

Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias Agroalimentarias
Escuela de Zootecnia

***Desarrollo de un centro de procesamiento y conservación de semen caprino
en la Estación Experimental “Alfredo Volio Mata”
de la Universidad de Costa Rica***

***Proyecto de tesis presentado a la Escuela de Zootecnia como requisito
parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica con
énfasis en Zootecnia***

Roberto José Cárdenas Quesada
Carné: 980759

CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO
2008

TRIBUNAL EXAMINADOR

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Zootecnia como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica con énfasis en Zootecnia.

Aprobado por el siguiente Tribunal Examinador:

Msc. Carlos Boschini Figueroa
Director de Tesis

Ing. Fabián Vargas Rodríguez
Miembro del Tribunal

Dr. Claudio Brenes Matarrita
Miembro del Tribunal

Msc. María Isabel Camacho Cascante
Miembro del Tribunal

Roberto José Cárdenas Quesada
Sustentante

DEDICATORIA

A mis padres y don Carlos B.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento, a todas las personas que de una u otra manera han sido parte esencial en mi vida y la han enriquecido aun más con su presencia, apoyo y consejos:

A José Roberto Cárdenas Jiménez y Jenny Quesada Gamboa, mis padres por cultivarme durante mi vida, por comprenderme, por apoyarme, por brindarme el mejor cariño y confianza que todo hijo puede desear, por todos estos años de gran sacrificio, ahora comprendo lo bien que sabe el éxito cuando se ha luchado..., por todos y cada uno de los momentos que vivimos juntos como verdadera familia, recuerdo siempre sus consejos “lucha por tus sueños siempre y busca la felicidad”. Gracias papa, gracias mama, los amo.

A mis hermanas Jenny Paz Cárdenas Quesada y Ana Jeannette Cárdenas Quesada, por ser mis amores, por brindarme confianza, cariño, por estar conmigo siempre, porque seguimos juntos cabalgando los caminos de la vida, hay mucho que explorar juntos así que “vamos hacia adelante, hacia el sol” nos espera la vida y no se olviden de cosechar sus sueños e ideales, las amo, ONE LOVE.

Este trabajo va dedicado a mi GRAN FAMILIA, todos indirectamente han contribuido en mí, para lograr sacar adelante este proyecto, abuelos, tías, tíos, primos, TODOS siempre en mi corazón.

A don Carlos Boschini Figueroa, profesor, director, jefe, amigo, porque recuerdo muy bien el día que me dijo “Roberto tengo un proyecto muy interesante para usted”. Por inculcarme amor al trabajo, mística, paciencia, por estar siempre comprometido a hacer y dar lo mejor de sí, este trabajo es dedicado a usted don Carlos por ser el líder y guiar de forma comprometida una institución, un hogar como lo es la Estación Experimental Alfredo Volio Mata de la Universidad de Costa Rica. Gracias.

A todos los compañeros de la Estación Experimental Alfredo Volio Mata por su ayuda y apoyo desmesurado e incondicional a través de todo este tiempo, siempre recordare lo especial que me hicieron sentir aquí.

A Willy “the kid” por ser parte indispensable en este proyecto, colaborando incondicionalmente con todo el proceso, desde un principio, siempre fueron palabras de apoyo, soluciones y respuestas combinadas con un toque de gracia y simpatía a través de las labores del día, gracias “mop” por tu sincera amistad.

A Javier A. “Yayita”. Por toda la ayuda brindada, por dejarme ser parte de tus proyectos, en especial el de hidroponía al cual le has dedicado mucho entusiasmo, “solo bueno el tomatico”, por dejarme participar de aulas móviles y llegar muy lejos capacitando a la gente que lo necesita. Gracias Yayita por ser un amigo incondicional.

A Alejandro Chacón por su amistad, colaboración desinteresada y haberme asesorado con la escritura de este proyecto.

A Fabián Vargas por ser un compañero, un amigo al cual le tengo plena confianza y respeto, gracias “viejillo”.

A David Mora por todo su apoyo, amistad y compañía a través de todo este tiempo, por lo buenos momentos compartidos y el interesante dialogo (tratando de arreglar el mundo) que siempre hemos tenido. Gracias.

Al hato de cabros y cabritas que se prestaron para realizar todas las pruebas realizadas, sin ellos no hubiese sido posible este proyecto.

Al Centro de Inseminación Artificial (CIA) del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) por haberme brindado toda la asesoría en congelamiento de semen bovino.

En fin a todos los compañeros y profesores de la Escuela de Zootecnia que me acompañaron, me ayudaron y me apoyaron a lo largo de todos estos años de estudio en esta institución la Universidad de Costa Rica que siempre llevaré en mi corazón.

INDICE DE CONTENIDO

Página

1.INTRODUCCIÓN	1
2.OBJETIVOS	4
2.1. Objetivos Generales	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3.REVISION BIBLIOGRÁFICA	5
3. 1.- Semen y sus características	5
3.1.1.- El plasma seminal	6
3.1.2.- Espermatozoides	9
3.1.3.- Estructura de los espermatozoides	9
3.1.4.- Morfología del espermatozoide	10
a.- Cabeza	10
b.- Acrosoma	10
c.- Cola	11
3.1.5.- Composición química de los espermatozoides	13
3.1.6.- Metabolismo de los espermatozoides	13
3.1.7.- Factores que afectan a la supervivencia de los espermatozoides	13
3.2.- Selección y preparación de los machos para los programas de inseminación artificial	17
3.2.1.- Selección de los sementales cabríos	17
3.2.2.- Selección de sementales jóvenes	18
3.2.3.- Preparación de los machos cabríos	22
3.2.4.- Entrenamiento de los machos para la colección de semen	24
3.2.5.- Esterilidad en el macho cabrío	25
3.2.6.- Evaluación de un semental cabrío	27
3.2.7.- Problemas individuales de los machos cabríos	32
3.3.- Recolección de semen	34
3.3.1.- Recolección de semen por vagina artificial	35
3.3.2.- Recolección por estímulo eléctrico	39
3.4.- Manejo y valoración del semen	40
3.4.1.- Color y olor del semen	40
3.4.2.- Volumen del semen	41
3.4.3.- Motilidad de los espermatozoides	42
3.4.4.- Concentración de espermatozoides	47
3.4.5.- Métodos de conteo de espermatozoides en eyaculado	49
3.4.6.- Consistencia del semen	53

3.4.7.- Morfología de los espermatozoides	53
3.5.- Dilución del semen	57
3.5.1.- Diluyentes	59
3.5.2.- Diluyentes para utilizar semen en fresco	61
a.- Diluyentes sintéticos	61
b.- Diluyentes naturales	62
3.5.3.- Diluyentes para utilizar semen congelado	64
3.5.4.- Método de dilución	66
3.5.5.- Grado de dilución	67
3.5.6.- Volumen de inseminado	67
3.5.7.- Número de espermatozoides en el inseminado	67
3.5.8.- Pasos a seguir para la dilución del semen	69
3.6.- Conservación del semen durante corto tiempo	70
3.7.- Conservación del semen durante largo tiempo	73
3.8.- Conservación del semen congelado	74
3.8.1. Utilización de semen congelado en cabras	76
3.8.2. Métodos de procesar y congelar el semen	79
3.9.- Control del semen después de descongelado	81
3.9.1. Congelabilidad y fertilidad del semen en diferentes épocas del año	83
3.9.2. Pruebas de calidad espermática	84
a.- Capacitación Espermática	84
b.- Membrana Espermática	86
c.- Factores de Capacitación	88
d.- Hiperactivación	88
e.- Reacción Acrosómica	89
3.9.3. Resumen de los puntos importantes implicados en la congelación, conservación y descongelamiento del semen	91
3.10.- Manejo de los termos de nitrógeno líquido	94
3.10.1. Precauciones en el manejo del tanque	95
3.10.2. Inventario de semen almacenado en el tanque	96
3.11.- Inseminación	97
3.11.1. Preparación de las hembras para inseminar	98
3.11.2. Sincronización de celos	100
3.11.3. Métodos de inseminación	105
a.- Inseminación vaginal	105
b.- Inseminación cervical	105
c.- Inseminación intrauterina	109
3.11.4. Número de inseminaciones por estro	113
3.12.- Manejo de las cabras después de inseminadas	113
3.12.1. Recruce de hembras que no conciben después de la inseminación	114

3.12.2. Diagnóstico de gestación	114
3.12.3. Manejo durante la gestación	116
3.12.4. Manejo durante el parto	117
3.14.- Factores que influyen en la fertilidad después de la inseminación	119
3.15.- Registro de datos reproductivos	122
3.16.- Equipo requerido en el laboratorio de inseminación artificial	125
3.17.- Normas de limpieza e inocuidad de equipo y materiales	127
3.18.- Condiciones sanitarias aplicables a los centros de inseminación	128
3.19.- Condiciones aplicables a los controles sanitarios de los moruecos, machos cabríos y animales excitadores	132
4. MATERIALES Y MÉTODOS	135
4.1.- Material Biológico	135
4.1.1.- Machos reproductores	135
4.1.2.- Huevos de gallina	135
4.2.- Material empleado en la recolección del semen	135
4.3.- Materiales y equipos empleados en la conservación del semen	136
4.4.- Materiales y reactivos utilizados en la dilución del semen	137
4.5.- Método	137
4.5.1.- Obtención y valoración seminal	137
a.- Volumen y aspecto físico.	138
b.- Color y consistencia.	139
c.- pH.	139
d.- Movimiento masal.	139
e.- % Motilidad.	139
f.- Concentración espermática.	139
g.- % Vivos.	140
h.- Diluyente.	140
4.5.2.- Diluyentes empleados y método de preparación	140
a.- Triladyl®	140
b.- AndroMed®	144
c.- Yema de huevo-Tris-Fructosa	147
d.- Yema de huevo-Glucosa-Citrato	147
5. RESULTADOS	149
5.1.- Experiencia en el Centro de Inseminación Artificial (CIA) del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG).	150
a.- Objetivos	150
b.- Actividades	150
c.- Preparación y limpieza de los sementales bovinos	151
d.- Preparación de diluyentes para bovinos	153
e.- Diluyentes TRIS usados en el CIA	153
f.- Preparación del diluyente I:	153

	g.- Preparación del diluyente II:	154
5.2.-	Formación de un Centro de Inseminación Artificial en Caprinos	169
	a.- Elección de los primeros machos cabríos	170
	b.- Procedencia, razas y edades.	170
	c.- Entrenamiento y preparación de los machos cabríos	175
	d.- Exámenes sanitarios realizados a los machos cabríos	176
	e.- Acondicionamiento de infraestructura y equipo de campo	176
	f.- Adquisición e instalación de equipos, materiales y reactivos	178
	g.- Manejo de tanques de nitrógeno líquido	182
	h.- Precauciones al manipular nitrógeno líquido.	184
	i.- Colección de semen y calidad de primeras extracciones	184
	j.- Prueba de termo resistencia	185
	k.- Determinación de la valoración de semen	187
	l.- Determinación de la concentración de semen	190
	m.- Uso de diluyentes para conservar semen fresco y congelado	194
	n.- Procesos de dilución	194
	ñ.- Procesos de envasado y etiquetado de pajillas	196
	o.- Procesos de conservación (semen fresco y congelado)	197
	p.- Pruebas post conservado o duración del semen fresco	198
	q.- Inseminación con semen congelado	202
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	204
6.1.-	Conclusiones	204
6.2.-	Recomendaciones	207
7.	BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA	210

INDICE DE CUADROS

	Página
1. Reactivos de colorante eosina/nigrosina con tricitrato de sodio.	46
2. Sistema de valoración de las ondas de movimiento masal.	53
3. Reactivos del colorante eosina/nigrosina con citrato de sodio.	54
4. Concentración de yema de huevo utilizada por distintos autores para la refrigeración de semen caprino.	63
5. Porcentaje de glicerol utilizado por diversos autores en los diluyentes de congelación de semen caprino.	65
6. Volumen de semen recomendado para inseminación artificial.	67
7. Número mínimo en millones de espermatozoides móviles en cada pajilla para practicar la inseminación según el lugar de depósito del semen en la cabra.	68
8. Relaciones de dilución recomendadas según el grado de concentración y motilidad de los espermatozoides en la preparación de semen diluido fresco	70
9. Fertilidades obtenidas con semen caprino refrigerado y congelado	75
10. Tiempo de capacitación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de los espermatozoides recuperados de la región caudal del epidídimo o eyaculados.	85
11. Valores de eficiencia reproductiva con distintas alternativas de inseminación artificial	99
12. Índices de fertilidad en (%) en relación con la profundidad de la inseminación cervical en cabras Angora cruzadas.	109
13. Diluyente yema de huevo - tris - fructosa para caprinos y ovinos.	147
14. Diluyente yema de huevo - glucosa - citrato para caprinos y ovinos.	147
15. Ingredientes para preparar el diluyente (TRIS).	153

