaluar la calidad del semen fresco y descongelado, se empleó el diluyente Tris-Cítrico-Glucosa (TCG) y el diluyente TCG suplementado con albúmina sérica bovina (3 mg/mL; TCG-BSA). Para la congelación del semen se utilizaron dos diluyentes, ambos con base de leche desnatada, uno de ellos sin crioprotector (SM1) y otro (SM2) con el crioprotector permeable glicerol (72% de SM1 y 28% de glicerol, volumen:volumen). Además, se añadieron 10 μ L de la combinación de antibióticos/mL de semen congelado quedando una concentración final

de 250 μg de gentamicina, 50 μg de tilosina, 150 μg de lincomicina y 300 μg de espectinomicina/mL.

La composición de los diluyentes TCG y SM1 se encuentra resumida en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Composición de los diluyentes TCG y SM1, indicando los ingredientes, el peso molecular y la concentración de cada ingrediente.

Diluyente	Ingrediente	Peso Molecular	Concentración	g/L
TRIS-CÍTRICO-GLUCOSA (TCG)	- TRIZMA base	• 121,2	• 250 mM	• 30,27 g
	- Ácido cítrico anhidro	• 192,12	• 83 mM	• 15,95 g
	- D (+) Glucosa	• 180,16	• 69 mM	• 12,43 g
	- Agua Milli-Q	—	—	• Hasta 1 L
SM1	- D (+) Glucosa	• 180,16	• 69 mM	• 2 g
	- Leche desnatada UHT Central Lechera Asturiana	—	—	• 1 L

TCG: pH 7 y mOsm 300.

3.2.4. Animales

En este estudio se utilizaron eyaculados de 10 machos cabríos de raza Murciano-Granadina, de entre 2 y 10 años de edad, ubicados en las naves de caprino del Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA) en Segorbe (Castellón). Los sementales estuvieron alojados en corrales comunes, y fueron alimentados con 1 kg de pienso

concentrado por macho (17% de proteína bruta, 4,5% de aceites y grasas brutas y 11,6% de fibra bruta) por día y por macho. Además, se les suministró agua y paja *ad libitum*. También se suplementó la ración con alfalfa.

Tanto el alojamiento como los protocolos utilizados para la extracción del semen se realizaron según la normativa europea para el cuidado y uso de los animales de experimentación (RD 53/2013).

3.3. Métodos

3.3.1. Protocolo de extracción del semen

La extracción seminal se realizó mediante vagina artificial atemperada a 40-45°C, según el protocolo descrito por Silvestre et al. (2004). Una vez obtenido el eyaculado, se rotuló el tubo que contenía el eyaculado con los datos del semental y se colocó en baño termostático a 25°C.

El volumen del semen se estimó mediante pesaje. Se diluyó la muestra seminal obtenida (1:400; v:v) con la solución de cloruro sódico (NaCl) al 0,9% para calcular la concentración mediante un fotómetro que determinaba la concentración espermática por la absorbancia que ofrecía la suspensión de espermatozoides, y calibrado para el semen de caprino (Accucell, IMV, Humeco, Huesca, España).

3.3.2. Protocolo de congelación y descongelación del semen

Para preparar las dosis de semen congeladas, a las muestras de semen obtenidas se les añadió 1 mL de TCG-BSA (3 mg/mL) y se completó hasta un volumen total de 10 mL con TCG. Para eliminar el plasma seminal en aquellas muestras en las que fue necesario, se centrifugó el semen a 500 G durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizada la primera centrifugación, se eliminó el sobrenadante a través de un sistema de vacío utilizando una pipeta Pasteur de vidrio para cada macho y nuevamente el pellet que contenía los espermatozoides fue resuspendido siguiendo el protocolo previamente descrito. A continuación, se realizó una segunda centrifugación a 500 G durante 15 minutos a temperatura ambiente y, al finalizar, se eliminó de nuevo el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en el sobrenadante remanente y de nuevo se

determinaron el volumen y la concentración según los protocolos descritos anteriormente.

Las muestras de semen se diluyeron hasta una concentración de 667 millones de espermatozoides/mL con SM1 atemperado a temperatura ambiente. De cada uno de los eyaculados diluidos se tomó una alícuota de 40 μ L para analizar la calidad del semen en fresco.

Para la refrigeración de las muestras se utilizó un baño de agua programable (Julabo GmbH, Seelbach, Alemania). Las dosis fueron enfriadas desde 20°C a 4 °C en 90 minutos a una velocidad de -0,18 °C/min. Una vez transcurridos los 90 minutos, los tubos con el semen se colocaron en la cámara refrigerada a 4°C para continuar con el protocolo de congelación. A esta temperatura se añadieron los antibióticos (10 μ L/mL) y el SM2 (dilución 3:1; volumen:volumen), ambos atemperados a 4°C, para evitar provocar choques térmicos en los espermatozoides. Además, para evitar provocar choques osmóticos, la cantidad total de SM2 a añadir se dividió en 3 alícuotas que fueron añadidas cada 10 minutos. Después de añadir la totalidad del SM2 se procedió al equilibrado de las muestras con el crioprotector durante 1,5 horas a 4°C. La concentración final de glicerol y de espermatozoides fueron de 7% y 500 millones de espermatozoides/mL, respectivamente.

Trascurridos los 15 minutos de la adición del total del SM2, el semen fue envasado, en la cámara refrigerada a 4°C, en pajuelas de 0,25 mL (IMV, Humeco, Huesca, España) que fueron selladas con polivinil alcohol (PVA, Humeco, Huesca, España) (*Figura 10*). Las pajuelas fueron sumergidas por el extremo de la PVA en agua a 4°C para facilitar la polimerización de la PVA y el sellado de las pajuelas (*Figura 11*). Posteriormente, las pajuelas se secaron y colocaron en una gradilla de congelación y esta se introdujo en una caja de porexpan con acumuladores de hielo a 4°C, hasta que se completó el tiempo de equilibrado a 4°C en el interior de la cámara refrigerada.

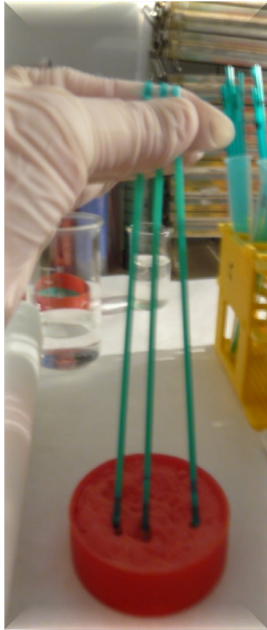


Figura 10. Sellado de las pajuelas con PVA. Fuente: elaboración propia.



Figura 11. Sellado de las pajuelas con PVA en agua. Fuente: elaboración propia.

La congelación de las pajuelas se realizó mediante un biocongelador programable Mini-Digitcool (IMV, Humeco, Huesco, España) unido a un tanque presurizado de nitrógeno líquido y conectado a una unidad de control controlada a través de un ordenador mediante el programa WIN3T, específico para ese biocongelador (IMV, Humeco, Huesca, España). Para evitar choques térmicos, el arcón de congelación fue atemperado a 4°C previamente a la colocación de las pajuelas. A continuación se introdujeron las pajuelas en el biocongelador y fueron congeladas según el siguiente protocolo (Purdy, 2006): de 4 a -5°C a una velocidad de -4°C/min, de -5°C a -110°C a una velocidad de -25°C/min y de -110°C a -140°C a una velocidad de -35°C/min (Figura 12). Cuando terminó la congelación, se sacaron las pajuelas del biocongelador y se sumergieron rápidamente en nitrógeno líquido. Seguidamente se clasificaron en gobelets ordenando las pajuelas por macho y, por último, esos gobelets con pajuelas en su interior se introdujeron en el tanque de cuarentena para su almacenamiento.

Para la descongelación, las pajuelas fueron sumergidas en baño de agua a 37°C durante 30 segundos.

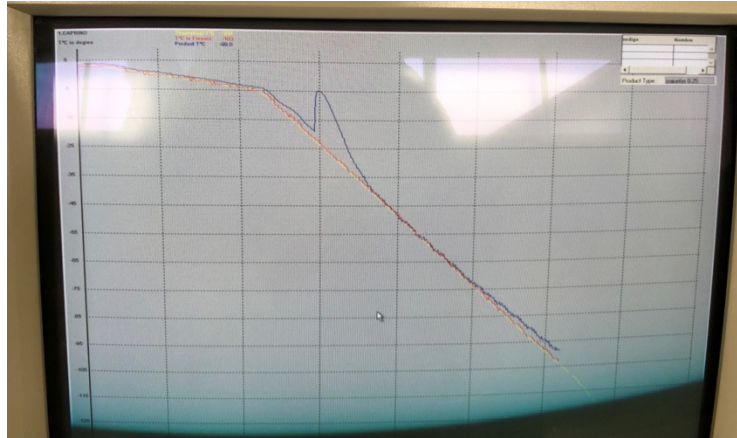


Figura 12. Muestra de la curva de congelación utilizada para la congelación del semen caprino en un biocongelador programable.
Fuente: elaboración propia.

3.3.3. Análisis de la calidad seminal *in vitro*

Para evaluar la calidad del semen se realizaron análisis de motilidad, de integridad de membranas plasmática y acrosómica y de funcionalidad de mitocondrias de los espermatozoides tanto en semen fresco como en semen descongelado. Se siguieron los protocolos descritos por Konyali et al. (2013) y por Ortiz-Rodriguez et al. (2017), con ligeras modificaciones.

Todas las diluciones y manipulación de las muestras se realizaron a temperatura ambiente (22-25°C). Una vez descongeladas las muestras de semen, el contenido de cada una de las pajuelas se depositó en un eppendorf para evaluar la calidad *in vitro* de las dosis. Seguidamente, se tomó un alícuota de 100 μ L del semen descongelado y se le añadieron un total de 300 μ L de TCG divididos en tres pasos (100 μ L cada vez) para paliar los choques osmóticos. La concentración ahora fue de 125 millones de espermatozoides/mL. A continuación, tanto las muestras de semen fresco como descongelado se diluyeron hasta una concentración de 30 millones de espermatozoides/mL con TCG en las muestras de semen fresco y descongelado. A partir de esta muestra se realizaron el resto de diluciones para realizar los análisis de movilidad y de citometría de flujo.

3.3.3.1. Motilidad

La concentración para el análisis de motilidad se ajustó a 6 millones de espermatozoides/mL con TCG-BSA, transfiriendo 100 μ L de la muestra a 30 millones de espermatozoides/mL a un eppendorf con 400 μ L de TCG-BSA. Estas muestras se incubaron a 37°C, durante 10 minutos, antes de realizar los análisis de motilidad.