16. Preparación del diluyente I según la cantidad a preparar.	154
17. Porcentaje de motilidad y movimiento masal de espermatozoides a 37 °C en baño maría a cuatro tiempos diferentes.	186
18. Porcentaje de motilidad masal de espermatozoides a 28 - 30 °C en baño maría a cuatro tiempos diferentes.	187
19. Formato para el registro de eyaculados, promedio para todos los machos cabríos que participaron del proyecto de extracción de semen.	187
20. Porcentaje de espermatozoides vivos y morfoanomalías del cabro Rafita - 0508 utilizando los colorantes eosina/nigrosina y azul de bromofenol.	189
21. Valores de esperma promedio para cada uno de los cabros que participaron en el programa de extracción de semen.	190
22. Porcentaje de motilidad masal y espermatozoides vivos diluidos en leche descremada y agua de coco conservados durante tres horas a temperatura ambiente.	198
23. Porcentaje de motilidad, movimiento masal y espermatozoides vivos diluidos en Triladyl®, Andromed®, Tris/glucosa/ácido cítrico/yema de huevo y Citrato/fructosa/yema de huevo, tras ser descongelados luego de 48 horas.	199
24. Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos, motilidad y movimiento masal, durante 6 horas de capacitación del semen caprino fresco.	199
25. Evolución de la motilidad espermática durante 28 días en refrigeración a 5 °C utilizando Andromed®, Triladyl®, Tris/glucosa/yema de huevo y Citrato/fructosa/yema de huevo.	201

INDICE DE FIGURAS

	Página
1. Estructura del espermatozoide.	12
2. Anormalidades espermáticas.	55
3. Flujo de capacitación espermática.	84
4. Registro e inventario de semen.	96
5. Protocolo de inducción y sincronización de estrógeno Chrono Gest®	104
6. Semental colocado en el brete.	151
7. Testículos y prepucio limpios.	152
8. Animales en proceso de limpieza y secado.	152
9. Preparación de los diluyentes I y II.	154
10. Limpieza de los huevos con agua y jabón.	155
11. Técnica de limpieza de la yema de huevo con papel filtro.	155
12. Agregado de la yema de huevo al diluyente I.	156
13. Filtración del diluyente	157
14. Diluyente I y II atemperados a 37 °C.	157
15. Vagina artificial para bovinos.	158
16. Vagina artificial preparada y lista para usar, en estufa a 37 °C.	158
17 Extracción de semen con vagina artificial.	160

18. Copa recolectora conteniendo el eyaculado.	160
19. Muestra de semen en portaobjetos colocada en plantilla térmica.	160
20. Evaluación del esperma bovino en microscopio.	161
21. Espermodensímetro digital para determinar concentración espermática.	161
22. Pajilla identificada y sellada.	162
23. Diluyentes y semen a 37 °C en baño maría.	163
24. Dilución del semen.	164
25. Llenado de pajillas.	165
26. Raqueta para 36 pajillas.	165
27. Selladora de pajillas.	166
28. Grupo de pajillas con semen diluido en refrigerador a 5 °C.	166
29. Grupo de pajillas en vapores de nitrógeno líquido.	167
30. Trasvase de las pajillas contenidas en una canasta y sometidas a la temperatura final de los tanques de nitrógeno líquido a - 196 °C.	168
31. Laboratorio de análisis forrajeros.	169
32. Parte del LCSC	169
33. LaMancha - Penny Stein - 0402.	171
34. LaMancha - Tyrone - 0609.	171
35. LaMancha - Rafita - 0508.	172
36. LaMancha - Toledo - 0601.	172
37. LaMancha - Kurt - 0611.	173

38. LaMancha - Juan - 0638.	173
39. Saanen - Trueno - 0634.	174
40. Saanen - Jayco.- FCM	174
41. Toggenburg - Enriquez.- FCM	175
42. Macho cabrío subido en potro de extracción de semen.	175
43. Potro de extracción de semen.	177
44. Vagina artificial lista.	178
45. Baño maría.	179
46. Refrigerador.	179
47. Microscopio.	180
48. Hielera de polietileno.	180
49. Tanque de nitrógeno líquido.	181
50. Balanza analítica.	181
51. Material de cristalería.	182
52. Diagrama operacional.	209

1. INTRODUCCIÓN

El creciente interés en el conocimiento de nuevas tecnologías en el campo de la reproducción caprina en Centroamérica y el Caribe ha causado que renovados métodos de procesamiento y conservación de semen, para uso en inseminación artificial, sean más efectivos, prácticos y en un futuro muy cercano accesibles para los pequeños y medianos productores.

A través de los años, la producción caprina se ha focalizado en grupos de pequeños productores quienes le han conferido la característica de actividad de subsistencia, con la limitante de una baja disponibilidad de material genético, lo que ha ocasionado que se crucen animales con parentesco y en consecuencia aumentando el problema de consanguinidad difundido a nivel nacional.

Una de las formas de introducir material genético al país que se empleó años atrás, fue la adquisición de machos reproductores traídos de diferentes países. No obstante, con los problemas de enfermedades infecto-contagiosas que se han desarrollado, se dio la necesidad por iniciativa gubernamental, de crear una barrera zoosanitaria que regulase el ingreso de animales al país lo que a su vez redujo hasta el día de hoy la posibilidad de introducir nueva sangre en el hato nacional.

La adquisición de semen a través de la importación es un método que se encuentra al alcance de pocos productores, quienes cuentan con capacidad económica para sufragar los gastos de importación. Hasta el momento es la forma de adquirir este material, debido a que las empresas importadoras de semen para bovinos aún no consideran rentable la opción de introducir semen caprino por la baja demanda, esto implica que pequeños productores vean esta opción fuera del alcance de sus manos.

Aunado al problema anterior, el costo elevado de cada pajilla impide que

sea opción el utilizar este material, sobre todo para la capacitación de personal en la técnica de inseminación artificial, ya que se conoce que durante los procesos de educación, un porcentaje alto del material se pierde en la prueba y error que se debe incurrir en todo programa de enseñanza, situación que muchos productores no están en capacidad de asumir.

Como resultado del crecimiento poblacional y de la necesidad de actividades rentablemente productivas, en Costa Rica la producción caprina ha dejado de ser una actividad artesanal y de subsistencia, para convertirse en sistemas de operación con fines comerciales y con miras a generar productos con un valor agregado a través de procesos tecnificados de industrialización. El apoyo de empresas privadas y entidades públicas como el Ministerio de Agricultura y Ganadería a través del Centro de Inseminación Artificial, y el aporte en el campo de la investigación encausado por la Universidad de Costa Rica a través de la Estación Experimental Alfredo Volio Mata en materia de mejoramiento y desarrollo tecnológico y genético, brindan apoyo y capacitación a los futuros productores que deseen incursionar en la producción caprina.

Esta reconversión del sector implica la utilización de programas de selección genética e incorporación de técnicas de reproducción asistida, principalmente de la inseminación artificial (IA) debido a su bajo costo y buenos resultados. La inseminación se realiza con células espermáticas conservadas durante pocas horas (semen refrigerado) o durante tiempos más prolongados que implican la utilización de sustancias criogénicas con el fin de mantener la viabilidad celular durante largos periodos de tiempo (semen congelado) (Cortez, 1998).

Las técnicas de congelamiento de semen posibilitan aún más la difusión de genes, al tiempo que permiten su conservación por un período ilimitado de tiempo. Este empleo de semen congelado puede reducir considerablemente los costos de producción, aumentando la eficiencia reproductiva y disminuyendo el riesgo sanitario de transmisión de enfermedades ligadas al sexo (Cortez, 1998).

En base a lo planteado anteriormente, la presente propuesta pretende

orientar, capacitar y desarrollar las bases del proceso de recolección y conservación de semen caprino en nuestras latitudes, así como evaluar los resultados mediante la inseminación de las cabras en campo, con el fin de proyectar esta técnica para beneficio de los productores nacionales e internacionales.

2. OBJETIVOS

2.1.- Objetivos generales

- 2.1.1- Establecimiento de un centro de procesamiento y conservación de semen caprino.
- 2.1.2- Estimular la producción caprina nacional hacia un programa de mejoramiento genético mediante el desarrollo e impulso de técnicas de inseminación artificial.
- 2.1.3- Generar una plataforma de capacitación a través de los cuales se puedan difundir los alcances de las técnicas de inseminación artificial y del centro de congelamiento de semen.

2.2.- Objetivos específicos

- 2.2.1.- Dotar un laboratorio con equipo, reactivos y materiales necesarios para el procesamiento y congelamiento de semen caprino.
- 2.2.2.- Establecer un protocolo de trabajo para la extracción, conservación y evaluación de semen para inseminación artificial en cabras.
- 2.2.3.- Instituir normas de limpieza e inocuidad de los equipos y materiales requeridos en el laboratorio.
- 2.2.4.- Desarrollar un procedimiento de selección de los animales que serán utilizados como donadores de espermatozoides.
- 2.2.5.- Analizar a través de pruebas de campo la viabilidad reproductiva del material producido en el centro de congelamiento de semen.
- 2.2.6.- Inseminar con el material procesado en el centro.

3.- REVISION BIBLIOGRÁFICA

3. 1.- Semen y sus características

El semen es la suspensión celular líquida o semi gelatinosa que contiene los espermatozoides y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino. La porción líquida de dicha suspensión, que se forma durante la eyaculación, se conoce como plasma seminal, así mismo Hafez (1996), define el semen como el líquido generativo del macho, ya que contiene los gametos masculinos (espermatozoides), que son depositados en la vagina de la hembra durante la cópula o puede recogerse por medios artificiales para su estudio, almacenamiento y uso en inseminación artificial.

Los espermatozoides maduros son células alargadas consistentes en una cabeza aplanada portadora del núcleo y una cola que contiene el aparato necesario para la motilidad celular. La célula espermática esta cubierta en su totalidad por el plasmalema o membrana plasmática. El acrosoma, o casquete acrosómico, es una estructura de doble pared situada en la porción anterior del núcleo. La cabeza del espermatozoide está envuelta por el acrosoma en sus dos tercios anteriores y se observa un claro engrosamiento marginal en el borde ecuatorial. Por debajo de la cabeza, el cuello une la cabeza del espermatozoide con su cola (flagelo), la cual a su vez se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal o terminal (Sorensen Jr, 1982).

Las alteraciones morfológicas y fisiológicas del acrosoma parecen asociarse con una baja capacidad fecundante del esperma, ya que en condiciones fisiológicas sólo los espermatozoides capaces de experimentar la reacción acrosómica en las proximidades del ovocito serán capaces de atravesar la zona pelúcida y penetrar el gameto femenino (Pomerol y Arrondo, 1994; Curry y Watson, 1995).

El semen lo forman dos principales constituyentes: el plasma seminal y los espermatozoides. La composición del semen varía según las especies (Evans y Maxwell, 1990).

3.1.1.- El plasma seminal

La importancia funcional del plasma seminal es cuestionable, ya que en algunas especies es posible inducir la preñez por inseminación con espermatozoides epididimarios (espermatozoides maduros localizados en el epidídimo del testículo). Sin embargo; dicho plasma parece ser un componente esencial en el apareamiento natural porque actúa como portador y protector de los espermatozoides. La importancia de esta función varía, porque en algunas especies la eyaculación se realiza directamente en el útero. El plasma seminal parece ser más importante en el apareamiento natural de la cabras, la oveja y la vaca, en las cuales el eyaculado se deposita en la vagina (Hafez, 1996).

El plasma seminal se trata de una mezcla de líquidos secretados por las glándulas vesiculares, los epidídimos, conductos deferentes, próstata y glándulas bulbouretrales de Cowper así como otras glándulas sexuales accesorias. El testículo no contribuye casi nada a la formación del plasma seminal. En los machos ovinos y caprinos las glándulas de mayor tamaño son las vesiculares localizadas próximas a la unión de los conductos deferentes y la uretra. En el plasma seminal se encuentran componentes específicos de cada glándula, que son utilizados como marcadores bioquímicos de la función glandular (Anderson et al; 1979; Borque et al; 1989; Andolz y Bielsa, 1995; Santiago et al; 1995). Estos marcadores se agrupan según su procedencia en:

- a.- Vesiculares: Fructosa y prostaglandinas
- b.- Prostáticos: Acido cítrico, fosfatasa ácida, zinc y γ -glutamyltransferasa.
- c.- Epididimarios: L-carnitina libre y glicerolfosfocolina.

El plasma seminal tiene tres funciones principales: (i) actúa como vehículo para los espermatozoides, transportándolos a través del sistema reproductor de la hembra hasta llegar al ovulo, (ii) sirve de activador a los espermatozoides, previamente no móviles, y (iii) proporciona un medio rico en nutrientes, que

colabora en mantener la supervivencia de los espermatozoides después de que son depositados en el aparato genital de la hembra. Así mismo Evans y Maxwell (1990) reportan, que el plasma seminal posee características propias de la especie. Por ejemplo, en los carneros es un líquido opaco o claro, aunque el semen puede ser de color blanco o cremoso debido a su alta concentración en espermatozoides. Sin embargo, el plasma seminal de los machos cabríos puede ser, a veces, de color amarillo por su contenido en riboflavina, procedente de las glándulas vesiculares.

El principal componente del plasma seminal, tanto en el carnero como en el macho cabrío, es el agua (75%), aunque también aparecen sustancias orgánicas e inorgánicas que sirven de protectores y nutrientes de los espermatozoides. El plasma seminal normalmente es un líquido isotónico y neutro (Evans y Maxwell, 1990).

Al contrario que otros cuerpos fluidos, la presión osmótica del semen se mantiene más por los componentes orgánicos que por los iónicos inorgánicos, aunque existen cantidades considerables de sodio, potasio y cloro. Las principales sustancias orgánicas presentes en el semen del carnero y macho cabrío son fructosa, sorbitol, inositol, ácido cítrico, glicerilfosforilcolina, fosfolípidos, prostaglandinas y proteínas. La fructosa es el azúcar más fácilmente metabolizable y proporciona la mayor fuente de energía a los espermatozoides del semen. La concentración de fructosa y ácido cítrico en el plasma seminal están sometidas a variaciones estacionales, raciales e individuales (Chand et al; 1985; Mendoza et al; 1989; Roca et al; 1993), apreciándose diferencias en el contenido según la edad del individuo (Roca et al; 1991). Dichas concentraciones están en relación directa con la actividad de la testosterona, contribuyendo como un indicador de la función endocrina del testículo (Borque et al; 1989).

Se han establecido correlaciones entre los valores bajos de fructosa con pequeños niveles de movilidad y volumen (González y Villena, 1997). El ácido cítrico activa la fosfatasa ácida manteniendo el equilibrio osmótico junto con el sodio y potasio, favoreciendo la movilidad espermática.

La proteína total presente en el plasma seminal es indicador de alteraciones patológicas del aparato reproductor del macho, estando estrechamente relacionadas con la congelabilidad del semen, al brindarle protección a los espermatozoides (Borque et al, 1989).

El pH del plasma seminal se mantiene muy próximo a 7.0 por un complejo sistema amortiguador. El plasma seminal tampón protege a los espermatozoides de los cambios bruscos de pH que deterioran la supervivencia de las células espermáticas (Evans y Maxwell, 1990).

En el plasma seminal de muchas especies se encuentran prostaglandinas, que están en muy alta concentración en el semen de carnero y macho cabrío (mayor a 40 µg/ml). La explicación de estas altas concentraciones no está clara. Las prostaglandinas son capaces de estimular las poderosas contracciones de la musculatura uterina y se ha sugerido que pueden colaborar en el transporte de los espermatozoides en el aparato genital femenino (Evans y Maxwell, 1990).

El plasma seminal caprino es rico en fosfatasa ácida y alcalina, secretadas por la próstata en fosfolipasa A, producida en la glándula bulbouretral o de Cowper (Roy, 1957).

La fosfolipasa A es la enzima responsable de la coagulación de la yema de huevo, utilizada en los medios de dilución para refrigerar o congelar semen (Corteel, 1981), debido a la acción de ésta enzima sobre las lecitinas de la yema de huevo, se origina una reacción entre ambas y como consecuencia se producen lisolecitinas y ácidos grasos libres, los cuales producen un efecto “espermicida” dando lugar a la inmovilización y muerte de los espermatozoides (Corteel, 1992; Pellicer, 1996), es por eso, que a esta enzima se le conoce con el nombre de “enzima que coagula la yema de huevo”.

El lavado del semen mediante centrifugación se hace con el objetivo de eliminar el plasma seminal y permite reducir la concentración de fosfolipasa A, reduciendo el efecto tóxico sobre los espermatozoides (Corteel, 1980; Ritar y Salomón, 1982; Nunes et al; 1982; Corteel, 1992; Pellicer, 1996). Sin embargo, la eliminación del plasma seminal implica el descenso de los niveles de fructosa,

ácido cítrico y zinc (estabilizadores del metabolismo espermático) así como de los factores de recapitación y por tanto induce una capacitación prematura.

La fosfolipasa A se activa en presencia de iones calcio, disminuyendo la acción cuando en el medio aparecen citratos u oxalatos (Roy, 1957). Así mismo, el efecto tóxico, se ve reducido al eliminar el plasma por centrifugación, utilizar semen procedente de machos cabríos cowperectomizados (Irritan y Nishikawa, 1962) o utilizar concentraciones de yema de huevo menores al 2% que no produce el fenómeno de coagulación (Evans y Maxwell, 1990).

La determinación de enzimas espermáticas en el plasma seminal, como por ejemplo la aspartato aminotransferasa (AAT), sirve de indicador de daño celular por choque frío, al evaluar una muestra de semen descongelado (Borque et al, 1989).

3.1.2.- Espermatozoides

Los espermatozoides son los gametos masculinos que se producen en los túbulos seminíferos de los testículos. Estas células móviles, son el resultado de una metamorfosis de la espermátida en la cual se da la división de los espermatoцитos primarios a secundarios formándose dos espermátidas a partir de cada una. Bajo la influencia de la testosterona, el número cromosómico se reduce a la mitad, de modo que la espermátida tiene un complemento cromosómico de número 1N. Esta espermátida se trata de una célula redondeada poseedora de los órganos ordinarios y cada una se transforma en una unidad funcional de los espermatozoides maduros, una vez que han desarrollado la gota citoplasmática, a través de las estructuras tubulares de los testículos (Sorensen Jr, 1982).

3.1.3.- Estructura de los espermatozoides

Un espermatozoide (célula espermática aislada) es una célula altamente especializada. Formada por dos partes: cabeza y cola. La cabeza es plana y ovoide ocupada casi en su totalidad por el núcleo. Este está formado por los cromosomas, responsables de portar la información genética paterna. La parte anterior de la cabeza esta envuelta por una caperuza especial, llamada acrosoma,

portadora de las enzimas necesarias para el proceso de fertilización (Evans y Maxwell, 1990).

La forma final del núcleo determina la de la cabeza y ésta varía según la especie animal. La cabeza del espermatozoide maduro mide aproximadamente 8µm de largo, 4 µm de ancho y 1 µm de largo; y la cola se extienden entre 40 µm y 45 µm de modo que el espermatozoide mide en total cerca de 65 µm (Sorensen Jr, 1982).

3.1.4.- Morfología del espermatozoide

a.- Cabeza

La cabeza del espermatozoide es un núcleo homogéneo cubierto anteriormente por una protección que consta de tres capas y en sentido posterior por una cubierta posnuclear densa, delgada y floja. La cubierta acrosómica que está entre la membrana nuclear y la celular, es la porción anterior, que es la más grande y contiene sustancias de tipo enzimático, mientras que la lámina postacrosómica densa forma el segmento ecuatorial (parte más ancha de la cabeza del espermatozoide) denominada posnuclear (Sorensen Jr, 1982).

La característica principal de la cabeza del espermatozoide es el núcleo aplanado oval, que contiene cromatina muy compacta. La cromatina condensada consiste en un complejo formado por ADN y una clase especial de proteínas básicas llamadas protaminas espermáticas. Su número cromosómico y, por tanto, el contenido de ADN nuclear es haploide; esto es, dicho núcleo posee la mitad de cromosomas que el núcleo de las células somáticas de la misma especie. La naturaleza haploide de las células espermáticas se debe a las divisiones celulares meióticas que ocurren durante su formación (Hafez, 1996).

b.- Acrosoma

El extremo anterior del núcleo espermático está cubierto por el acrosoma, un delgado saco membranoso de doble capa que estrechamente se adhiere al núcleo durante las últimas etapas de la formación del espermatozoide. Esta

estructura en forma de casquete, que contiene varias enzimas hidrolíticas incluyendo proacrosina, hialuronidasa, esterases y ácido hidrolasas, participa en el proceso de la fecundación (Mann y Lutwak-Mann, 1981). El segmento ecuatorial del acrosoma es importante debido a que es ésta parte del espermatozoide, junto con el segmento anterior de la región postacrosómica, la que se fusiona inicialmente con la membrana del ovocito durante la fecundación (Hafez, 1996).

c.- Cola

La cola espermática esta formada por el cuello y los segmentos: medio, principal y caudal. El cuello o segmento conector forma una placa basal que termina en una depresión en la superficie posterior, y tiene nueve fibras gruesas que se proyectan hacia atrás a través de la mayor parte de la cola. La región de la cola comprendida entre el cuello y el anillo citoplasmático es el segundo medio. El centro de este segmento medio, junto con toda la longitud de la cola, constituye el axonema. Este se compone de nueve pares de micro túbulos dispuestos radialmente alrededor de dos filamentos centrales. En el segundo medio, ésta disposición 9+2 de los micro túbulos está rodeada por nueve fibras gruesas o densas que al parecer están asociadas a los nueve dobletes del axonema.

El axonema y las fibras densas asociadas del segmento medio están cubiertos periféricamente por numerosas mitocondrias. Esta vaina mitocondrial, dispuesta en un patrón helicoidal alrededor de las fibras longitudinales de la cola, genera la energía necesaria para la motilidad espermática. La vaina mitocondrial termina en el anillo citoplasmático. El segmento principal, que continúa en sentido posterior desde el anillo citoplasmático y se extiende casi hasta la punta de la cola, está formado por el axonema en el centro y sus fibras gruesas asociadas. Se piensa que la vaina fibrosa da estabilidad a los elementos contráctiles de la cola (Hafez, 1996).

El segmento caudal o terminal, posterior a la terminación de la vaina fibrosa, contiene solo el axonema cubierto por la membrana plasmática. El axonema es el que da la motilidad al espermatozoide. Los pares externos de micro túbulos del patrón 9+2 generan las ondas de flexión de la cola por un

movimiento deslizante entre pares adyacentes (Hafez, 1996).

La cola, semejante a un flagelo, es el orgánulo locomotor de los espermatozoides. El movimiento de la cola es el responsable de la propulsión de los espermatozoides en los líquidos. La cola está conectada a la cabeza mediante un corto cuello, conocido como la región de implantación. En épocas calurosas, o situaciones estresantes, el cuello puede lesionarse con lo que separa la cabeza de la cola (Evans y Maxwell, 1990).

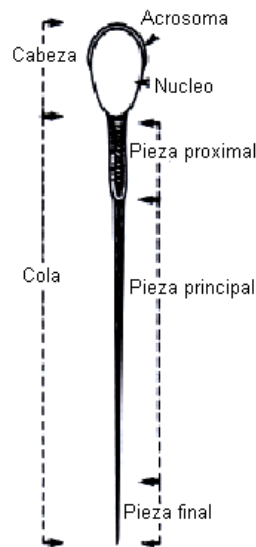


Figura 1. Estructura del espermatozoide.