La motilidad de cada eyaculado se analizó a través del sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis; ISAS versión 1.0.17, Proiser, Valencia, España) operando a 30 video frames por segundo (30 Hz), con ajustes de área de partícula desde 15 hasta 70 μ m, y radio de búsqueda de 12 μ m. Los espermatozoides se clasificaron como inmóviles si su velocidad media (average path velocity; VAP) era inferior a 10 μ m/sec y se clasificaron como móviles progresivos si presentaban VAP > 75 μ m/sec y un índice de rectitud (straightness index; STR) \geq 80% (Figura 13).

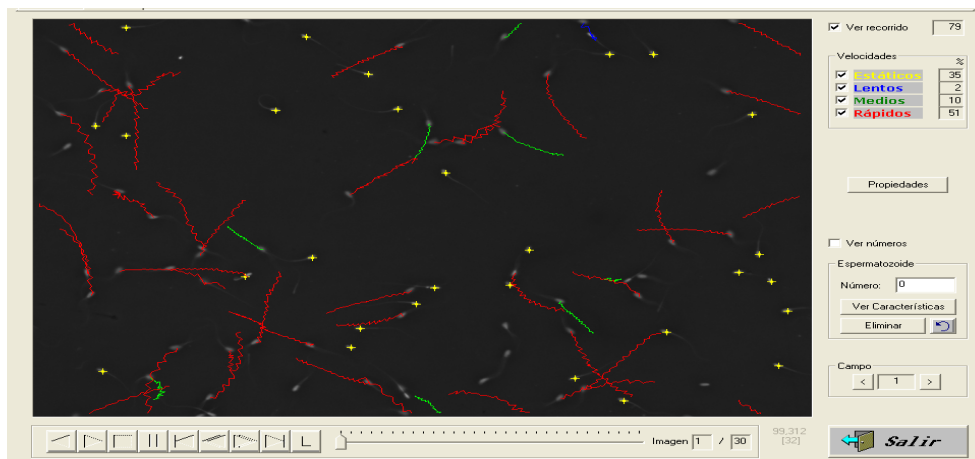


Figura 13. Clasificación de los espermatozoides en estáticos, lentos, medios y rápidos, según su velocidad media (VAP). Fuente: elaboración propia.

Los análisis de movilidad se realizaron a 37°C utilizando un objetivo 10x con contraste de fases negativo en un microscopio Nikon Eclipse 90i (Nikon Corporation Instruments Company; IZASA, Barcelona, España) conectado al ordenador a través de una cámara de vídeo monocromática Basler A312f (Basler Visión Technologies, Proiser, Paterna, Valencia, España). Transcurridos los 10 minutos de incubación a 37°C, se tomaron 10 μ L de la muestra y se depositaron en una cámara Spermtrack (ISAS, Proiser, Valencia, España) atemperada a 37°C en las placas calefactadas y se tomaron los datos de un mínimo de 200 espermatozoides en tres o cuatro campos distintos.

Finalmente, se analizaron las trayectorias de los espermatozoides para eliminar posibles confusiones con partículas no espermáticas y trayectorias erróneamente analizadas.

El sistema proporcionó información sobre los espermatozoides móviles totales (MT, %) y espermatozoides móviles progresivos (MP, %). Así como la velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidad lineal (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidad media del trayecto (VAP, $\mu\text{m/s}$), índice de linealidad (LIN, %), índice de rectitud (STR, %), índice de oscilación (WOB, %), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm) y la frecuencia de batido (BCF, Hz) sobre la población de móviles y sobre el total (móviles e inmóviles).

3.3.3.2. Citometría de flujo

Para el análisis mediante citometría de flujo se transfirieron 100 μL de la dilución a 30 millones de espermatozoides/mL a dos tubos distintos. Uno de los tubos se utilizó para la evaluación simultánea de la integridad de las membranas plasmática y acrosómica, y el otro tubo para evaluar la funcionalidad de las mitocondrias.

Se prepararon varias soluciones de trabajo de las tinciones. En una de ellas se mezclaron, por cada muestra a analizar, 5 μL de Hoechst 33342 de la solución madre y 25 μL de TCG (tinción H). En otra se mezclaron, por cada muestra a analizar, 5 μL de Hoechst 33342, 0,05 μL de Mitotracker Deep Red FM de las soluciones madre y 25 μL de TCG (tinción HM). Por último, se preparó una solución de trabajo mezclando 25 μL de TCG y 0,5 μL de PI, y 0,5 μL de las soluciones madre en 25 μL de TCG (tinción PI-PNA), por cada muestra a analizar.

En el tubo utilizado para evaluar la integridad de las membranas plasmática y acrosómica, se añadieron 30 μL de la tinción H a cada una de las muestras y se incubaron en oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente. Trascorrida esta primera incubación, se añadieron 26 μL de la tinción PI-PNA, incubando durante 10 minutos adicionales en las mismas condiciones previamente indicadas. Trascorridos 10 minutos de la incubación de los tubos utilizados para evaluar la integridad de las membranas plasmática y acrosómica, se comenzaron a procesar los tubos para evaluar la funcionalidad de las mitocondrias. En este caso, se añadieron a cada muestra 30 μL de la tinción HM y se incubaron en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tras la incubación, las muestras se diluyeron con 400 μ L de TCG y se analizaron en un citómetro de flujo CytoFLEX S (Beckman Coulter life sciences, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España) equipado con tres láseres (láser azul de 488 nm a 50-mW; láser rojo diodo de 638 nm a 50-mW y láser violeta de 405 nm a 80-mW), y un software CytExpert (Beckman Coulter life sciences, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España). El citómetro se calibró a diario con esferas de calibración proporcionadas por el fabricante (CytoFLEX Daily QC Fluorospheres; Beckman Coulter life sciences, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España) para verificar el correcto funcionamiento de alineamiento óptico y del sistema de fluidos.

En los tubos para evaluar la integridad de las membranas plasmática y acrosómica, la fluorescencia emitida por el Hoechst 33342 se detectó mediante el láser violeta utilizando un fotodiodo de avalancha (APD) de 450/45 nm. Tanto el PI como el FITC-PNA fueron excitados mediante el láser azul. La fluorescencia roja emitida por el PI se detectó mediante un APD de 690/50 nm y la fluorescencia verde emitida por el FITC-PNA se detectó mediante un APD de 525/40 nm. La compensación utilizada entre los filtros PI-FITC PNA fue del 0,93%. Se analizaron 50.000 eventos por muestra. Se realizó una primera selección de espermatozoides mediante los detectores de dispersión lateral (Side Scatter, SSD-A) y frontal (FSC-A) de la luz. A continuación, se realizó una segunda selección considerando solo aquellos eventos que se presentasen de forma individual, mediante los parámetros SSD-A y altura de SSD (SSD-H). Esta población fue a continuación evaluada en el filtro del Hoechst 33342 para seleccionar la población de espermatozoides; usando este protocolo, todas las células se tiñen con Hoechst 33342, lo que permite distinguir a las células de los eventos que no contienen ADN (Hoechst negativas) pero que presentan un tamaño similar al de los espermatozoides. Se hizo una nueva selección en este filtro de los eventos Hoechst positivos (población de espermatozoides), que fue finalmente evaluada en los otros dos filtros (PI y FITC-PNA). Con estos filtros, sólo los espermatozoides con la membrana plasmática dañada se tiñen con PI y sólo los espermatozoides con el acrosoma dañado se tiñen con FITC-PNA. Por lo tanto, se pueden distinguir cuatro poblaciones: espermatozoides con membrana plasmática y acrosoma intactos (PI-/FITC-PNA-; VAI), espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma dañado (PI-/FITC-PNA+; VAR), espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto (PI+/FITC-PNA-; MAI) y espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma dañado (PI+/FITC-PNA+; MAR). En los resultados se consideraron el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta (PI- y FITC-PNA- ó +; vivos), el

porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática y acrosoma intactos (PI-/FITC-PNA-; VAI) y el porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado (MAR + VAR). El porcentaje de cada una de estas poblaciones se calculó sobre el total de espermatozoides (Total= VAI+VAR+DAI+DAR): vivos (calculado como $(VAI + VAR)/Total \times 100$; Vivos, %), VAI ($VAI/Total \times 100$; VAI%) y espermatozoides con acrosoma dañado ($(MAR + VAR)/Total \times 100$; AR (%)).

En los tubos utilizados para evaluar la funcionalidad de las mitocondrias, la fluorescencia del Hoechst 33342 se detectó de forma similar a la ya descrita. La fluorescencia del Mitotracker Deep Red FM se detectó mediante el láser rojo utilizando un fotodiodo de avalancha (APD) de 660/20 nm. Se analizaron 50.000 eventos por muestra. La selección de las poblaciones de espermatozoides se realizó de la forma previamente descrita. En este caso, el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática dañada se realizó mediante la tinción Hoechst 33342 en función de la intensidad de la tinción: los espermatozoides con membrana dañada presentaron una mayor intensidad de tinción, desplazándose el pico de tinción hacia la derecha en la gráfica, y los que tenían la membrana intacta presentaron menor intensidad de tinción, situándose el pico de tinción a la izquierda de la gráfica. En el caso de las mitocondrias, las mitocondrias con menor funcionalidad presentaron una menor intensidad de tinción para el fluorocromo Mitotracker Deep Red, situándose el pico de tinción a la izquierda de la gráfica, y en las que tenían mayor funcionalidad la tinción se acumulaba en el interior de las mitocondrias y por ello la fluorescencia era más intensa, por lo que el pico de intensidad de tinción se situaba hacia la derecha de la gráfica. Por lo tanto, se pudieron distinguir cuatro poblaciones: espermatozoides con membrana plasmática intacta y mitocondrias con alta funcionalidad (baja fluorescencia de Hoechst y alta fluorescencia de Mitotracker; VMA), espermatozoides con membrana plasmática intacta y mitocondrias con baja funcionalidad (baja fluorescencia de Hoechst y baja fluorescencia de Mitotracker; VMB), espermatozoides con membrana plasmática dañada y mitocondrias con baja funcionalidad (alta fluorescencia de Hoechst y baja fluorescencia de Mitotracker; MMB) y espermatozoides con membrana plasmática dañada y mitocondrias con alta funcionalidad (alta fluorescencia de Hoechst y alta fluorescencia de Mitotracker; MMA). En los resultados se consideraron las cuatro poblaciones, calculando el porcentaje de cada una de ellas sobre el total de espermatozoides (Total= VMB+VMM+MMB+MMM): VMB ($VMB/Total \times 100$; %), VMM ($VMM/Total \times 100$;%), MMB ($MMB/Total \times 100$;%) y MMM ($MMM/Total \times 100$;%) (*Figura 14*).