La cola puede estar diferenciada en tres regiones: pieza proximal, pieza principal y pieza terminal. Existe un núcleo axial común formado por una serie de elementos contráctiles, o fibrillas. La contracción y relajación de estas fibrillas son las responsables del movimiento. La pieza proximal es la región más gruesa de la cola, donde el eje está rodeado de una lámina mitocondrial. Las mitocondrias son los orgánulos responsables de aportar la energía necesaria para la locomoción. La pieza intermedia, o principal, es la sección más larga de la cola y contiene la mayor parte de la maquinaria propulsora y posee una vaina fibrosa. La pieza terminal es relativamente corta y no tiene ninguna vaina (Evans y Maxwell, 1990).

La longitud total del espermatozoide del carnero y del macho cabrío es de

unos 60 μm . La cabeza mide entre 8 μm a 10 μm , 4 μm de ancho y 1 μm de grueso. Es relativamente pequeña, comparada con el oocito cuyo diámetro es de 160-180 μm . El oocito tiene un volumen relativo de dieciséis mil veces mayor que el del espermatozoide (Evans y Maxwell, 1990).

3.1.5.- Composición bioquímica de los espermatozoides

Los principales componentes bioquímicos de los espermatozoides son ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Alrededor de un tercio del peso seco de una célula espermática corresponde al núcleo. La cromatina nuclear está constituida por proporciones aproximadamente iguales de ADN y proteína. El casquete acrosómico contiene una variedad de proteínas enzimáticas. En la cola hay muchas proteínas estructurales y enzimáticas así como lípidos (Hafez, 1996).

3.1.6.- Metabolismo de los espermatozoides

La energía necesaria para mantener la motilidad y viabilidad de los espermatozoides procede de los azúcares, especialmente de la fructosa, presente en el plasma seminal. La glucosa que también es metabolizada por los espermatozoides, a menudo, se utiliza como componente de los diluyentes. Cuando los azúcares son metabolizados por los espermatozoides se produce dióxido de carbono (CO_2), agua y algo de ácido láctico (Evans y Maxwell, 1990).

El dióxido de carbono en alta concentración tiene el efecto de inhibir la motilidad de los espermatozoides. El semen sin diluir incubado durante largos períodos de tiempo, puede acumular dióxido de carbono en cantidad suficiente para inhibir la motilidad de los espermatozoides. En estos casos, se puede recuperar la motilidad agregando diluyente fresco, con lo que disminuye la concentración de CO_2 presente. Sin embargo, si se acumula ácido láctico metabólico en el semen, el pH del medio desciende y reduce, irreversiblemente, la viabilidad de los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1990).

3.1.7.- Factores que afectan a la supervivencia de los espermatozoides

El semen, recién recolectado, puede ser de buena calidad pero se deteriora con facilidad. El semen del carnero y del macho cabrío es muy sensible a los

cambios ambientales y a otras circunstancias, por lo que se aconseja tomar medidas precautorias durante la recolección, transporte y almacenamiento en el laboratorio. Los factores que pueden afectar la supervivencia de los espermatozoides en el eyaculado son los siguientes según: Evans y Maxwell (1990)

1.- Temperatura

La temperatura del semen, en el momento de la eyaculación, es próxima a la del cuerpo (37 °C). La exposición a temperaturas superiores aumenta el ritmo metabólico del semen, se agotan las reservas de energía y decrece la vida media de los espermatozoides. Temperaturas superiores a los 45 °C matan los espermatozoides. La disminución de la temperatura reduce el metabolismo de los espermatozoides, pero una pérdida súbita de temperatura por debajo de los 10 °C, produce una reducción irreversible de su motilidad y viabilidad. Estas características no se recuperan al calentar de nuevo el semen, con lo que se pierde definitivamente la capacidad fertilizante del semen. Este fenómeno se llama “choque” por frío y puede suceder como consecuencia de una exposición accidental al frío del medio. Este fenómeno lo presentan la copa recolectora conteniendo el semen durante la extracción y los portaobjetos empleados para su observación en el microscopio. También, se debe poner especial cuidado a la temperatura del diluyente, el cual siempre debe estar a la misma temperatura del semen.

El enfriamiento lento del semen diluido en un refrigerador a 5 °C no es fatal, ya que se reduce el metabolismo en forma paulatina. Esta temperatura, sostenida en forma constante, contribuye a prolongar la viabilidad de los espermatozoides. Al calentar de nuevo el semen fresco (íntegro o diluido) a temperatura ambiente (25 a 30 °C) se restaura la motilidad y los espermatozoides permanecen fértiles.

2.- Luz

La luz solar directa es perjudicial para el semen. Una exposición corta a la

luz solar reduce la viabilidad de los espermatozoides y si esa exposición se prolonga por 30 a 40 minutos la mortalidad será alta. Consecuentemente, es aconsejable evitar la exposición directa del semen a la luz solar con lo que las operaciones de recogida y manejo del semen se deben hacer en interiores y lejos de los rayos de luz que pueden penetrar por las ventanas, preferentemente usando fundas protectoras. Asimismo, es conveniente evitar exposiciones del semen a la luz fluorescente intensa o a la radiación ultravioleta.

3.- Contacto con metal

El contacto con metal, de cualquier tipo ya sea del equipo de inseminación o en la mesa de trabajo, es peligroso para los espermatozoides; por esta razón, solo se debe utilizar material o recipientes de cristal o de otros materiales sintéticos inertes cuando se trata de recoger, diluir, conservar e incluso practicar la inseminación.

4.- Contacto con agua

El agua potable reduce la presión osmótica del plasma seminal con lo que provoca daño a los espermatozoides. Por tanto, el agua se comporta como un peligroso agente espermicida. Antes de usarlo, todo material, incluida la vagina artificial y los tubos colectores de semen, deberán secarse con esmero. Se debe poner especial atención cuando se deja el semen en baño de agua, para que ésta no salpique el semen.

5.- Impurezas y bacterias

Las bacterias, el polvo, los pelos, la orina y otros contaminantes reducen el valor biológico del semen, perdiendo por completo la viabilidad de los espermatozoides. La contaminación del semen ocurre con más frecuencia durante la recolección y puede evitarse mediante lavado, a fondo, y secado del prepucio del macho antes de la extracción.

Después de recolectado el semen se protegerá de los contaminantes del aire cubriéndolo o tapándolo con una funda limpia de tela. También, se debe

poner especial cuidado de proteger el semen contra las moscas y otros insectos. La eventual proliferación de microbios en el semen se puede controlar posteriormente durante el procesamiento por la adición de antibióticos en el diluyente.

6.- Desinfectantes

Los desinfectantes y antisépticos son muy peligrosos para los espermatozoides, por lo que se debe evitar completamente su uso. Para esterilizar el material se puede utilizar alcohol al 70%, y se deberá secar cuidadosamente antes de usar el instrumento, envase o equipo de trabajo. Para el material de vidrio se debe utilizar la esterilización mediante calor seco.

7.- Exposición prolongada al aire

El oxígeno del aire incrementa notablemente la actividad metabólica de los espermatozoides con lo que genera una acumulación de ácido láctico en el semen. Ese ácido reduce el pH del semen por debajo del óptimo, esto es pH 7,0 con lo que la viabilidad de los espermatozoides se reduce notablemente. El semen, una vez recogido, deberá recibir el procesamiento requerido de manera inmediata, ya sea para la inseminación o la conservación.

8.- Capacidad tampón del diluyente

El medio que se utilice para diluir el semen debe tener suficiente capacidad amortiguadora para mantener el pH óptimo de 7,0. Las desviaciones de pH, bien sea hacia la alcalinidad o la acidez, disminuirán la viabilidad de los espermatozoides. Los diluyentes de semen, más recomendados, contienen tampones; esto es, sustancias capaces de mantener el medio cercano al pH óptimo de los espermatozoides.

9.- Presión osmótica del diluyente

Los componentes (solutos) disueltos en el medio y que rodean al espermatozoide pueden ejercer cierta presión sobre la membrana celular. Este fenómeno se

conoce como presión osmótica y aumenta según la concentración de solutos en el medio. Los medios en los que la concentración de solutos es equivalente a la del interior de la célula se dice que son isotónicos. Los medios que tienen concentraciones más bajas de solutos son hipotónicos y los que tienen más solutos son hipertónicos. Tanto los hipotónicos como los hipertónicos son peligrosos para los espermatozoides; solo hay un estrecho margen de tonicidad sobre el que puede variar el diluyente sin que se afecten los espermatozoides. En efecto, los espermatozoides mantienen su normal movilidad durante más tiempo en medios isotónicos.

3.2.- Selección y preparación de los machos para los programas de inseminación artificial.

Los programas de reproducción planificados dan mejores resultados cuando el capricultor considera las características de producción individuales y determina de qué manera pueden transmitirse a la progenie. La selección es la elección de animales que se utilizarán como reproductores. Los ejemplares seleccionados deben poseer características deseables, que tengan buena repetibilidad y heredabilidad para transmitir a la progenie todos los caracteres productivos, según los propósitos deseables de la producción (Devendra y McLeroy, 1986).

3.2.1.- Selección de los sementales cabríos

El objetivo de la selección es cambiar las frecuencias de genes para mejorar los fenotipos en generaciones posteriores, puede ser directa o indirecta. El método directo selecciona a los machos cabríos que tienen los mejores antecedentes de producción de leche o carne expresados por sus hijas. La selección indirecta mejora una característica en particular al elegir las hijas de los machos cabríos con un rasgo relacionado a la producción, por ejemplo la conformación de la ubre en cabras lecheras. La eficiencia de la selección indirecta depende de la correlación entre dos características y es muy importante puesto que la reproducción animal suele comprender más de una característica, además

la correlación entre éstas implica un enlace genotípico. Un ejemplo de selección indirecta se da en la tasa de crecimiento con la que quizá mejore la madurez precoz del animal, el peso a sacrificio y la eficiencia de conversión alimenticia (Devendra y McLeroy, 1986).

El objetivo de un programa de inseminación artificial (IA) para cabras es mejorar las características de producción, principalmente la cantidad y calidad de la leche así como de la carne. El valor de producción de leche de un semental se obtiene a partir de la producción de su descendencia, comparada con sus contemporáneas. Los productores deben convencerse de que los machos que se utilicen para (IA) deben ser genéticamente mejores que sus congéneres (Evans y Maxwell, 1990).

Por tanto, al planificar un programa de reproducción, dado el incremento del potencial del semental mediante la dilución del semen, es indispensable apearse a criterios de selección de los padres (Sorensen Jr, 1982).

3.2.2.- Selección de sementales jóvenes

Un método de selección de sementales jóvenes, es el estudio de los registros de todos los animales emparentados con esto, para conocer las características deseables y llevar a cabo un apareamiento entre un buen semental y un vientre adecuado. La existencia de registros de cría y apareamiento aunados al conocimiento de los valores de heredabilidad de diversos rasgos, como la producción láctea, contenido de sólidos no grasos de la leche, producción de grasa en leche, conformación de la ubre, buenas patas y pezuñas, facilidad de parto y longevidad, son de gran ayuda en la selección de los progenitores para los programas de cruzamiento (Sorensen Jr, 1982).

Una vez que el semental selecto nace, se le coloca con otros prospectos similares y se alimentan adecuadamente para obtener un crecimiento óptimo y que asegure la pubertad a una edad temprana, se lleva el registro del animal a lo largo de este período de desarrollo, en los que se anota el aumento de peso, la

tasa de conversión alimenticia y la conformación en general. Su salud se verifica en forma continua (Sorensen Jr, 1982).

Una vez que el animal llega a la pubertad, se recolecta el semen para evaluarlo y procesarlo, sólo se utiliza el semen de alta calidad y la parte del semen procesado se evalúa en diferentes hatos sobre la progenie de éstos, con el fin de probar al semental en potencia. Parte del semen queda almacenado en el centro de reproducción como una reserva futura (Sorensen Jr, 1982).

Los futuros sementales se mantienen mientras se esperan los resultados de sus pruebas en cuanto a tasa de concepción y producción. En casos excepcionales los candidatos sobresalientes se ponen a disposición de forma inmediata aunque limitada. A medida que se acumulan las pruebas, se toma la decisión en cuanto a si el macho cabrío selecto se incorpora definitivamente al programa de congelamiento de semen del centro de inseminación artificial o es eliminado como reproductor; de esta manera se vende como animal de carne (Sorensen Jr, 1982).

Algunas características deseables en el trópico para los machos cabríos jóvenes a seleccionar según Devendra y McLeroy, (1986); Evans y Maxwell, (1990) son:

- a.- Ser el más pesado del rebaño con pecho amplio y tronco bien desarrollado; cuerpo recto en excelente condición física y patas fuertes.
- b.- No tener defectos físicos, como patas torcidas, mandíbula superior o quijada saliente.
- c.- Ser mellizo.
- d.- Ser activo y con buena libido sexual.
- e.- Dar positivo en todas las pruebas sanitarias con respecto a enfermedades infecto transmisibles vía seminal.
- f.- Tener buena crin sobre el cuello y hombros, pues esto refleja adecuada capacidad reproductora.
- g.- Adecuado desarrollo testicular.

h.- Buenas características de semen, en particular ausencia de espermatozoides anormales.

i.- Además se debe examinar los órganos reproductores poniendo especial atención en el tamaño y forma de los testículos y epidídimos, órganos que pueden ser palpados a través del escroto. Los testículos deben ser firmes y elásticos, carentes de lesiones y deformidades, moverse libremente dentro del saco escrotal. La cola del epidídimo se debe palpar con facilidad y tener igual tamaño y forma en ambos testículos. Si alguna parte del epidídimo se encuentra endurecida o alargada se debe sospechar la existencia de epididimitis, por alguna lesión o enfermedad. Así mismo, se debe poner especial atención a la integridad del conducto deferente, en el cuello del escroto, debe estar firme y fácilmente palpable.

j.- Finalmente, se debe inspeccionar las posibles anomalías en prepucio, pene y particularmente, en el conducto uretral, que puede verse lesionado por algún cálculo renal recientemente expulsado.

Los animales con defectos tales como criptorquidismo (ausencia del descenso de los testículos), hipoplasia testicular (testículos faltos de desarrollo), espermiostasis (bloqueo del conducto epididimario) o varicoceles (dilatación de la vena espermática) deben ser excluidos de los programas de inseminación artificial.

Una cuestión que a menudo se olvida al seleccionar los sementales es su capacidad de servicio y su vigor sexual, que puede controlarse mediante una prueba de servicio, en la que el macho se expone a una serie de hembras en estro. La falta de voluntad a montarlas puede ser debida a un trauma físico, un cuadro de artritis, mal formación de pezuñas o lesiones en el pene.

Por otra parte los machos difieren en cuanto a su temperamento y conducta sexual, lo que sin duda, afecta a su capacidad de servicio

Estos sementales cabríos antes de comenzar las jornadas de salto para recolección de semen se deberán mantener en buena condición física y ser alimentados con la cantidad adecuada de alimento, evitar sobrealimentarlos ya

que se vuelven perezosos y demasiado pesados como para realizar el salto. Es importante sacar a ejercitar los animales por lo menos 3 veces a la semana, durante las primeras horas de la mañana, con ello pueden recibir también suficiente sol, además deberán desparasitarse periódicamente con algún vermífugo, así como recortar pezuñas y bañarlos cada 3 meses (Devendra y McLeroy, 1986).

Los machos cabríos son fértiles a edad temprana y en consecuencia es común que sean manejados de manera separada. También exudan ácidos cápricos y capróticos en su pelo que contaminan las cubetas receptoras de leche produciendo mal olor a la misma ya que se tienen cerca de la sala de ordeño o se mantienen animales en los mismos corrales donde están las cabras en producción (Devendra y McLeroy, 1986).

Dos tipos de cabros son elegidos normalmente en un centro de inseminación artificial (Ureña, 2007):

- a.- Aquellos seleccionados en base a sus datos genéticos (producciones y prueba de descendencia), para caracteres como la prolificidad, producción de leche, características de tipo y conformación, etc.
- b.- Aquellos animales jóvenes que son incluidos en un esquema de prueba y selección inicial con base en el comportamiento conocido de sus ascendientes.

La primera etapa para seleccionar los machos consiste en observar sus caracteres fenotípicos. Los machos pueden poseer defectos evidentes en aplomos, lomo, caracteres lecheros, etc.; así como anomalías del tracto genital, síntomas de enfermedades congénitas o sanitarias y por lo tanto todos ellos deben ser excluidos.

Si los machos que se seleccionan son jóvenes, se debe tener en cuenta sus ascendientes, para evitar que cualquier tipo de enfermedad o defecto genético pueda ser observado previamente y luego transmitido. En el macho cabrío, existe

un problema de intersexualidad ligada al gen “sin cuernos o mocho” y que aparece en los machos que son homocigotos, de forma que los padrotes mochos naturales deben ser evitados (Ureña, 2007).

Según Ureña (2007), no siempre es posible seleccionar los machos cuando son jóvenes, y por consecuencia también se deben utilizar machos adultos en los centros de inseminación artificial y la selección inicial de estos machos se puede hacer en base a:

- a. Tamaño testicular. En la especie caprina, al igual que en otras especies, el tamaño testicular esta muy relacionado con la producción espermática. Entre las técnicas más utilizadas para determinar el tamaño testicular se considera la circunferencia escrotal, tomando como tal la medida periférica que se encuentra alrededor de la parte media del escroto donde el diámetro testicular tiene su máxima amplitud. Esta medida tiene una alta correlación tanto con el peso y volumen testicular como con la producción espermática. Otro método para determinar el volumen testicular es midiéndolo con un orquidómetro. De esta manera, los machos que muestran mayor tamaño testicular tienden a producir la mayor cantidad de semen.
- b.- Medida de los espermatozoides anormales. Es importante tener en cuenta esta característica sobre todo en las razas estacionales, ya que es un carácter repetible y que está fuertemente ligado a la fertilidad. Además un análisis de la calidad del semen, motilidad, concentración y morfología, debe ser imprescindible para la selección de machos reproductores, a pesar de que esta cualidad solo explica el 60% de preñez obtenido por un semental.

3.2.3.- Preparación de los machos

Hay que asegurarse de que el macho cabrío haya superado la etapa de pubertad y este preparado para la madurez sexual, ya que la pubertad se presenta por primera vez cuando el animal es capaz de producir un número suficiente de

espermatozoides para preñar una hembra, no así en la madurez sexual donde el animal debe tener la mínima cantidad de espermatozoides para ser recolectados, por ejemplo en la especie caprina deben ser 50 millones de espermatozoides de los cuales el 10 % o más son viables y presentan una adecuada motilidad (Cunningham, 1997).

Los machos pueden presentar esterilidad transitoria como consecuencia de condiciones estresantes, por ejemplo, altas temperaturas o humedad, cambio de ambiente o de dieta, molestias por moscas, piojos, enfermedades crónicas y otros factores. Por ello se recomiendan tratamientos adecuados, unas 6 a 8 semanas antes del comienzo de los programas de extracción de semen. Adviértase que muchos de los manejos rutinarios que reciben los machos pueden causar estrés como, el recorte de pezuñas, hacinamiento, administración de purgantes y baño. El propio transporte también puede ser causa de estrés, con lo que se aconseja hacerlo con tiempo suficiente para que cuando comience el programa de extracción de semen estén acostumbrados al nuevo lugar (Evans y Maxwell, 1990).

Los machos destinados para la reproducción deben tener una edad de 10 a 20 meses, para iniciar su vida reproductiva primero cubrirán 5 hembras al día, cuando hayan llegado a los 2 años con buenas características de conformación física y bien alimentados pueden servir hasta 15 hembras al día, y de esta manera es posible aprovechar toda su capacidad genética (Durán, 2007).

Se ha demostrado que las raciones con alto contenido de proteína pueden incrementar la producción de espermatozoides y al no ser que se trate de machos en óptimas condiciones, se aconseja mejorar las raciones unas 6 a 8 semanas antes de comenzar la colección de semen. Un buen suplemento es administrar 500-750 g/animal/día de un concentrado rico en energía y proteína, así como hierba de excelente calidad (Evans y Maxwell, 1990).

Uno de los factores más importantes, responsable de la calidad y cantidad de semen son las estaciones climáticas. La calidad del semen es óptima durante la estación reproductora, por lo que intentar recoger semen en otra época puede conducir a malos resultados. Por ello, se aconseja planear los programas de

extracción, coincidiendo con la estación reproductora natural (Evans y Maxwell, 1990).

3.2.4.- Entrenamiento de los machos para la colección de semen

El método preferido es la recolección de semen mediante una vagina artificial. Los machos deben ser entrenados, comenzando unas 2 a 3 semanas antes del inicio del programa. Con esto se permite un amplio margen para el entrenamiento, se asegura una buena calidad del semen y quizás, se pueden reemplazar los sementales que no satisfagan las necesidades. Una vez estrenados a eyacular en la vagina artificial, los machos reaprenden rápidamente cuando son requeridos en el futuro para una nueva recolección (Quittet, 1986; Evans y Maxwell, 1990).

El entrenamiento consiste en desarrollar y reforzar los reflejos condicionados del semental para servir a una hembra, en un recinto cerrado y en presencia de una persona. La visión así como el olfato de los animales, son muy importantes en el estímulo sexual, con lo que es importante durante el entrenamiento de los machos que este se lleve a cabo de tal forma que puedan ver a la hembra e incluso que vean como la montan otros machos (Quittet, 1986; Evans y Maxwell, 1990).

Para los propósitos del entrenamiento se precisa una hembra en estro.

Una vez que los machos cabríos estén entrenados, las hembras maniquís no necesitan estar en celo, ya que los sementales están condicionados a montar a cualquier hembra que sea colocada en el brete de monta y extracción de semen.

Es aconsejable seleccionar hembras maniquís apacibles, ya que los machos pueden distraerse con aquellas hembras que no estén completamente quietas. El régimen sexual a que se someten los sementales cabríos incide sobre la calidad seminal de los eyaculados obtenidos (Okere et al; 1986; Thwaites, 1995), siendo la frecuencia de recolectas de semen establecida en dos veces por semana para los sementales jóvenes y tres veces por semana para los individuos adultos, recolectándose en cualquier caso de dos a tres eyaculados consecutivos (Abraham, 1987; Evans y Maxwell, 1990; Sahni y Thwaites, 1992; Herrera et al;

1994). Baja frecuencia de recolectas de semen producen eyaculados con tendencia a la aglutinación (Cortés, 1998).

Es aconsejable que durante el entrenamiento de los machos se realice la determinación periódica del peso y diámetro testicular, cada 15 días. Cuando los animales son criados con el propósito de utilizarse para la extracción de semen, es recomendable evaluar el desarrollo testicular desde los tres meses de edad hasta que presenten capacidad de realizar salto con eyaculación. La determinación del comportamiento sexual se realiza cada mes, desde los 5 meses de edad (en razas precoces) para comprobar la aptitud de servicio. El tamaño testicular puede ser un buen predictor del inicio de la pubertad (Chemineau, 1984).

3.2.5.- Esterilidad en el Macho cabrío

“*Fértil*” es la palabra que suele usarse en el sentido de capaz de engendrar progenie o “que se reproduce abundantemente. Esta última connotación es más apropiada para los animales domésticos, pudiendo definirse cuantitativamente para los machos de cada especie, y en sistemas de manejo en particular. Por debajo de estas presentaciones se encuentran los grupos de infertilidad. La infertilidad leve, moderada o grave refleja el espectro de alteración de la función reproductora. La esterilidad es la infertilidad completa y permanente (Laing; Brinley y Wagner, 1986).

El clínico debe determinar si la función reproductora es normal o anormal. Para conseguirlo, debe escoger entre un abanico de técnicas que incluyen historia clínica, exploración fisiológica general del animal, exploración física de los órganos reproductores, evaluación del comportamiento reproductor, evaluación del semen, pruebas para determinar enfermedades infecto transmisibles específicas y pruebas especiales como análisis endocrinos, exámenes cromosómicos y biopsias (Laing; Brinley y Wagner, 1986).

Según Matthews (1999), en una evaluación inicial de la aptitud reproductora de un macho cabrío el historial preliminar debe considerar: si el problema es de un individuo o de todo un rebaño, si se está suministrando una adecuada

alimentación, incluidos suplementos minerales; cual es la frecuencia de empleo de los machos y la edad de los mismos.

Si se trabaja con más de un macho se debe considerar: la utilización excesiva de los machos, sobre todo cuando se utilizan fuera de temporada o en grupos de hembras sincronizadas, por ejemplo un macho puede cubrir más de 100 hembras en una temporada, pero un número de 70 hembras es más satisfactorio para un macho adulto, o bien 70 hembras para dos machos jóvenes. Un macho joven bien desarrollado y cuidado puede cubrir hasta 30 hembras en una estación de monta.