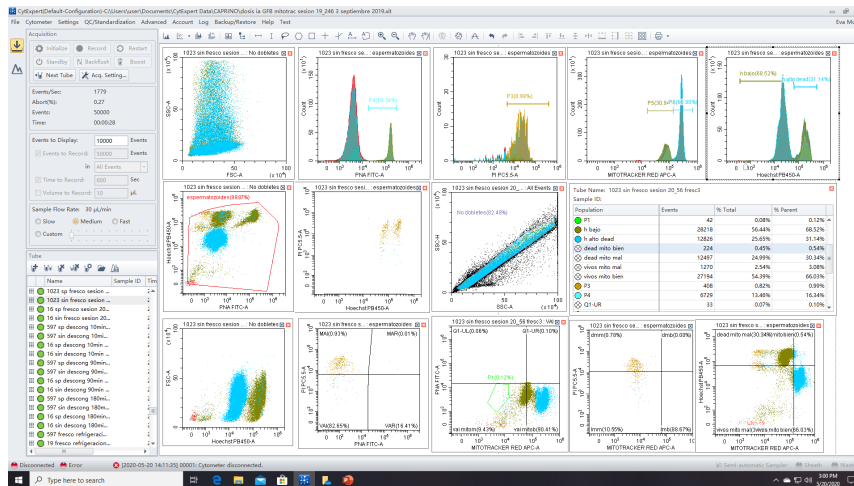


Figura 14. Percepción gráfica del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos con mitocondrias funcionales y no funcionales. Fuente: elaboración propia.

3.3.4. Diseño experimental

3.3.4.1. Experimento 1. Efecto del plasma seminal sobre la calidad *in vitro* de los espermatozoides de caprino tras la descongelación

En el primer experimento se comparó la calidad *in vitro* de los espermatozoides de caprino tras la descongelación de las dosis congeladas sin y con plasma seminal. Para ello, se extrajeron 20 eyaculados de 10 machos de raza Murciano-Granadina. Tras la extracción seminal, se realizó una primera selección de los eyaculados basada en criterios macroscópicos, observando el color y la opacidad de los eyaculados, descartándose los eyaculados que presentaban coloraciones anómalas o muy transparentes. Se determinaron el volumen y la concentración de los eyaculados que cumplieron los criterios de calidad macroscópica y, seguidamente, cada eyaculado fue dividido en dos partes: una parte fue centrifugada para eliminar el plasma seminal según el protocolo de congelación descrito previamente y la otra parte fue procesada con plasma seminal, omitiendo el paso de centrifugación. A continuación, cada muestra se diluyó con el SM1, y se tomó un alícuota para evaluar la calidad *in vitro* del semen fresco. Nuevamente, se realizó un criterio de selección de los eyaculados a congelar, descartando todos aquellos que no presentaban, al menos, un 50% de espermatozoides móviles totales. En el resto de eyaculados se continuó con el protocolo de congelación descrito previamente.

Después de la descongelación, se realizó un test funcional de resistencia térmica. Para ello, se incubaron las muestras diluidas a 30 millones de espermatozoides/mL a 37°C durante 180 minutos y se evaluó la calidad seminal a tres tiempos durante la incubación (10 minutos, 90 minutos y 180 minutos).

Para tener suficiente cantidad de muestra para el test de resistencia térmica, se prepararon 1,5 mL de semen descongelado diluido a 30 millones de espermatozoides/mL. Para ello, se tomó una alícuota de 360 µL de las muestras diluidas a una concentración de 125 millones de espermatozoides/mL y se diluyó con 1140 µL de TCG. Esta muestra fue incubada a 37°C y se fueron extrayendo 300 µL de la misma en cada uno de los tiempos de análisis; 100 µL fueron usados para evaluar la movilidad y 200 µL para realizar los análisis mediante citometría de flujo. Para evaluar la calidad del semen, se siguieron los protocolos descritos anteriormente.

3.3.4.2. Experimento 2. Efecto del plasma seminal sobre la calidad *in vitro* de los espermatozoides de caprino en las distintas etapas del protocolo previas a la congelación

Debido al resultado del experimento anterior, en este experimento se estudió cómo afecta el plasma seminal a la calidad de los espermatozoides de caprino en cada una de las etapas de las que consta el protocolo previas a la congelación propiamente dicha: después de añadir el primer diluyente (SM1), después de refrigerar las muestras a 4°C, tras añadir el SM2 y, por último, después del equilibrado de las muestras. Hasta el momento de decretarse el estado de alarma debido a la enfermedad COVID19 y la paralización de todas las actividades académicas, se extrajeron 3 eyaculados de 2 machos de raza Murciano-Granadina. Tras la extracción seminal, cada eyaculado que superó los criterios de selección macroscópicos fue dividido en dos mitades: una parte fue centrifugada para eliminar el plasma seminal según el protocolo descrito previamente y la otra parte fue procesada con plasma seminal, omitiendo el paso de centrifugación. Al igual que en el experimento 1, se seleccionaron los eyaculados que presentaban, al menos, un 50% de espermatozoides móviles totales después de la dilución con el SM1, siendo procesados según el protocolo descrito previamente.

En cada etapa descrita anteriormente, se tomó una alícuota de 40 µL de cada una de las muestras para evaluar su calidad mediante los análisis de motilidad y citometría de flujo descritos anteriormente. En las muestras tomadas después de añadir el SM2 y

después del equilibrado (en ambas hay glicerol), se realizó una primera dilución hasta 125 millones de espermatozoides/mL siguiendo el protocolo descrito previamente para las muestras descongeladas.

3.3.5. Análisis estadístico

En el experimento 1, los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SAS (Clark & SAS Institute, 2004). Los datos de calidad *in vitro* de las muestras refrigeradas frescas y descongeladas se analizaron por separado mediante un modelo mixto donde se incluyó el eyaculado anidado a macho como efecto aleatorio. En el caso del semen fresco, el plasma seminal fue incluido como efecto fijo, con 2 niveles: con plasma seminal y sin plasma seminal. Para el análisis estadístico de los datos del semen descongelado, además del plasma se incluyó como efecto fijo el tiempo de incubación, con tres niveles: 10, 90 y 180 minutos y la interacción entre estos dos factores (plasma x tiempo). El ajuste de Tukey-Kramer se utilizó para evaluar las diferencias de las medias mínimo cuadráticas a un error fijado al 5% y los resultados se presentan como medias mínimo cuadráticas (LSM) \pm error estándar (SE).

En el experimento 2, debido al pequeño tamaño muestral, en la tabla solo se muestra la media no corregida de los datos.

4. RESULTADOS

- a. Experimento 1. Efecto del plasma seminal sobre la calidad *in vitro* de los espermatozoides de caprino tras la descongelación.

En el primer experimento se comparó la calidad *in vitro* de los espermatozoides de caprino tras la descongelación de las dosis congeladas sin y con plasma seminal. Para ello, se extrajeron 20 eyaculados de 10 machos de raza Murciano-Granadina. Tras la extracción seminal, se descartaron los eyaculados que no alcanzaron los criterios de calidad mínimos, descartándose 2 eyaculados por criterios macroscópicos y 5 eyaculados por criterios microscópicos del semen fresco, ya que presentaban un porcentaje de espermatozoides móviles totales inferior a 50%. Finalmente, se utilizaron 13 eyaculados de 7 machos de raza Murciano-Granadina.

Los datos obtenidos de la calidad del semen fresco de las muestras procesadas con y sin plasma seminal se presentan en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Calidad del semen fresco de caprino (n = 13 eyaculados) procesado con y sin plasma seminal.

CALIDAD DEL SEMEN FRESCO		PLASMA SEMINAL	
		CON	SIN
CALIDAD DEL SEMEN FRESCO	MT(%)	74,1 ± 3,2	78,4 ± 3,2
	MP(%)	59,5 ± 4,0	66,1 ± 4,0
<u>POBLACIÓN DE MÓVILES</u>	VCL (µm/s)	117,0 ± 5,4	116,7 ± 5,4
	VSL (µm/s)	95,6 ± 6,1	93,5 ± 6,1
	VAP (µm/s)	105,7 ± 6,1	102,4 ± 6,1
	LIN (%)	79,1 ± 2,6	78,9 ± 2,6
	STR (%)	87,1 ± 1,7	89,1 ± 1,7
	WOB (%)	88,7 ± 1,7	86,9 ± 1,7
	ALH (µm)	2,1 ± 0,1	2,3 ± 0,1
	BCF (Hz)	10,6 ± 0,3 ^a	11,3 ± 0,3 ^b
	<u>POBLACIÓN TOTAL</u>	VCL _{TOTAL} (µm/s)	86,1 ± 4,9
VSL _{TOTAL} (µm/s)		70,4 ± 5,1	73,0 ± 5,1
VAP _{TOTAL} (µm/s)		77,8 ± 5,1	79,8 ± 5,1
LIN _{TOTAL} (%)		58,8 ± 3,4	61,9 ± 3,4
STR _{TOTAL} (%)		64,8 ± 3,3	69,9 ± 3,3
WOB _{TOTAL} (%)		65,8 ± 3,2	68,1 ± 3,2
ALH _{TOTAL} (µm)		1,5 ± 0,1 ^a	1,8 ± 0,1 ^b
BCF _{TOTAL} (Hz)		7,8 ± 0,4 ^a	8,9 ± 0,4 ^b
<u>PI- FITC PNA- HOECHST</u>	VIVOS (%)	64,2 ± 3,0	65,0 ± 3,0
	VAI (%)	64,1 ± 3,0	64,8 ± 3,0
	AR (%)	11,3 ± 1,9	12,8 ± 1,9
	VMB (%)	64,0 ± 3,1	66,8 ± 3,1
	VMM (%)	2,3 ± 0,5	2,7 ± 0,5

MITOTRACKER- HOECHST	MMB (%)	9,1 ± 2,5	6,3 ± 2,5
	MMM (%)	24,5 ± 3,5	24,2 ± 3,5

Los resultados se presentan como medias mínimo cuadráticas ± error estándar (LSM ± SE).

MT: móviles totales; MP: móviles progresivos; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad lineal; VAP: velocidad media del trayecto; LIN: índice de linealidad; STR: índice de rectitud; WOB: índice de oscilación; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: frecuencia de batido del flagelo; VIVOS: espermatozoides vivos independientemente de que tengan el acrosoma reaccionado o no; VAI: espermatozoides vivos con el acrosoma intacto; AR: espermatozoides vivos y muertos con el acrosoma dañado; VMB: espermatozoides vivos con mitocondrias activas; VMM: espermatozoides vivos con mitocondrias con baja actividad; MMB: espermatozoides muertos con mitocondrias activas; MMM: espermatozoides muertos con mitocondrias inactivas.

^{a, b}: Valores con distintos superíndices indican diferencias entre el tratamiento con plasma y sin plasma (P < 0,05).

En semen fresco (*Tabla 2*), se observaron diferencias significativas (P < 0,05) entre las muestras procesadas con o sin plasma seminal en la variable de la población de móviles BCF (10,6 ± 0,3 vs. 11,3 ± 0,3 Hz), presentando mayor frecuencia de batido del flagelo las muestras procesadas sin plasma seminal. De igual manera, al estudiar las variables de motilidad sobre la población total que incluye tanto los móviles como los inmóviles, las muestras procesadas sin plasma seminal presentaron mayores valores (P < 0,05) de ALH_{TOTAL} (1,8 ± 0,1 µm) y BCF_{TOTAL} (8,9 ± 0,4 Hz) que las muestras procesadas con plasma seminal (1,5 ± 0,1 µm y 7,8 ± 0,4 Hz). Para el resto de variables, el plasma seminal no tuvo efecto.

Por otra parte, tras la descongelación, se realizó un test funcional de resistencia térmica evaluando la evolución de la calidad seminal de las muestras descongeladas a tres tiempos (10 minutos, 90 minutos y 180 minutos) durante la incubación a 37°C.

En la *Tabla 3* se muestran los resultados obtenidos en el análisis de la calidad del semen descongelado para los dos factores fijos (plasma seminal y tiempo).

Tabla 3. Calidad de los eyaculados de caprino (n = 13 eyaculados) congelados con y sin plasma seminal tras la incubación a 37°C durante 180 minutos después de la descongelación (análisis efectuados a 10, 90 y 180 minutos de incubación).

CALIDAD DEL SEMEN DESCONGELADO (PLASMA Y TIEMPO)		PLASMA SEMINAL		TIEMPO (min)		
		CON	SIN	10	90	180
		MT(%)	12,7 ± 3,8 ^a	31,2 ± 3,8 ^b	16,6 ± 4,1	20,5 ± 4,1
MP(%)	8,1 ± 2,7 ^a	20,3 ± 2,7 ^b	19,0 ± 2,9 ^b	12,8 ± 2,9 ^a	10,8 ± 2,9 ^a	
VCL (µm/s)	80,3 ± 6,2 ^a	89,5 ± 6,2 ^b	98,4 ± 6,6 ^c	83,8 ± 6,6 ^b	72,6 ± 6,6 ^a	
VSL (µm/s)	53,2 ± 4,8	55,7 ± 7	70,4 ± 5,2 ^b	50,8 ± 5,2 ^a	42,2 ± 5,2 ^a	

<u>POBLACIÓN DE MÓVILES</u>	VAP ($\mu\text{m/s}$)	60,8 \pm 5,2	64,7 \pm 5,2	80,5 \pm 5,5 ^c	58,9 \pm 5,5 ^b	48,8 \pm 5,5 ^a
	LIN (%)	60,3 \pm 3,1	60,9 \pm 3,1	67,5 \pm 3,5 ^b	58,3 \pm 3,5 ^a	56,0 \pm 3,5 ^a
	STR (%)	78,6 \pm 2,6	82,3 \pm 2,6	80,2 \pm 3,1	81,6 \pm 3,1	79,6 \pm 3,1
	WOB (%)	70,1 \pm 2,8	71,7 \pm 2,8	77,9 \pm 3,3 ^b	68,9 \pm 3,3 ^a	65,8 \pm 3,3 ^a
	ALH (μm)	2,2 \pm 0,1 ^a	2,6 \pm 0,1 ^b	2,3 \pm 0,2	2,5 \pm 0,2	2,3 \pm 0,2
	BCF (Hz)	10,3 \pm 0,6	11,5 \pm 0,6	10,2 \pm 0,7 ^a	11,9 \pm 0,7 ^b	10,5 \pm 0,7 ^{ab}
<u>POBLACIÓN TOTAL</u>	VCL _{TOTAL} ($\mu\text{m/s}$)	10,7 \pm 3,9 ^a	30,3 \pm 3,9 ^b	28,0 \pm 4,2 ^b	18,1 \pm 4,2 ^a	15,4 \pm 4,2 ^a
	VSL _{TOTAL} ($\mu\text{m/s}$)	7,1 \pm 2,7 ^a	19,1 \pm 2,7 ^b	20,1 \pm 3,0 ^b	10,7 \pm 3,0 ^a	8,6 \pm 3,0 ^a
	VAP _{TOTAL} ($\mu\text{m/s}$)	8,2 \pm 3,1 ^a	22,2 \pm 3,1 ^b	23,0 \pm 3,3 ^b	12,5 \pm 3,3 ^a	10,1 \pm 3,3 ^a
	LIN _{TOTAL} (%)	8,1 \pm 2,6 ^a	19,3 \pm 2,6 ^b	18,8 \pm 2,3 ^b	11,8 \pm 2,3 ^a	10,4 \pm 2,3 ^a
	STR _{TOTAL} (%)	10,7 \pm 3,3 ^a	25,7 \pm 3,3 ^b	22,3 \pm 3,5	16,8 \pm 3,5	15,3 \pm 3,5
	WOB _{TOTAL} (%)	9,4 \pm 3,0 ^a	22,6 \pm 3,0 ^b	21,6 \pm 3,2 ^b	14,0 \pm 3,2 ^a	12,4 \pm 3,2 ^a
	ALH _{TOTAL} (μm)	0,3 \pm 0,1 ^a	0,8 \pm 0,1 ^b	0,6 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1
	BCF _{TOTAL} (Hz)	1,4 \pm 0,4 ^a	3,7 \pm 0,4 ^b	2,9 \pm 0,5	2,5 \pm 0,5	2,2 \pm 0,5
<u>PI- FITC PNA- HOECHST</u>	VIVOS (%)	16,2 \pm 4,2 ^a	37,1 \pm 4,2 ^b	26,2 \pm 4,4	27,6 \pm 4,4	26,2 \pm 4,4
	VAI (%)	16,0 \pm 4,2 ^a	36,9 \pm 4,2 ^b	26,0 \pm 4,4	27,3 \pm 4,4	25,9 \pm 4,4
	AR (%)	56,2 \pm 4,7 ^b	22,6 \pm 4,7 ^a	37,6 \pm 4,8	40,5 \pm 4,8	40,1 \pm 4,8
<u>MITOTRACKER- HOECHST</u>	VMB (%)	12,3 \pm 3,9 ^a	35,0 \pm 3,9 ^b	25,7 \pm 4,1	24,7 \pm 4,1	20,6 \pm 4,1
	VMM (%)	4,4 \pm 1,2 ^a	6,7 \pm 1,2 ^b	3,4 \pm 1,3 ^a	5,6 \pm 1,3 ^{ab}	7,6 \pm 1,3 ^b
	MMB (%)	11,6 \pm 4,4	6,2 \pm 4,4	15,7 \pm 4,7 ^b	5,7 \pm 4,7 ^a	5,2 \pm 4,7 ^a
	MMM (%)	71,1 \pm 5,4 ^b	52,1 \pm 5,4 ^a	55,1 \pm 5,9	64,0 \pm 5,9	66,5 \pm 5,9

Los resultados se presentan como medias mínimo cuadráticas \pm error estándar (LSM \pm SE).

MT: móviles totales; MP: móviles progresivos; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad lineal; VAP: velocidad media del trayecto; LIN: índice de linealidad; STR: índice de rectitud; WOB: índice de oscilación; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: frecuencia de batido del flagelo; VIVOS: espermatozoides vivos independientemente de que tengan el acrosoma reaccionado o no; VAI: espermatozoides vivos con el acrosoma intacto; AR: espermatozoides vivos y muertos con el acrosoma dañado; VMB: espermatozoides vivos con mitocondrias activas; VMM: espermatozoides vivos con mitocondrias con baja actividad; MMB: espermatozoides muertos con mitocondrias activas; MMM: espermatozoides muertos con mitocondrias inactivas.

^{a, b, ab} : Valores con distintos superíndices indican diferencias entre el tratamiento con plasma y sin plasma y diferencias entre los distintos tiempos durante la incubación (P < 0,05).

Después de la descongelación, las únicas variables en las que no se observó un efecto significativo ($P > 0.05$) del plasma seminal son algunas de las variables de movilidad cuando se considera sólo a la población de móviles (VSL, VAP, LIN, STR y WOB). En los valores de citometría de flujo, únicamente es similar el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática dañada y mitocondrias funcionales en ambos tratamientos ($11,6 \pm 4,4$ y $6,2 \pm 4,4$ en las muestras congeladas con y sin plasma seminal, respectivamente).

Para el resto de variables analizadas se observó un efecto perjudicial del plasma seminal ($P < 0.05$). Así, las muestras congeladas sin plasma seminal presentaron más del doble de espermatozoides móviles totales y móviles progresivos, espermatozoides con membrana plasmática intacta y espermatozoides con membranas plasmáticas y acrosomal intactas que las muestras congeladas con plasma seminal. Además, el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta y mitocondrias funcionales fue casi el triple en las muestras procesadas sin plasma seminal que en las procesadas con plasma seminal. Por otra parte, las muestras congeladas con plasma seminal presentaron un elevado porcentaje de espermatozoides con el acrosoma reaccionado, casi el doble que las muestras congeladas sin plasma seminal. En cuanto a los parámetros de motilidad obtenidos al considerar la población total (móviles e inmóviles), se observaron siempre valores más bajos en las muestras congeladas con plasma seminal. Esta observación es lógica, considerando que estas muestras presentaron una menor población de espermatozoides móviles.

Respecto al factor tiempo de incubación, no existieron diferencias significativas entre los tiempos de incubación para las variables de MT y de velocidad STR, ALH, STR_{TOTAL}, ALH_{TOTAL} y BCF_{TOTAL}. Para el resto de variables se observaron diferencias significativas entre tiempos de incubación ($P < 0.05$), disminuyendo los valores conforme avanza la incubación, a excepción de la variable BCF (Hz) que aumentó ligeramente conforme avanzaba el tiempo de incubación. En cuanto a los resultados obtenidos a través de citometría de flujo, existieron diferencias significativas en las variables VMM (%) y MMB (%) aumentando y disminuyendo, respectivamente, conforme avanzaba el tiempo de incubación. En el resto de resultados de citometría no tuvo efecto el tiempo de incubación.