Si hay bajo impulso sexual puede ser debido a que se utilizan fuera de temporada, con hembras sometidas a tratamiento lumínico o con esponja, padecimiento de enfermedades, parasitismo etc., estado nutricional del macho e inadecuada detección de celos (Matthews, 1999)

La influencia de la raza, edad, temperatura y foto período sobre la calidad seminal del macho cabrío y por consiguiente sobre la congelabilidad de los espermatozoides del eyaculado, han sido estudiados por diversos autores, siendo el foto período el factor de mayor influencia (Corteel et al; 1980; Pérez, 1992; Herrera y Tapia, 1995; Pérez y Mateos, 1996). En zonas templadas situadas en latitudes comprendidas entre 40° y 50°, la estación sexual se ve limitada a los meses de otoño e invierno, reflejándose sobre el libido, producción seminal y calidad de los eyaculados (Corteel, 1981; Roca et la; 1989; Pérez, 1992; Pérez y Mateos, 1996).

El foto período no sólo afecta a la producción seminal, si no que también tiene repercusión sobre la composición del plasma seminal, debido a la regulación que ejercen los andrógenos en circulación sobre la actividad de las glándulas sexuales accesorias (Tresguerres, 1989), observándose un efecto menos negativo sobre los espermatozoides en época de reproducción que fuera de ella (Nunes et al; 1982).

Las razas que presentan una marcada estacionalidad sexual poseen una secreción de testosterona condicionada por la estación del año, produciéndose un incremento en la frecuencia de pulsos de LH (hormona luteinizante), lo que

provoca un incremento en la secreción de testosterona por el testículo, así como un aumento del tamaño testicular (Lincol, 1988; Tresguerres, 1989). La secreción de testosterona es mayor en la época de foto período decreciente (invierno y primavera) que durante el foto período creciente (verano y otoño). La gravedad de las alteraciones debe definirse cuando se realice el diagnóstico, así como la implicación que tiene sobre la fertilidad (Laing; Brinley y Wagner, 1986).

3.2.6.- Evaluación de un semental cabrío

La evaluación visual se utiliza para determinar lo que hizo, está haciendo y hará en el futuro. En realidad, es un estudio de la historia para predecir el futuro. Este método de apreciación contrasta con el método objetivo, en el cual todo se basa en hechos y cifras comprobadas, es decir que la evaluación objetiva se basa en hechos registrados (Sorensen Jr, 1982).

La exploración física de los órganos reproductores se realiza mediante observación y palpación, deben usarse medidas objetivas siempre que sea posible. La circunferencia escrotal medida con una cinta escrotal en machos cabríos, así como la anchura escrotal medida con calibrador, resultan comprobaciones importantes en el tamaño testicular, debiendo ser siempre registradas (Sorensen Jr, 1982).

Los machos juegan un papel muy importante dentro de un sistema de producción caprino, no solo para obtener un progreso genético dentro de la explotación caprina, si no para lograr las metas de producción que se desean en la consecuente progenie. De esta forma, si no se encuentran machos cabríos con registros de descendencia de sus hijas, es importante tener en cuenta las siguientes características en un buen reproductor. Según Durán (2007):

a.- Evaluación general. La historia clínica debe hacer hincapié en la edad, estado general sanitario y de nutrición, fechas de transporte o enfermedades y función reproductora previa. La toma de signos cardinales como la temperatura, pulso y frecuencia respiratoria añade peso objetivo a la frase de que el animal está en

buen estado general. La conformación normal y la marcha son importantes en los machos. Si se encuentran anormalidades, deben examinarse con detalle los sistemas particularmente afectados **(Laing; Brinley y Wagner, 1986)**.

b.- Estado de carnes. De contextura fuerte, con buena capacidad abdominal, sin defectos en el pelaje o piel.

c.- Artritis. Sin que se observen abultamientos sospechosos en las articulaciones del animal, generalmente la artritis es muy marcada y produce un malestar cuando el animal camina.

d.- Pezuñas insuficientes o mal recortadas. Generan renqueras constantes que imposibilitan el salto del animal.

e.- Sin defectos raciales (de acuerdo a la raza perteneciente).

f.- Sin defectos de pezones (pezones numerarios o anormales).

g.- Comprobar la actividad sexual utilizando una hembra en celo como “recela” (para inducir el celo en un momento adecuado para el examen, puede someterse la hembra a un tratamiento de prostaglandina durante las temporadas de reproducción).

h.- Libido. La secuencia normal del comportamiento en la monta comprende libido o deseo de montar, actividad de cortejo, erección y protrusión del pene, monta, movimientos pélvicos que provocan el empuje eyaculador. Cada una de estas facetas debe estudiarse por orden para comprobar los puntos en los que ocurran alteraciones en el comportamiento de monta para ayudar a diagnosticar su causa **(Laing; Brinley y Wagner, 1986)**.

i.- Examinar y palpar los genitales externos. Inspeccionar el escroto y su contenido; comprobar el tamaño, forma, consistencia y simetría de los testículos, epidídimo y cordón espermático; los testículos deben moverse libremente en la bolsa escrotal; medir la circunferencia del escroto y el diámetro del epidídimo.

j.- Escroto. Identificar *Dermatitis* escrotal, absesos, picaduras de moscas y traumatismos pueden provocar una degeneración transitoria o permanente y merma de la fertilidad.

k.- Testículos. Los testículos deben ser simétricos, grandes, ovales y consistentes durante la temporada de reproducción. La asimetría sugiere la existencia de lesiones, enfermedad o anomalía anatómica. La consistencia de los testículos se relaciona con la estructura de los tejidos. Un testículo firme y elástico indica buena espermatogénesis. Los testículos fibrosos se palpan firmes y blandos ya que la degeneración produce un testículo sin ninguna elasticidad. La cola del epidídimo es un reservorio de espermatozoides y sus características se hacen palpables, reflejando el grado de llenado, según su contenido. El aumento de tamaño y firmeza en cualquier parte del epidídimo indican inflamación o espermiostásis, que posiblemente conduzca a formación de un granuloma de esperma (Laing; Brinley y Wagner, 1986).

l.- Criptorquidia. La criptorquidia puede ser unilateral o bilateral. Los criptórquidos unilaterales son generalmente fértiles, pero la calidad del semen puede verse afectada; los criptórquidos bilaterales son estériles. En los machos cabríos de la raza Angora se ha demostrado que la criptorquidia se hereda como rasgo recesivo.

m.- Testículos aumentados de tamaño. Una hernia inguinal que cause la distensión del escroto, puede confundirse con testículos aumentados de tamaño.

n.- Orquitis. La inflamación de los testículos puede ser unilateral o bilateral, aguda o crónica. En la forma aguda, los testículos aparecen inflamados y dolorosos, y el macho aparece febril, aletargado y reacio a moverse. En la orquitis crónica, el movimiento dentro del escroto puede verse limitado por la existencia de adherencias, y los testículos resultan atrofiados y fibrosos. Las neoplasias son causa frecuente de esterilidad de los machos, pero se ha informado de la existencia de seminomas, adenomas y carcinomas.

ñ.- Hematomas. Una hemorragia intratesticular puede originar el aumento de tamaño de un testículo.

o.- Testículos pequeños. Hipoplasia testicular. Los testículos subdesarrollados se presentan particularmente en machos acornes como parte del estado intersexual o hermafrodita. La afección es por lo común bilateral y ocasionalmente unilateral. La atrofia testicular se presenta como secuela de traumatismos escrútales, orquitis, granuloma espermático o enfermedad sistémica, cuando el animal está débil y como parte del proceso de envejecimiento de algunos machos. Cuando existe fibrosis, el testículo aparece muy consistente a la palpación.

p.- Degeneración testicular. Los testículos se palpan blandos y empastados a causa de la degeneración tubular.

q.- Afecciones del canal espermático. El varicocele se presenta como un abultamiento duro en la porción dorsal del plexo pampiniforme. Esta causado por la dilatación y trombosis de la vena espermática interna.

r.- Alteraciones del epidídimo. Los granulomas espermáticos se palpan como nódulos duros en la cabeza del epidídimo, aunque los testículos exhiben consistencia normal. Esta afección se presenta particularmente en machos acornes como parte del estado intersexado, pero puede aparecer también por una infección que produzca epididimitis. Si la alteración es bilateral, el macho resulta

estéril. La epididimitis se presenta frecuentemente en machos cabríos como resultado de una infección a cargo de gérmenes muy diversos o bien, como consecuencia de traumatismos.

s.- Pene y prepucio. La inflamación del pene y prepucio origina con frecuencia tejidos cicatriciales y adherencias. La inflamación aguda y la fibrosis resultante son la causa de la esterilidad. El virus *herpes caprino "tipo I"* causa balanopostitis en machos de Nueva Zelanda y Australia, con hiperemia del pene y ulceración del prepucio. El *ectima contagioso* infecta ocasionalmente el prepucio. Así como Micoplasmas y ureaplasmas pueden estar implicados.

t.- Frenulum persistente. Las adherencias entre el pene y el prepucio presentes en los machos jóvenes antes de alcanzar la pubertad desaparecen normalmente alrededor de los cuatro meses de edad, pero en ocasiones persiste.

u.- Fimosis y Parafimosis. La fimosis consiste en la imposibilidad de sacar el pene de la bolsa prepucial en la cubrición. Puede estar producido por traumatismos, pero en ocasiones es congénito. Parafimosis. La parafimosis es la incapacidad de retirar el pene el interior del prepucio. Como consecuencia, el pene se inflama y edematiza.

v.- Pene corto. Un pene corto resulta incapaz de salir más allá del prepucio. La afección no tiene tratamiento.

w.- Hematoma del pene. Los hematomas del pene son consecuencia de lesiones y golpes, como los causados en las montas accidentales.

x.- Examen del semen. Aunque la evaluación visual del macho cabrío depende de los niveles de testosterona la cual es directamente proporcional al carácter reproductor del macho y determina la libido sexual del mismo, esta no es funcional si no se producen espermatozoides (Sorensen Jr, 1982).

Las muestras de semen se comprueban en volumen, concentración, movimiento en ola, motilidad progresiva hacia delante, porcentaje de espermatozoides vivos y los tipos de morfoanomalías (Laing; Brinley y Wagner, 1986).

3.2.7.- Problemas individuales de los machos cabríos

Algunos problemas que se detallan a continuación son considerados usuales dentro de los programas de selección de sementales cabríos o se presentan en el proceso de recolección de semen. Según Durán (2007):

a.- Incapacidad absoluta para efectuar cubriciones.

b.- Libido baja.

c.- Estacionalidad, la temporada normal de cría va desde septiembre a marzo, pero hoy se aspira a que muchos machos cubran fuera de temporada después de tratar las hembras con regímenes lumínicos especiales o tratamientos hormonales. Si es posible, los machos deberían ser estimulados, con ayuda de luz, al mismo tiempo que las hembras. La mayoría de los machos cubren en cualquier época del año, pero fuera de temporada debe esperarse cierta reducción de la libido.

d.- Mal estado de carnes por enfermedad coexistente, como parasitosis y déficit energético o proteico.

e.- Bajo impulso sexual, que resulta ser un carácter sexual hereditario.

f.- Presencia de otros machos. La competencia puede excitar la libido; así mismo, un macho dominante puede suprimir la libido de los inferiores.