La interacción entre los factores plasma seminal y tiempo de incubación no fue significativa, es decir, ambos tratamientos (con y sin plasma seminal) se comportaron de forma similar, disminuyendo en ambos casos la calidad del semen descongelado

conforme avanzaba la incubación después de la descongelación. Los resultados desglosados por tratamiento y tiempo se muestran en la *Tabla 4*.

Tabla 4. Evolución de la calidad del semen de caprino (n = 13 eyaculados) congelado con y sin plasma seminal en incubación a 37°C después de la descongelación durante 180 minutos (interacción plasma seminal x tiempo de incubación).

CALIDAD DEL SEMEN DESCONGELADO (PLASMA x TIEMPO)		CON PLASMA SEMINAL			SIN PLASMA SEMINAL		
		10	90	180	10	90	180
MT(%)		15,5 ± 4,7	12,8 ± 4,7	9,8 ± 4,7	37,7 ± 4,7	28,1 ± 4,7	27,8 ± 4,7
	MP(%)	11,1 ± 3,5	8,1 ± 3,5	5,1 ± 3,5	26,8 ± 3,5	17,4 ± 3,5	16,5 ± 3,5
<u>POBLACIÓN DE MÓVILES</u>	VCL (µm/s)	93,1 ± 7,6	80,1 ± 7,6	67,8 ± 7,6	103,6 ± 7,6	87,4 ± 7,6	77,4 ± 7,6
	VSL (µm/s)	67,1 ± 6,1	50,6 ± 6,1	42,0 ± 6,1	73,8 ± 6,1	51,0 ± 6,1	42,3 ± 6,1
	VAP (µm/s)	76,6 ± 6,4	57,9 ± 6,4	47,8 ± 6,4	84,4 ± 6,4	59,8 ± 6,4	49,9 ± 6,4
	LIN (%)	64,9 ± 4,7	59,1 ± 4,7	56,8 ± 4,7	70,1 ± 4,7	57,5 ± 4,7	55,2 ± 4,7
	STR (%)	76,8 ± 4,4	81,4 ± 4,4	77,7 ± 4,4	83,6 ± 4,4	81,8 ± 4,4	81,5 ± 4,4
	WOB (%)	75,0 ± 4,4	69,4 ± 4,4	65,9 ± 4,4	80,8 ± 4,4	64,5 ± 4,4	65,8 ± 4,4
	ALH (µm)	2,1 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,1 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,2
	BCF (Hz)	9,4 ± 0,8	11,7 ± 0,8	9,9 ± 0,8	11,0 ± 0,8	12,2 ± 0,8	11,2 ± 0,8
<u>POBLACIÓN TOTAL</u>	VCL _{TOTAL} (µm/s)	14,9 ± 5,0	9,8 ± 5,0	7,4 ± 5,0	41,2 ± 5,0	26,3 ± 5,0	23,4 ± 5,0
	VSL _{TOTAL} (µm/s)	10,9 ± 3,6	6,3 ± 3,6	4,2 ± 3,6	29,3 ± 3,6	15,1 ± 3,6	12,9 ± 3,6
	VAP _{TOTAL} (µm/s)	12,4 ± 4,0	7,1 ± 4,0	5,0 ± 4,0	33,6 ± 4,0	17,8 ± 4,0	15,2 ± 4,0
	LIN _{TOTAL} (%)	11,3 ± 3,3	7,7 ± 3,3	5,4 ± 3,3	26,3 ± 3,3	16,0 ± 3,3	15,4 ± 3,3
	STR _{TOTAL} (%)	13,2 ± 4,1	10,6 ± 4,1	7,9 ± 4,1	31,4 ± 4,1	23,0 ± 4,1	22,8 ± 4,1
	WOB _{TOTAL} (%)	12,8 ± 3,7	8,9 ± 3,7	6,5 ± 3,7	30,5 ± 3,7	19,1 ± 3,7	18,4 ± 3,7
	ALH _{TOTAL} (µm)	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1
	BCF _{TOTAL} (Hz)	1,6 ± 0,6	1,5 ± 0,6	1,1 ± 0,6	4,1 ± 0,6	3,6 ± 0,6	3,3 ± 0,6
<u>PI- FITC PNA- HOECHST</u>	VIVOS (%)	16,2 ± 4,8	16,8 ± 4,8	15,6 ± 4,8	36,1 ± 4,8	38,3 ± 4,8	36,8 ± 4,8
	VAI (%)	16,0 ± 4,8	16,6 ± 4,8	15,4 ± 4,8	36,1 ± 4,8	38,1 ± 4,8	36,5 ± 4,8
	AR (%)	52,6 ± 5,3	58,7 ± 5,3	57,3 ± 5,3	22,5 ± 5,3	22,2 ± 5,3	23,0 ± 5,3

MITOTRACKER- HOECHST	VMB (%)	13,6 ± 4,6	12,9 ± 4,6	10,4 ± 4,6	37,8 ± 4,6	36,5 ± 4,6	30,8 ± 4,6
	VMM (%)	2,8 ± 1,6	4,7 ± 1,6	5,8 ± 1,6	4,1 ± 1,6	6,5 ± 1,6	9,4 ± 1,6
	MMB (%)	17,8 ± 5,7	8,6 ± 5,7	8,3 ± 5,7	13,7 ± 5,7	2,9 ± 5,7	2,1 ± 5,7
	MMM (%)	65,7 ± 7,0	73,8 ± 7,0	75,4 ± 7,0	44,4 ± 7,0	54,1 ± 7,0	57,6 ± 7,0

Los resultados se presentan como medias mínimo cuadráticas ± error estándar (LSM ± SE).

MT: móviles totales; MP: móviles progresivos; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad lineal; VAP: velocidad media del trayecto; LIN: índice de linealidad; STR: índice de rectitud; WOB: índice de oscilación; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: frecuencia de batido del flagelo; VIVOS: espermatozoides vivos independientemente de que tengan el acrosoma reaccionado o no; VAL: espermatozoides vivos con el acrosoma intacto; AR: espermatozoides vivos y muertos con el acrosoma dañado; VMB: espermatozoides vivos con mitocondrias activas; VMM: espermatozoides vivos con mitocondrias con baja actividad; MMB: espermatozoides muertos con mitocondrias activas; MMM: espermatozoides muertos con mitocondrias inactivas.

- b. Experimento 2. Efecto del plasma seminal sobre la calidad *in vitro* de los espermatozoides de caprino en las distintas etapas del protocolo previas a la congelación.

En el segundo experimento, se comparó la calidad *in vitro* de los espermatozoides de caprino procesados con y sin plasma seminal en las distintas etapas del protocolo previas a la congelación. Para ello, se extrajeron 3 eyaculados de 2 machos de raza Murciano-Granadina. Tras la extracción seminal, se seleccionaron sólo aquellos eyaculados que presentaron más de 50% de espermatozoides móviles totales en fresco. Después de realizar esta selección se procesaron 2 eyaculados de 2 machos de raza Murciano-Granadina.

En la *Tabla 5*, se muestran los resultados observados para cada una de las variables de calidad analizadas en las distintas etapas del protocolo previas a la congelación: tras la adición del primer diluyente, después de refrigerar, después de añadir glicerol y, por último, tras el equilibrado.

Tabla 5. Calidad del semen de caprino ($n = 2$ eyaculados) procesado con o sin plasma seminal en las distintas etapas del protocolo previas a la congelación.

CALIDAD DEL SEMEN EN LAS DISTINTAS ETAPAS		DESPUÉS SM1		DESPUÉS REFRIGERADO		DESPUÉS GLICEROL		DESPUÉS EQUILIBRADO	
		CON	SIN	CON	SIN	CON	SIN	CON	SIN
CALIDAD DEL SEMEN EN LAS DISTINTAS ETAPAS	MT(%)	51,5	64,5	42,5	50,0	25,0	51,5	35,5	67,5
	MP(%)	46,0	58,5	34,0	44,0	22,5	47,0	31,0	58,0
<u>POBLACIÓN DE MÓVILES</u>	VCL ($\mu\text{m/s}$)	105,0	99,2	111,5	111,5	121,3	115,8	111,3	109,1
	VSL ($\mu\text{m/s}$)	78,4	73,2	76,4	79,1	80,9	84,7	80,5	82,0
	VAP ($\mu\text{m/s}$)	84,1	78,8	85,6	85,5	92,3	90,2	86,9	89,2
	LIN (%)	75,3	74,9	68,2	70,5	69,2	73,6	73,9	75,1
	STR (%)	91,2	91,9	85,7	90,0	86,1	92,8	91,1	90,8
	WOB (%)	81,2	80,7	77,7	76,9	77,9	78,5	79,8	82,0
	ALH (μm)	2,6	2,4	2,9	3,0	3,0	3,0	2,7	2,6
	BCF (Hz)	13,8	14,5	14,0	14,1	14,2	14,7	14,3	13,0
<u>POBLACIÓN TOTAL</u>	VCL _{TOTAL} ($\mu\text{m/s}$)	53,3	64,0	46,9	55,6	29,7	59,6	39,1	73,7
	VSL _{TOTAL} ($\mu\text{m/s}$)	40,1	47,2	31,9	39,8	20,6	43,6	28,8	55,4
	VAP _{TOTAL} ($\mu\text{m/s}$)	43,2	50,8	35,6	42,9	22,7	46,4	31,0	60,3
	LIN _{TOTAL} (%)	39,0	48,3	28,8	35,7	17,8	37,9	26,6	50,7
	STR _{TOTAL} (%)	46,8	59,3	36,6	45,3	22,3	47,8	32,4	61,3
	WOB _{TOTAL} (%)	42,1	52,0	32,5	38,7	19,5	40,4	28,6	55,4
	ALH _{TOTAL} (μm)	1,3	1,5	1,2	1,5	0,7	1,5	0,9	1,8
	BCF _{TOTAL} (Hz)	7,1	9,4	5,9	7,1	3,6	7,6	5,0	8,8
<u>PI-FITC PNA-HOECHST</u>	VIVOS (%)	53,7	47,8	45,2	50,5	33,9	46,0	34,7	47,6
	VAI (%)	53,4	47,6	44,8	50,3	33,7	45,8	34,4	47,4
	AR (%)	14,8	17,6	18,9	16,7	17,8	15,9	17,8	15,6
<u>MITOTRACKER-HOECHST</u>	VMB (%)	48,8	45,0	39,7	47,5	28,1	45,3	28,5	44,9
	VMM (%)	5,2	4,0	4,5	2,2	4,8	3,2	4,3	3,6
	MMB (%)	6,9	7,1	5,4	9,8	3,4	6,0	5,1	5,3
	MMM (%)	39,1	44,0	50,4	40,5	63,6	45,7	62,1	46,2

Los resultados se presentan como medias no corregidas.

MT: móviles totales; MP: móviles progresivos; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad lineal; VAP: velocidad media del trayecto; LIN: índice de linealidad; STR: índice de rectitud; WOB: índice de oscilación; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: frecuencia de batido del flagelo; VIVOS: espermatozoides vivos independientemente de que tengan el acrosoma reaccionado o no; VAI: espermatozoides vivos con el acrosoma intacto; AR: espermatozoides vivos y muertos con el acrosoma dañado; VMB: espermatozoides vivos con mitocondrias activas; VMM: espermatozoides vivos con mitocondrias con baja actividad; MMB: espermatozoides muertos con mitocondrias activas; MMM: espermatozoides muertos con mitocondrias inactivas.

Debido al bajo número muestral utilizado ($n = 2$), los resultados obtenidos no pueden considerarse todavía ni fiables ni concluyentes. No obstante, a continuación comentaré algunos de los resultados más destacables, a espera de confirmar en el futuro con un mayor número de muestras y de machos si estos resultados son repetibles.

En general, las muestras procesadas con plasma seminal presentaron una calidad inferior para las variables MT, MP, VIVOS y VMB en prácticamente todas las etapas del protocolo estudiadas. Es destacable la brusca disminución de calidad que experimentaron las muestras procesadas con plasma seminal después de añadir el glicerol, en comparación con los espermatozoides que no tenían plasma seminal. Por último, se puede destacar el aumento que se observó en MT y MP para los dos tipos de muestras (con y sin plasma seminal) después de la fase de equilibrado en comparación con sus resultados en la etapa previa. No obstante, hubo algunas diferencias entre ambos tratamientos. Así, la calidad de las muestras procesadas sin plasma seminal tras la fase de equilibrado fue muy similar a la que presentaron esas mismas muestras en el primer paso del protocolo, tras la adición de SM1. Sin embargo, en las muestras procesadas con plasma seminal y en el paso previo al de congelación propiamente dicha, las muestras sólo conservaron entre el 58% y el 69% de los valores para MT, MP, VIVOS y VMB que presentaron en el primer paso del protocolo de congelación. Es decir, que el efecto perjudicial del plasma seminal en esta especie ya se manifestó en los pasos previos al paso de congelación-descongelación propiamente dicho.

5. DISCUSIÓN

La evaluación de la fertilidad del semen de un macho cabrío es importante, ya que ayuda a determinar si existen alteraciones en la producción o calidad seminal, buscándose siempre índices altos de fertilidad entre animales. De igual modo, el análisis de semen en los programas de mejora genética es fundamental, permitiendo la previa eliminación de machos estériles antes de su uso en campo.

Por otro lado, la evaluación previa de la capacidad fecundante de los espermatozoides se considera una herramienta útil para el estudio de la efectividad de distintas técnicas de conservación de semen. La evaluación de la fertilidad es más convincente a través de una prueba *in vivo*. Sin embargo, la prueba *in vivo* muestra una serie de desventajas como son su elevado coste y el hecho de que los resultados no son inmediatos, por lo que se realizan pruebas de fertilidad *in vitro* para evaluar la calidad de las muestras antes de su uso en las granjas (Graham & Mocé, 2005).

En cuanto a los análisis *in vitro* utilizados para evaluar la calidad seminal, destacan la evaluación de la motilidad y viabilidad espermática. Para realizar estas evaluaciones se utilizan los sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) y la citometría de flujo, respectivamente (Graham & Mocé, 2005). Estas pruebas contribuyen a la detección de machos infértiles o con baja fertilidad previamente a ser utilizados en campo, mencionado anteriormente, y se realizan en especies cuya obtención de gametos femeninos no es factible de manera regular, como es la especie caprina.

En este trabajo, por un lado, se evaluó la motilidad espermática a través del sistema CASA, obteniendo así tanto el porcentaje de espermatozoides móviles y progresivos como las velocidades y ratios de las trayectorias mostradas por los espermatozoides.

Por otro lado, mediante la técnica de citometría de flujo se analizó la integridad espermática a través de una serie de fluorocromos. Se eligieron tres estructuras a analizar: la integridad de la membrana plasmática, estructura fundamental para el metabolismo espermático e imprescindible para la fecundación; las mitocondrias, encargadas de producir la energía necesaria para que el espermatozoide pueda avanzar en el tracto reproductivo femenino hasta alcanzar el oviducto, donde se produce la fecundación del óvulo, y por último, el acrosoma, situado en la porción proximal de la cabeza del espermatozoide y cuya función es degradar los componentes de la zona

pelúcida del óvulo para fusionarse con su membrana y fecundarlo. La integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides fue observada utilizando el fluorocromo Yoduro de Propidio (PI) que emite fluorescencia roja cuando se une a los ácidos nucleicos de los espermatozoides que tienen la membrana celular dañada (Bollwein et al., 2008). La tinción MitoTracker Deep Red permitió evaluar el daño en las mitocondrias (García et al., 2009) emitiendo fluorescencia roja. La tinción Hoechst que emite fluorescencia violeta cuando penetra en todas las células fijándose al ADN permitió diferenciar a los espermatozoides de otros eventos de tamaño similar así como diferenciar espermatozoides con membrana intacta o dañada en función de la intensidad de fluorescencia mostrada. Por último, la tinción fluorescente isotiocianato de fluoresceína unida a la aglutina de cacahuete (FITC-PNA) permitió evaluar los espermatozoides con acrosoma dañado emitiendo fluorescencia verde (Rijsselaere et al., 2005). La ausencia de la fluorescencia en el espermatozoide es un indicativo de un acrosoma intacto, en cambio, la presencia de fluorescencia es indicativo de un daño o reacción acrosomal (Silva y Gadella, 2006).

El primer experimento de este trabajo estudió el efecto del plasma seminal sobre la calidad *in vitro* de los espermatozoides de caprino tras la descongelación, comparándose las dosis congeladas con y sin plasma seminal. Para ello, se realizó un análisis de la calidad del semen fresco y un análisis de la calidad del semen descongelado a tres tiempos (10, 90 y 180 min) durante la incubación a 37°C.

En el caso del semen fresco, no se observó efecto del plasma seminal sobre la mayoría de las variables analizadas. Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre las muestras procesadas con o sin plasma seminal en la variable de población de móviles BCF, obteniéndose un mayor valor para este parámetro en las muestras procesadas sin plasma seminal. Asimismo, las variables de motilidad sobre la población total ALH_{TOTAL} y BCF_{TOTAL} presentan mayores valores en las muestras procesadas sin plasma seminal. Estos mayores valores podrían ser indicativos de una capacitación prematura de los espermatozoides, ya que el aumento de la frecuencia de batido de flagelo y de la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza han sido relacionadas con el patrón de motilidad de hiperactivación en espermatozoides humanos (Mortimer, 1997). Esta diferencia entre las muestras puede deberse a la eliminación de los factores decapacitantes del plasma seminal, ya que no se ha realizado ningún tratamiento adicional para que las muestras presenten ese patrón de motilidad.

Referente al análisis de la calidad del semen descongelado a tres tiempos (10, 90 y 180 min) durante la incubación a 37°C, en la mayoría de variables se observó un efecto perjudicial del plasma seminal a excepción de las variables de motilidad de la población de móviles VSL, VAP, LIN, STR y WOB. Así las muestras procesadas sin plasma seminal mostraron, tras la descongelación, mayores tasas de motilidad y vitalidad de los espermatozoides que las muestras procesadas con plasma seminal, resultados que corroboran a los estudios previos en la especie caprina (Küçük et al., 2014). Por otra parte, se observó un efecto significativo del factor tiempo de incubación para la mayoría de las variables, observándose una disminución de los valores conforme avanzaba la incubación. Sin embargo, se observó un aumento de los valores en la variable BCF sobre la población de móviles, lo que podría ser indicativo de una capacitación prematura de los espermatozoides, como ya se ha mencionado anteriormente. También se observó un aumento en la variable VMM y una disminución de los valores en la variable MMB conforme avanzaba el tiempo de incubación lo que indica que a medida que aumenta el tiempo de incubación hay más espermatozoides vivos con mitocondrias dañadas. Estos resultados son esperados debido a que el proceso de criopreservación da lugar a espermatozoides dañados y capacitados, produciéndose degradación de las membranas espermáticas (Bailey et al., 2000).

En relación a la interacción entre el factor plasma seminal y el factor tiempo de incubación, cabe decir que no fue significativa debido a que las muestras con y sin plasma seminal se comportaron de manera similar, disminuyendo la calidad del semen descongelado conforme aumentaba el tiempo de incubación tras la descongelación.

Es destacable que los porcentajes de VIVOS y de VAI son muy similares, tanto en semen fresco como en descongelado, debido a que hay un bajo porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado. Este resultado es debido a que, una vez se produce la reacción acrosómica y la fusión de la membrana externa del acrosoma con la membrana plasmática, la tinción de Yoduro de Propidio penetra fácilmente debido a que la membrana acrosómica ha sido dañada, dando lugar a la población de muertos con acrosoma dañado (Mocé et al., 2006).

En nuestro estudio, observamos diferencias significativas entre las muestras procesadas con plasma seminal y sin plasma seminal, obteniéndose peores resultados en las muestras con plasma seminal. Esto puede deberse a que la eliminación del plasma seminal beneficia la supervivencia de los espermatozoides durante la incubación (Ritar & Salamon, 2006). Este resultado corrobora a los obtenidos en estudios previos

(Küçük et al., 2014), aunque en nuestro trabajo el plasma seminal provocó un efecto mucho más perjudicial que el que se observa en otros trabajos (80% de VIVOS en muestras con plasma seminal y 85% en muestras sin plasma seminal; Küçük et al., 2014). Lo más probable es que este resultado se deba a la época del año en la que se ha realizado este estudio, que coincide con la estación de anestro estacional en la especie caprina. Así, algunos autores han demostrado el efecto perjudicial del plasma seminal de los eyaculados obtenidos fuera de la estación reproductiva sobre la calidad de los espermatozoides (La Falci et al., 2002), efecto no observado cuando se trabaja con eyaculados obtenidos en estación reproductiva (Leahy et al., 2010).