- g.- Incapacidad de montar debido a lesiones esqueléticas o musculares.
- h.- Problemas de pezuñas como laminitis y uñas demasiado largas.
- i.- Incapacidad de cubrir adecuadamente. Un macho joven (4 meses) puede tener dificultad en sacar el pene, debido a adherencias entre el pene y el prepucio.
- j.- Imposibilidad de lograr la penetración debido a anomalías del pene por adherencias y cicatrices, hematomas y pene corto.
- k.- Imposibilidad de empujar debido a estrés, cansancio, nerviosismo, entorno extraño, sobrepeso y dolor dorsal.
- l.- Empleo excesivo. Sobre todo fuera de temporada y cuando se sincroniza un gran número de hembras; la disminución de la densidad del esperma puede requerir 6 semanas o más para la recuperación.
- m.- Edad. Los animales muy viejos o muy jóvenes pueden exhibir una reducida densidad del esperma.
- n.- Nutrición. Los machos jóvenes son particularmente sensibles a la alimentación pobre, con déficit proteico y energético, así como carencia de vitamina A. El papel de los elementos vestigiales no está bien documentado, pero las carencias de cobre, manganeso, cobalto, zinc y fósforo pueden afectar a la producción de esperma.
- ñ.- Enfermedad coincidente. La fiebre reduce la densidad del esperma al dañar testículos y epidídimos, provocando lesión permanente, en algunos casos requiere un mínimo de 6 semanas de recuperación. El ciclo espermatogénico dura unos 22 días en el macho cabrío y la fertilidad normal no se recupera hasta que se completa éste.

o.- Revestimiento espeso del pelo. Un macho cabrío Angora sin esquilarse y en posesión de un espeso vellón puede ver reducida su fertilidad, debido al aumento de la temperatura de la bolsa escrotal, lo que ejerce efecto sobre la espermatogénesis. Incluso después del esquilado, se necesita 6-8 semanas para volver a alcanzar la total fecundidad.

p.- Las enfermedades como neumonía, parasitismo, abscesos de la pezuña, renqueras e infecciones del prepucio por *Corynebacterium renale* reducen la capacidad de cópula en machos cabríos jóvenes. La espermiostasis es un serio problema en algunas razas de machos cabríos con aptitud lechera, siendo los casos aspérmicos bilaterales más frecuentes que los animales afectados unilateralmente. La inhibición sexual de los machos cabríos jóvenes durante su primera temporada de monta, puede también contribuir a la baja fertilidad (Laing, Brinley y Wagner, 1986).

3.3.- Recolección de semen

Existen dos métodos para recolectar el semen, denominados como el método de vagina artificial y el de estimulación eléctrica. Es preferido el primero de los citados dada su rapidez y limpieza, no es estresante para el semental y proporciona un semen de mejor calidad. Por el sistema de la vagina artificial se puede recoger semen, varias veces al día. La estimulación eléctrica se debe usar solo cuando el macho cabrío no pueda montar con vagina artificial por discapacidad física. Este método tiene el inconveniente de producir malestar en el macho, no se puede hacer frecuentemente y el semen suele contaminarse fácilmente con orina, durante la recolección. El semen extraído por este método presenta mayor volumen, pero menor concentración que cuando se obtiene por vagina artificial (Evans y Maxwell, 1990).

3.3.1.- Recolección de semen por vagina artificial

Las especies con eyaculación espontánea deben ser estimuladas sexualmente por sujeción activa y monta sin recogida llamada “monta falsa” para obtener un eyaculado concentrado y de alta calidad (Laing, Brinley y Wagner, 1986).

La primera vagina artificial fue diseñada por G. Amantea, un profesor de fisiología de la Universidad de Roma, en 1914, quien recolectó semen de perro.

Este dispositivo es el método que más se parece a las condiciones naturales en el interior de la vagina en una hembra normal, pretende simular la temperatura, presión, lubricación y posición más conveniente e ideal para obtener un eyaculado de buena calidad. Consta de un soporte externo, rígido o poco flexible, con un forro interno de goma el cual cumple la función de contener el agua caliente y ejercer presión suficiente para provocar una eyaculación exitosa (Sorensen Jr, 1982).

La eyaculación es el resultado de la estimulación nerviosa del glande que da lugar a unas contracciones musculares reflejas del tracto reproductor. Para producir los adecuados estímulos nerviosos la vagina artificial debe estar por encima de la temperatura corporal del animal y debe ejercer una cierta presión sobre el pene. El forro interno de la vagina artificial será de baja fricción o estará lubricado con una sustancia que no sea espermaticida (Laing, Brinley y Wagner, 1986).

Cuando se realiza un programa de extracción de semen para su utilización en fresco, congelado o para realizar un examen seminal, se debe tener una serie de cuidados nutricionales, sanitarios, así como realizar una correcta revisión clínica (Abad, M.; Gibbons, A. 2000).

La técnica más recomendada para obtener una colecta de semen es el empleo de una vagina artificial, que provee estimulación térmica y mecánica para producir la eyaculación (Abad, M.; Gibbons, A. 2000).

La vagina artificial tiene una parte tubular externa rígida, por lo general de polipropileno térmico, de 17 cm de largo y 5,5 cm de diámetro. A esta cubierta o

tubo se ajusta una camisa interna de látex (linner). Esta se repliega y asegura sobre los extremos del tubo con bandas elásticas, formando entre la cubierta y la camisa, un compartimiento hermético donde se introduce agua atemperada, formando una bolsa de agua. En uno de los extremos de la vagina se adosa un embudo de goma y se coloca un tubo colector de vidrio o copa recolectora (Gibbons, et al, 2007).

La bolsa formada entre la cubierta de caucho y la camisa de látex se carga con agua caliente a 50°C hasta un volumen de 2/3 partes. Desde el momento de llenado hasta el uso de la vagina artificial, debe evitarse la pérdida de calor, siendo importante que la temperatura de la misma al momento de la eyaculación sea de 38 °C a 40°C. El acondicionamiento final de la vagina se logra por el agregado de aire a la cámara de agua con el fin de estrechar la luz vaginal aproximadamente a 1 cm de diámetro (Abad, M.; Gibbons, A. 2000).

La recolección de semen se realiza en un lugar limpio y libre de polvo. Se recortan los pelos del prepucio para disminuir la contaminación del semen y se lava el prepucio con abundante solución fisiológica. Los machos caprinos generalmente se acostumbran con facilidad a realizar la eyaculación en la vagina artificial. La técnica consiste en colocar al cabro detrás de una hembra maniquí inmovilizada, para inducir el salto, se espera a que el animal presente su pene y se arme para realizar el salto, en ese momento se realiza la desviación manual del pene hacia la vagina artificial. El tubo colector debe protegerse de los cambios bruscos de temperatura en un baño de agua a 30 °C (Abad, M.; Gibbons, A. 2000). Durante su operación, se recomienda continuar su protección, manteniendo el tubo colector dentro de una funda de tela.

Antes de la recogida de semen, se debe limpiar, cuidadosamente, el prepucio del macho, para evitar cualquier contaminación. La hembra maniquí se debe sujetar a lo que se llama un potro o cepo de extracción. Esa hembra debe tener el pelo o la lana corta, sin suciedad en la parte trasera. El operario, en posición de agachado y listo, se coloca al lado derecho del maniquí y ubica la vagina artificial en este flanco, sujeta esta con la mano derecha, con el extremo

abierto dirigido hacia el prepucio del macho en un ángulo de 45°. La espita o válvula reguladora de la vagina artificial debe dirigirse hacia abajo, para evitar cualquier contacto con el macho (Evans y Maxwell, 1990).

Cuando el semental se acerca al brete o potro de extracción, puede que muestre un comportamiento cortés hacia la hembra, por ello el operario debe estar siempre prevenido y atento a que el semental puede de inmediato montar a la hembra maniquí en forma abrupta. Cuando tal situación ocurre, el pene erecto se debe dirigir hacia el extremo abierto de la vagina artificial. Los operarios diestros pueden ser capaces de interceptar el pene, pero a menudo se requiere la mano izquierda para sujetar la vaina del pene y dirigir este al extremo abierto de la vagina artificial. El pene se debe dirigir hacia la parte superior de la vaina y esta se retirara en el momento que el macho desmonte. Los movimientos vigorosos hacia adelante y hacia arriba del macho significan que se ha producido la eyaculación. Se debe dejar que el macho retire el pene de la vagina antes de intentar retirar esta (Evans y Maxwell, 1990).

Inmediatamente después, la vagina artificial se cambia de posición, quedando el tubo de vidrio o copa recolectora en la parte inferior, se abre la válvula reguladora que descarga la presión de aire y el agua, teniendo la precaución de que no salpique agua cerca del tubo recolector de semen. Posteriormente, se limpia el exterior de la copa recolectora, se etiqueta, se tapa y se coloca en baño de agua a 30 °C (Evans y Maxwell, 1990).

Cuando los machos no manifiestan intenciones de montar a la cabra maniquí que no está en celo, se recomienda aplicar a la cabra 1 mg de valerato de estradiol, al menos dos días antes de la monta. Las hembras tratadas presentarán celo 48 horas después de la aplicación siendo necesario repetir la aplicación día por medio para mantener la inducción (Gibbons, et al, 2007).

Cuando se inicia la época de obtención de semen y si los animales no han estado previamente en servicio, se recomienda no utilizar los primeros eyaculados para el congelamiento, con la intención de remover las reservas espermáticas viejas. En caso de que los machos estén en servicio, es recomendable darles un descanso sexual de una semana, antes de iniciar las colectas seminales (Abad,

M.; Gibbons, A. 2000).

Se dice que los machos tienen capacidad de preñar a lo largo de todo el año, aunque su capacidad de servicio (número de hembras por día) y su calidad seminal es menor durante el verano por efecto de foto periodo largo, así en invierno o época de servicio, se muestran más fértiles (Gibbons, et al, 2007).

La frecuencia de obtención de semen esta supeditada a cada macho en particular. Para un programa de congelamiento se recomienda obtener uno o dos eyaculados diarios, durante 4 a 5 días consecutivos y dar reposo de 3 a 4 días posteriores (Gibbons, et al, 2007).

Una vez obtenido el semen, este se debe colocar en un baño maría a 30 °C registrándose volumen, densidad y color. Una pequeña gota sobre un portaobjetos tibio nos permite observar el grado de movimiento en masa o motilidad masal, que nos da una estimación del porcentaje de espermatozoides vivos y su concentración varía entre individuos y aún más entre eyaculados de un mismo animal. El volumen promedio de un eyaculado caprino es de 1ml, con 85% de motilidad y $3,5 \times 10^9$ espermatozoides/ml de concentración espermática (Gibbons, et al, 2007).

Si la temperatura interna de la vagina artificial es demasiado baja, o si la presión no es suficiente, el macho monta a la cabra, penetra la vagina artificial pero no empuja, ni eyacula. Si la temperatura es demasiado alta se retira con rapidez y desmonta. Será necesario hacer un gran esfuerzo para conseguir que el animal supere esa experiencia negativa y vuelva a montar a la hembra, así mismo, si la presión es excesiva, la penetración se dificulta o bien, si hay penetración los problemas aparecen en el momento de sacar el pene de la vagina artificial (Sorensen Jr, 1982).

El “choque” por frío es una situación fisiológica irreversible de los espermatozoides que han sufrido un enfriamiento rápido y que da como resultado el pliegue del flagelo, pérdida de los componentes intracelulares y disminución de la capacidad fecundante (Laing, Brinley y Wagner, 1986).

En general, la recolección de semen por este método de vagina artificial se prefiere ampliamente al empleo de estímulo eléctrico, porque el semen

recolectado por estimulación eléctrica provoca una mayor descarga de líquido procedente de las glándulas accesorias y en consecuencia se obtiene una menor concentración de espermatozoides (Vélez, 1993).

3.3.2.- Recolección por estímulo eléctrico

Existen diferentes tipos de estimuladores eléctricos, los más corrientes son los que tienen un electrodo bipolar que se coloca en el recto del animal. El aparato más comúnmente utilizado en Australia y Nueva Zelanda, es el Ruakura Ram Probe. Se trata de un estimulador accionado por baterías que proporciona una salida de 10 o 15 voltios. Cuando el recto del macho está seco se recomiendan utilizar los 15 voltios.

Para la recolección de semen, el macho se debe colocar en decúbito lateral, sobre una mesa o en el suelo, siempre que este limpio. Se deben cortar los pelos o la lana larga que bordea la vaina y el prepucio se debe limpiar adecuadamente. La sonda o electrodo se humedece o lubrica con vaselina y se inserta en el recto a una profundidad de 15 a 20 cm, procurando no lesionar la mucosa. El pene se debe extender por enderezamiento de la flexura sigmoidea de tal forma que el glande del pene se pueda sujetar con la mano limpia, y liberar el pene del prepucio. Por detrás del glande se coloca una pieza de gasa y se introduce el glande en un tubo de ensayo estéril. Lo mejor es sujetar el pene y el tubo de ensayo con la misma mano, dejando la otra libre para dar masaje en el pene en dirección hacia delante entre cada estímulo eléctrico (Evans y Maxwell, 1990).