El efecto perjudicial del plasma seminal sobre la calidad de los espermatozoides congelados-descongelados de caprino ya era conocido (Corteel & Baril, 1974) y, de hecho, se han propuesto diferentes alternativas a lo largo de los años para mejorar la calidad de los espermatozoides congelados en esta especie. Una de las primeras propuestas, y de las más utilizadas también en la actualidad, fue la de eliminar el plasma seminal mediante centrifugación antes de la congelación (Corteel & Baril, 1974) ya que el plasma seminal de esta especie está considerado como un medio inadecuado para mantener la viabilidad espermática tras la eyaculación (Corteel, 1980; Pellicer et al., 1997) y su eliminación aumenta el porcentaje de células viables y su motilidad durante su almacenamiento (Leboeuf et al., 2000). Asimismo, con la eliminación del plasma seminal también se evita la actuación de las lipasas secretadas por la glándula bulbouretral o de Cowper (Kozdrowski et al., 2007), que degradan algunos de los componentes de la yema de huevo y de la leche desnatada produciendo metabolitos tóxicos para los espermatozoides (Pellicer, 1996; Leboeuf et al., 2000), como ya se ha indicado en la introducción. Sin embargo, la eliminación del plasma seminal también provoca cierta pérdida de espermatozoides y de tiempo (Ritar, 1993). Además, el plasma seminal también está compuesto por moléculas antioxidantes, estabilizadores de membrana y azúcares (Küçük et al., 2014), así como por algunas moléculas que participan en el proceso de señalización celular en el interior del tracto reproductivo femenino, en la capacitación y durante el proceso de fecundación (Lopera Vásquez, 2009).

Por otra parte, el plasma seminal también facilita el desarrollo placentario temprano y promueve la fijación e implantación de embriones y regula la proliferación, la viabilidad y la diferenciación de los blastómeros embrionarios (Chenoweth & Lorton, 2014). Debido a sus efectos beneficiosos, se han buscado alternativas a su eliminación. Algunas de ellas se han basado en la búsqueda de otros diluyentes que permitiesen mantener el

plasma seminal pero evitando, a su vez, su efecto perjudicial. Así, la disminución del porcentaje de yema de huevo hasta 1,5% (v/v), permite mantener el plasma seminal y obtener un semen de calidad tras la descongelación (Ritar & Salamon, 2006). No obstante, la calidad del semen obtenida con este diluyente y plasma seminal continúa siendo inferior a la que se obtiene con otras alternativas en las que se elimina el plasma seminal y se utilizan diluyentes con yema de huevo (20%; v/v) o leche desnatada (Konyali et al., 2013). En otros trabajos se han buscado alternativas a los diluyentes con base de leche o yema de huevo. Uno de los que más se han utilizado es la soja, que presenta baja viscosidad y provoca un aumento de la velocidad y el movimiento de las células espermáticas, reemplazando con éxito al diluyente de yema de huevo, sin obtenerse efectos adversos en la motilidad de los espermatozoides tras el proceso de descongelación, en la integridad de la membrana y en la viabilidad espermática (Salmani et al., 2014). En uno de los trabajos más recientes se propone la diálisis del eyaculado antes de ser diluido y congelado, eliminando así el efecto tóxico de las lipasas presentes en el plasma seminal de caprino, obteniéndose un efecto positivo significativo sobre la calidad y viabilidad espermática tras la congelación-descongelación (Premrov Bajuk et al., 2018).

Para planificar alternativas de forma más dirigida a la eliminación del plasma seminal, habría que determinar previamente en qué momento del protocolo de congelación se producen los daños sobre los espermatozoides en las muestras en las que hay plasma seminal. Sin embargo, no hay constancia en la bibliografía de que se haya realizado ese estudio. Por ello, en el segundo experimento se estudió el efecto del plasma seminal sobre la calidad *in vitro* de los espermatozoides de caprino en las distintas etapas del protocolo previas a la congelación, utilizando las mismas técnicas que en el experimento 1. Para ello, se compararon las muestras con y sin plasma seminal tras la adición del primer diluyente (SM1), después de la refrigeración, tras añadir el glicerol y, por último, después del equilibrado.

Como ya se ha comentado previamente, los resultados obtenidos no son concluyentes, ya que se utilizó un número muestral pequeño. A la vista de los resultados obtenidos en el experimento 2, el efecto perjudicial del plasma seminal ya se observa en la etapa tras la adición del glicerol, disminuyendo la calidad de las muestras procesadas con plasma seminal, en comparación con las muestras procesadas sin plasma. Aunque se desconoce cuál es el efecto del plasma seminal, el hecho de que la calidad de las muestras descienda bruscamente después de añadir el glicerol podría indicar que el plasma seminal provoque alteraciones en la permeabilidad de la membrana y, de este

modo, los espermatozoides sufran más efectos osmóticos. No obstante, esta teoría tendría que demostrarse en experimentos futuros. De ser así, una posible solución podría basarse en la reducción de la cantidad de glicerol y/o en la adición del glicerol en más pasos para minimizar los efectos osmóticos. También podrían utilizarse crioprotectores más permeables, que provocan menos efectos osmóticos en los espermatozoides. Por otro lado, se observan diferencias significativas para las variables de velocidad (VCL, VSL y VAP) en cada etapa, resultados similares a los obtenidos en el estudio de Barbas et al. (2018), en el que se emplea también un protocolo en el que se elimina el plasma seminal. Asimismo, los valores de velocidad espermática aumentan a lo largo del proceso de conservación mientras que los valores de linealidad se mantienen constantes. También cabe destacar que se observa un aumento en las variables de motilidad MT y MP en las muestras procesadas con y sin plasma seminal tras la etapa de equilibrado, si comparamos los resultados con los obtenidos en la etapa tras la adición del glicerol. Se ha sugerido que la etapa de equilibrado es necesaria en los protocolos de congelación de semen para que se produzcan cambios protectores en la membrana (Gao et al., 1997) y es posible que este aumento en los porcentajes de móviles totales y progresivos indique que estos cambios en la membrana se han producido y/o bien que los espermatozoides han terminado de adaptarse a las condiciones osmóticas.

6. CONCLUSIÓN

Como conclusión, los resultados obtenidos en ambos experimentos demuestran que el plasma seminal es perjudicial para la congelación del semen en la especie caprina. Además, estos efectos perjudiciales ya se manifiestan en etapas previas a la de la congelación propiamente dicha. Así, los espermatozoides procesados con plasma seminal ya muestran una drástica reducción de los parámetros de calidad tras la adición del glicerol.

7. LÍNEAS FUTURAS

En un futuro debe completarse el segundo experimento mediante el procesado de un mayor número de muestras para corroborar si la calidad de los espermatozoides en las muestras procesadas con plasma seminal disminuye drásticamente tras la adición del glicerol. Los resultados obtenidos a partir del segundo experimento sirven en un futuro para proponer modificaciones en el protocolo de congelación que permitan mantener el plasma seminal en las dosis de semen congelado de ganado caprino.

8. BIBLIOGRAFÍA Y WEBGRAFÍA

- Aboagla, E., & Terada, T. (2003). *Trehalose-Enhanced Fluidity of the Goat Sperm Membrane and Its Protection During Freezing* | *Biology of Reproduction* | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/biolreprod/article/69/4/1245/2712656>
- Aisen, E. G., Medina, V. H., & Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57(7), 1801-1808. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00653-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00653-2)
- Alcántara Huete, I. M., & Espinoza Granados, N. J. (1999). *Comparación de parámetros reproductivos bajo inseminación artificial y monta natural en cerdas, (Cofradia, G.E.P.)* [Engineer, Universidad Nacional Agraria, UNA]. <https://repositorio.una.edu.ni/1286/>
- Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 7(3), 145-173. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(87\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80025-4)
- Amoah, E. A., & Gelaye, S. (1997). Biotechnological advances in goat reproduction. *Journal of Animal Science*, 75(2), 578-585. <https://doi.org/10.2527/1997.752578x>
- Bailey, J. L., Blodeau, J.-F., & Cormier, N. (2000). Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon Minireview. *Journal of Andrology*, 21(1), 1-7. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03268.x>
- Barbas, J. P., Leahy, T., Horta, A. E., & García-Herreros, M. (2018). Sperm kinematics and subpopulational responses during the cryopreservation process in caprine ejaculates. *Cryobiology*, 82, 137-147. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.03.005>
- Barrera Ramírez, L. M., Drago Serrano, M. E., Pérez Ramos, J., Sainz Espuñes, T. D. R., Zamora, A. C., Gómez Arroyo, F., & Mendoza Pérez, F. (2004). CITOMETRÍA DE FLUJO: VÍNCULO ENTRE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA Y LA APLICACIÓN CLÍNICA. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(1), 42-55.

- Blash, S., Melican, D., & Gavin, W. (2000). Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology*, 54(6), 899-905. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00400-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00400-3)
- Bollwein, H., Fuchs, I., & Koess, C. (2008). Interrelationship Between Plasma Membrane Integrity, Mitochondrial Membrane Potential and DNA Fragmentation in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(2), 189-195. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00876.x>
- Cervera, E. M., Granell, M. M., Bernácer, J., Palazón, S. À. L., Vicente, C., Cervera, M. L. M., García, R. L., & Blasco, E. Á. G. (2019). La albor de los centros de sementales en el Programa de mejora genética de ganado caprino de la raza Murciano-Granadina: Reproducción y genética. *Tierras. Ovino*, 25, 34-42.
- Chenoweth, P. J., & Lorton, S. (2014). *Animal Andrology: Theories and Applications*. CABI.
- Clark, V., & SAS Institute (Eds.). (2004). *SAS/STAT 9.1: User's guide*. SAS Pub. https://support.sas.com/documentation/onlinedoc/91pdf/sasdoc_91/stat_ug_7313.pdf
- Contreras Gómez, S. J. (2018). Relación entre la calidad in vitro de los eyaculados y la fertilidad in vivo de dosis refrigeradas de caprino de raza Murciano-Granadina (trabajo fin de máster). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España. https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/115356/memoria_27365119.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Corteel, J. M. (1980). Effets du plasma séminal sur la survie et la fertilité des spermatozoïdes conservés in vitro. *Reproduction Nutrition Développement*, 20(4A), 1111-1123. <https://doi.org/10.1051/rnd:19800619>
- Corteel, J.-M., & Baril, G. (1974). VIABILITÉ DES SPERMATOZOÏDES DE BOUC CONSERVÉS ET CONGELÉS AVEC OU SANS LEUR PLASMA SÉMINAL: EFFET DU GLUCOSE. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, 14(4B), 741-745. <https://doi.org/10.1051/rnd:19740502>

Cortés Gallego, S. (2003). Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino (tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. <https://eprints.ucm.es/4195/>

Cupps, P. T. (1991). *Reproduction in Domestic Animals*. Elsevier. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=bbb-ow0N7K4C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Reproduction+in+Domestic+Animals&ots=mnxty1qV0X&sig=vDAqikShTlrDj9eGHgU4GxZZabQ&redir_esc=y#v=onepage&q=Reproduction%20in%20Domestic%20Animals&f=false

Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. (2020). *El sector ovino y caprino de leche en cifras*. Recuperado en mayo de 2020, de Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicosdelsectorovinoycaprinodeleche2019_ene20_tcm30-109075.pdf

Fraser, L., Strzezek, J., & Cidoncha, F. S. (2001). *Variaciones en el movimiento de los espermatozoides de verraco durante la administración de acetato de ciproterona (ACP)*. 16, 8.

Fukuhara, R., & Nishikawa, Y. (1972). *Effects of pH, Sperm Concentration, Washing and Substrate Concentration on Respiration and Motility of Goat Spermatozoa*. College of Agriculture, Kyoto University. <https://pdfs.semanticscholar.org/549e/1fb3803d7671df59aa2904ad6df24eeae7a0.pdf>

Gao, D., Mazur, P., & Critser, J. K. (1997). - Fundamental Cryobiology of Mammalian Spermatozoa. En A. M. Karow & J. K. Critser (Eds.), *Reproductive Tissue Banking* (pp. 263-328). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012399770-8/50007-1>

García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M. R., Esteso, M. C., Pérez-Guzmán, M. D., & Soler, A. J. (2009). Heterologous in vitro fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, 71(4), 643-650. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.036>

García, W., Tabarez, A., Terre, M., Ferrando, A., Jordana, J. & Palomo, M. J. (2013). *Efecto del tipo de yema de huevo, eliminación del plasma seminal y edad del donante en la crioconservación de semen ovino de las razas xisqueta, aranesa y caprino de la raza*

blanca de rasquera. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
http://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2013/comunicaciones/2013_Rep_30.pdf

Graham, J. K., & Mocé, E. (2005). Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, 64(3), 492-504. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.006>

Graham, James K. (2001). Assessment of sperm quality: A flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*, 68(3), 239-247. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00160-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00160-9)

Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2013). *Reproduction in Farm Animals*. John Wiley & Sons.

Hammerstedt, R. H., Graham, J. K. & Nolan, J. P. (1990). *Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive*. *Journal of Andrology*, Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x>

Holt, W. V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1), 3-22. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4)

Konyali, C., Tomás, C., Blanch, E., Gómez, E. A., Graham, J. K., & Mocé, E. (2013). Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology*, 67(2), 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.06.001>

Kozdrowski, R., Dubiel, A., Bielas, W., & Dziecioł, M. (2007). Two Protocols of Cryopreservation of Goat Semen with the Use of Computer-Assisted Semen Analysis System. *Acta Veterinaria Brno*, 76(4), 601-604. <https://doi.org/10.2754/avb200776040601>

Kundu, C. N., Chakraborty, J., Dutta, P., Bhattacharyya, D., Ghosh, A., & Majumder, G. C. (2000). Development of a Simple Sperm Cryopreservation Model Using a Chemically Defined Medium and Goat Cauda Epididymal Spermatozoa. *Cryobiology*, 40(2), 117-125. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2230>

Kundu, C. N., Das, K., & Majumder, G. C. (2001). Effect of Amino Acids on Goat Cauda Epididymal Sperm Cryopreservation Using a Chemically Defined Model System. *Cryobiology*, 42(1), 21-27. <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2296>

- La Falci, V. S. N., Tortorella, H., Rodrigues, J. L., & Brandelli, A. (2002). Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology*, 57(3), 1035-1048. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00714-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00714-2)
- Lahnsteiner, F., Patzner, R., & Weismann, T. (1993). Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei). *Reproduction Nutrition Development*, 33(4), 349-360. <https://doi.org/10.1051/rnd:19930404>
- Leahy, T., Marti, J. I., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2010). Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 119(1), 147-153. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.12.010>
- Leboeuf, B., Delgadillo, J. A., Manfredi, E., Piacere, A., Clement, V., Martin, P., Pellicer-Rubio, M. T., Boué, P., & Cremoux, R. D. (2008). Place de la maîtrise de la reproduction dans les schémas de sélection en chèvres laitières. *INRAE Productions Animales*, 21(5), 391-402. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2008.21.5.3414>
- Leboeuf, B., Restall, B., & Salamon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62(1), 113-141. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00156-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00156-1)
- Lopera Vázquez, R. (2009). Estudio de factores que influyen en la fecundación *in vitro* heteróloga entre espermatozoides de caprino y oocitos de bovino madurados *in vitro* (tesis de Máster). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/11873/Tesis%20Master%20RICAURTE%20LOPERA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- López-Gatius, F. (2012). Factors of a noninfectious nature affecting fertility after artificial insemination in lactating dairy cows. A review. *Theriogenology*, 77(6), 1029-1041. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.014>
- Lopez-Sebastián, A., Coloma, M. A., Toledano, A., & Santiago-Moreno, J. (2014). Hormone-free Protocols for the Control of Reproduction and Artificial Insemination in Goats. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(s4), 22-29. <https://doi.org/10.1111/rda.12394>

- Martínez-Pastor, F., Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel, L., & Paz, P. D. (2010). Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(s2), 67-78. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01622.x>
- Mocé, E. (2012). Tecnología del semen. En Francisco Marco Jiménez y José Salvador Antón (Ed.), *Fundamentos y técnicas de la reproducción: mejora genética animal y biotecnología de la reproducción* (pp. 105-145). Universidad Politécnica de Valencia. https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/72469/TOC_0443_12_01.pdf?sequence=5&isAllowed=y
- Mocé, E., Graham, J. K., & Schenk, J. L. (2006). Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. *Theriogenology*, 66(4), 929-936. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.063>
- Mogielnicka-Brzozowska, M., & Kordan, W. (2011). Characteristics of selected seminal plasma proteins and their application in the improvement of the reproductive processes in mammals. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 14(3), 489-499. <https://doi.org/10.2478/v10181-011-0074-z>
- Mortimer, S. T. (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update*, 3(5), 403-439. <https://doi.org/10.1093/humupd/3.5.403>
- Ortiz-Rodríguez, J. M., Anel-Lopez, L., Martín-Muñoz, P., Álvarez, M., Gaitskell-Phillips, G., Anel, L., Rodríguez-Medina, P., Peña, F. J., & Ortega Ferrusola, C. (2017). Pulse Doppler ultrasound as a tool for the diagnosis of chronic testicular dysfunction in stallions. *PLoS ONE*, 12(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175878>
- Palomino, J. M., Cervantes, M., Rodríguez, A., Cisneros, F & Huanca, W. (2007). UNSCH, Ayacucho, Perú. http://produccion-animal.com.ar/produccion_caprina/inseminacion_transferencia_caprino/22-Palomino-SemenCaprino.pdf
- Pellicer-Rubio, M.-T., Magallon, T., & Combarous, Y. (1997). Deterioration of Goat Sperm Viability in Milk Extenders is due to a Bulbourethral 60-Kilodalton Glycoprotein with

Triglyceride Lipase Activity. *Biology of Reproduction*, 57(5), 1023-1031.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod57.5.1023>

Polge, C., Smith A. U. & Parkes, A. S. (1949). Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*, 164, 666.
<https://www.nature.com/articles/164666a0>

Premrov Bajuk, B., Pihlar, T., Pogačnik, N., & Klinc, P. (2018). Dialysis of the goat semen and its effect on the quality of frozen/thawed spermatozoa processed in the presence of egg yolk. *Animal Reproduction Science*, 198, 65-73.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.09.001>

Purdy, P. H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63(3), 215-225. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015>

Rijsselaere, T., Van Soom, A., Tanghe, S., Coryn, M., Maes, D., & de Kruif, A. (2005). New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Theriogenology*, 64(3), 706-719. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.021>

Ritar, A. J. (1993). Control of ovulation, storage of semen, and artificial insemination of fibre-producing goats in Australia: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 33(6), 807-820. <https://doi.org/10.1071/ea9930807>

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. *Australian Journal of Biological Sciences*, 35(3), 305-312.
<https://doi.org/10.1071/bi9820305>

Rodríguez, G. J., Barrios-Arpi, M., Huanca, L. W., Rodríguez, G. A., & Revuelta, L. (2016). Niveles de glucosa y triglicéridos en plasma seminal y motilidad espermática en COBAYOS alimentadas con 10% más en energía digestible. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 10(1), 75-82.
https://doi.org/10.5209/rev_RCCV.2016.v10.n1.52501

Rodríguez, P. J. (2014). *Operaciones básicas de control sanitario de animales. agax0108 - actividades auxiliares en agricultura (Spanish Edition)* (1.^a ed.). Madrid, España: IC Editorial.

- Roy, A. (1957). Egg yolk-coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature*, 179(4554), 318-319. <https://doi.org/10.1038/179318b0>
- Rubio, P., & Teresa, M. (1996). *Conservación del semen caprino. Interacción entre la secreción bulbouretral y el diluyente leche: Identificación y mecanismo de acción de los componentes implicados en el deterioro espermático / María Teresa Pellicre Rubio ; directores Salvador Ruiz López, Yves Combarrous.* <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/33220>
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37(3), 185-249. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)01327-I](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01327-I)
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1), 77-111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)
- Salmani, H., Towhidi, A., Zhandi, M., Bahreini, M., & Sharafi, M. (2014). In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*, 68(2), 276-280. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.008>
- Silva, P. F. N., & Gadella, B. M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65(5), 958-978. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010>
- Silvestre, M. A., Salvador, I., Sánchez, J. P., & Gómez, E. A. (2004). Effect of changing female stimulus on intensive semen collection in young Murciano-Granadina male goats. *Journal of Animal Science*, 82(6), 1641-1645. <https://doi.org/10.2527/2004.8261641x>
- Williams, A. C., & Ford, C. W. (2001). *The Role of Glucose in Supporting Motility and Capacitation in Human Spermatozoa.* *Journal of Andrology*, Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02229.x>
- Thibier, M., & Guerin, B. (2000). Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 233-251. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00161-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00161-5)

Tonieto, R. A., Goularte, K. L., Gastal, G. D. A., Schiavon, R. S., Deschamps, J. C., & Lucia, T. (2010). Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Ruminant Research*, 93(2), 206-209. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.05.003>

Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871-891. <https://doi.org/10.1071/rd9950871>