La recogida del semen por electroeyaculación se emplea a menudo en clínicas para realizar evaluaciones de pureza de cría. La utilidad de éste método para la inseminación está limitada por un gran número de factores que suelen incluir una recolección disminuida de espermatozoides con características seminales menos consistentes. Los eyaculados obtenidos por estímulo eléctrico son típicamente más diluidos debido al aumento de volumen del fluido de las glándulas accesorias y la motilidad de los espermatozoides es frecuentemente

más baja, particularmente si las reservas epididimales de espermatozoides están un poco agotadas o hay contaminación por orina (Laing, Brinley y Wagner, 1986).

Un ayudante debe presionar sobre la sonda hacia el suelo de la pelvis, aplicando luego cortos estímulos (de 3 a 8 segundos) en intervalos de 15 a 20 segundos. Después de unos cuantos estímulos fluirá la secreción de las glándulas accesorias y luego el semen. Cuando se obtengan inicialmente grandes cantidades de líquido claro, se deben desechar para evitar diluciones innecesarias del semen. Existe una amplia variedad entre los estímulos que necesitan los diferentes sementales hasta producir un eyaculado satisfactorio. Sin embargo, si se exceptúa lo poco confortable que en algunos animales se observa y las contracciones musculares que aparecen al aplicar la corriente, no existen efectos nocivos achacables a esta técnica (Evans y Maxwell, 1990).

La ventaja de la electroeyaculación radica en la capacidad de recolectar semen sin que el macho experimente una respuesta sexual, así mismo, es posible obtener semen de machos cabríos incapacitados para la cópula y no se necesita una cabra en celo para recolectar semen.

3.4.- Manejo y valoración del semen

Para la valoración del semen son indispensables realizar diferentes análisis macroscópicos y microscópicos, que a continuación se detallan.

3.4.1.- Color y olor del semen.

El color del semen caprino varía de blanco cremoso a amarillento. Dicha coloración es producida por la presencia de riboflavinas en el plasma seminal (Mendoza et al; 1989), y está sujeta a variaciones raciales e individuales. Tonalidades grises, pardas y rosáceas son indicadoras de contaminación y de algunas afecciones del sistema reproductor; y de la presencia de hematíes (los hematíes son normalmente células sanguíneas con forma de discos bicóncavos) en el semen (debido principalmente a lesiones del pene durante la recogida), respectivamente (Abraham, 1987). Si hay presencia de orina, existirá un olor característico además de que la coloración será menos intensa. Esto es una

posibilidad, bastante corriente, cuando se obtiene semen por electroeyaculación.

Se ha observado anteriormente el semen de macho cabrío de distintas razas de diferentes partes del mundo, donde el color y consistencia es de lechosa blanca o grisácea a cremosa blanca amarillenta, el color amarillento claro que se ve ocasionalmente en los eyaculados de los machos cabríos se debe a la riboflavina segregada por las glándulas accesorias y no tiene ninguna relación a infecciones u otros trastornos de los espermatozoides (Roberts, 1984).

Los grumos, coágulos o grandes copos en el semen se deben a la presencia de pus, por lo general de las glándulas accesorias o de las ampollas. El color rojo o rosado se debe a la presencia de variables cantidades de sangre del tracto genital, la uretra o el pene; un color marrón claro puede deberse a la contaminación con heces (Roberts, 1984).

3.4.2.- Volumen del semen

La determinación del volumen se realiza inmediatamente después de su recogida, valorándolo directamente en el tubo colector (graduado en 0,1 ml), evitando de esta manera el error producido al pasar el eyaculado de un recipiente a otro para su valoración. La medida del volumen del eyaculado se efectúa por lectura directa de la graduación que hay en el tubo de recolección del semen. El volumen medio por eyaculado está entre 1 y 1,5 ml pero puede ser muy variable (Evans y Maxwell, 1990).

El volumen se mide en forma directa dentro del recipiente de recolección o copa recolectora. El empleo de tubos graduados facilita una rápida medición en el caso de toros, carneros, machos cabríos y garañones (Sorensen Jr, 1982).

Las eyaculaciones repetidas y frecuentes pueden disminuir temporalmente el volumen del eyaculado. Un aumento o declinación en el volumen del semen eyaculado no se correlaciona, en general, con la fertilidad o esterilidad de un macho, a menos que no hubiera eyaculación (Roberts, 1984).

El volumen medio de un eyaculado en ganado caprino es de 1 ml, existiendo variaciones según el método de recogida, especie, estado fisiológico

del macho, raza, edad, tamaño corporal, alimentación y régimen sexual al que se le somete (Derivaux, 1982; Memon et al; 1986; Pérez, 1992; Cortes et al; 1994).

3.4.3.- Motilidad de los espermatozoides

La motilidad se valora mediante la característica onda de movimiento del semen y también, según la proporción de la motilidad progresiva de los espermatozoides observada en una muestra. La valoración por la onda de movimiento es el sistema más simple para determinar la movilidad del semen fresco. Cuando el semen ha sido diluido extensivamente o congelado y descongelado se debe utilizar la valoración mediante la proporción de espermatozoides progresivamente móviles. Los espermatozoides pueden tener los siguientes tipos de movimiento: (i) movimiento progresivo hacia adelante, (ii) movimiento circular o rotatorio, (iii) movimiento oscilatorio o convulsivo sin progreso ni cambio de posición. Estos movimientos solo pueden ser visualizados mediante microscopia, en un cubre-objetos. Para la inseminación sólo se deben usar muestras de semen que presenten altas proporciones de espermatozoides con motilidad progresiva. La velocidad de movimiento hacia adelante de un espermatozoide suspendido en plasma seminal, es de 5 a 15 mm/min (promedio 7mm/min) (Evans y Maxwell, 1990; Pomerol y Arrondo, 1994).

La velocidad y tipo de movimiento de los espermatozoides puede variar según un gran número de factores: método de recogida del semen, factores ambientales, manejo del semen después de recogido, intervalo entre la recogida y la valoración y variaciones individuales del propio semental. También, existen diferencias en la motilidad de los espermatozoides de macho cabrío con relativas variaciones estacionales; sin duda, estas variaciones están relacionadas con diferencias de fertilidad manifiestas (Evans y Maxwell, 1990; Pomerol y Arrondo, 1994).

La motilidad de los espermatozoides se basa en el porcentaje estimado de espermatozoides móviles y su intensidad de movimiento. El primer eyaculado después de un largo período de inactividad sexual tiene baja motilidad así como el aumento del número de espermatozoides muertos. La evaluación de la motilidad puede efectuarse en campo calentando suavemente el portaobjetos con el semen colocado sobre una botella plana que contiene agua tibia a la temperatura corporal. El enfriamiento del semen desde la temperatura corporal a la heladera provoca una pérdida gradual de motilidad, hasta que se llega a la inmovilidad casi completa, por lo tanto el semen debe ser siempre examinado a la temperatura corporal y poder así hacer lecturas precisas y comparativas. Es conveniente diluir el semen en solución salina caliente de Ringer o en una de citrato de sodio al 2,9 % para poder observar más fácilmente el porcentaje de espermatozoides móviles (Roberts, 1984).

a.- Motilidad masal

Es una medida rápida y fácil que necesita de un examen microscópico del semen, recién recogido. Una gota de semen puro se deposita en un porta objetos colocado sobre la plantilla térmica adicionada al microscopio y se observa a través de éste con un lente de al menos 80 aumentos (80X). La observación se debe hacer muy rápidamente puesto que la motilidad del semen puro se ve afectada por la temperatura en cuestión de 15-20 segundos (Ureña, 2007).

La valoración se realiza utilizando una escala que va del 0 (sin ningún movimiento) a 5 (movimientos muy fuertes), de manera que es necesario también que la persona que la realice esté entrenada. Esta técnica es suficiente para detectar los eyaculados en los que los espermatozoides están muertos o son muy poco móviles, pero es muy imprecisa para diferenciar los eyaculados con diferentes porcentajes de espermatozoides móviles o diferentes motilidades individuales (Ureña, 2007).

Esta prueba valora la formación y progresión de ondas producidas por el desplazamiento de los espermatozoides. La onda de movimiento solo puede ser observada en especies de alta concentración espermática, como es el caso de pequeños rumiantes (Carbonero, 1954; Maxwell y Evans, 1990).

b.- Motilidad Individual de los Espermatozoides

Se realiza al mismo tiempo que la estimación de motilidad masal, y se evalúa sobre una escala de 0 (ningún movimiento de los espermatozoides) a 5 (espermatozoides rápidos y con movimiento rectilíneo). Esta estimación debe tener en cuenta la velocidad de desplazamiento de los espermatozoides, la rectitud de este movimiento y de los movimientos laterales. También se necesita un entrenamiento pero no hay pruebas objetivas que permitan su estandarización (Ureña, 2007).

Estas dos pruebas son suficientemente precisas con entrenamiento como para juzgar si los eyaculados se deben aceptar o no en función del porcentaje de espermatozoides móviles. Son utilizados igualmente para apreciar la calidad del semen una vez que éste ha sido descongelado (Ureña, 2007).

La movilidad individual es una de las pruebas que con mayor frecuencia se utilizan para evaluar la calidad seminal y en algunas especies parece estar correlacionada con la capacidad fertilizante del espermatozoide (Maxwell y Evans, 1990; Pomerol y Arrondo, 1994). La movilidad espermática se valora rutinariamente de manera subjetiva mediante un microscopio óptico (a 10X o 20X) sobre una gota de semen diluido en una solución isosmótica, determinando el porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad de movimiento. La utilización de métodos fotográficos y sistemas computerizados han relegado a un segundo plano la valoración subjetiva por parte de los técnicos (OConnor et al; 1981; Hunter, 1982; Burkman, 1995). Los actuales sistemas de análisis de imagen asistidos por ordenador o sistemas C.A.S.A (Computer-Assisted-Sperm-Analysis) son capaces de determinar, de manera objetiva, toda una serie de parámetros de velocidad y angularidad (OConnor et al; 1981 Jasko et al; 1988; Tuli et al; 1992; Theau-Clement et al; 1996), que colaboran en el establecimiento de un grado de calidad de movimiento (Ginsburg et al; 1988; Burkman, 1995; Nunez et al; 1996).

El movimiento desarrollado por los espermatozoides es característico de cada especie y del estado fisiológico en que se encuentre (movimiento tras la eyaculación, dilución, refrigeración, congelación, hiperactivación etc.) (Ginsburg et

al; 1988; Pérez et al; 1994; Burkman, 1995; Vinader et al; 1996), estando sujeto también al efecto ejercido por el método de recogida, factores ambientales y manejo del semen tras su obtención. Existen también variaciones estacionales relativas a la movilidad de los espermatozoides de macho cabrío, estando relacionadas con la fertilidad (Maxwell y Evans, 1990; Pérez, 1992).

c.- Porcentaje masal de espermatozoides móviles

Esta medida se realiza similar a la anterior, en el microscopio a 100 aumentos y con semen diluido entre 6,0 y 2,0 x 10⁹ espermatozoides/ml. El observador estima en forma visual, tras el examen sucesivo de 5 campos diferentes de una muestra colocada en el porta objetos, el porcentaje de espermatozoides móviles, de forma que una persona entrenada de un resultado repetible. Para el aprendizaje y el entrenamiento de la estimación visual, es necesario que el laboratorista realice un entrenamiento comparativo de esta técnica con el porcentaje real de espermatozoides vivos que se obtiene con la prueba de eosina/nigrosina (Ureña, 2007).

Esta valoración que utiliza una coloración eosina/nigrosina, es eficaz para determinar el porcentaje exacto de espermatozoides muertos y el de espermatozoides anormales. El porcentaje de formas anormales puede cambiar con la estación del año en el caso de la especie ovina pero no en la especie caprina; y con la temperatura ambiente elevada tanto en ovinos como caprinos. Por ello, si no se producen problemas debidos a temperaturas muy elevadas éste análisis no es frecuente realizarlo en la especie caprina (Ureña, 2007).

Para conocer la calidad del semen, es útil determinar el porcentaje de formas anormales en muestras de semen cada dos semanas. El semen de los reproductores no debe contener más de un 20 a 30% de espermatozoides muertos (coloreados) y no más de un 15 a 20% de espermatozoides anormales, en el primer eyaculado de una serie. Estos valores disminuyen normalmente con el número de colectas (Ureña, 2007).

d.- Preparación del colorante eosina/nigrosina con tricitrato.

Cuadro 1		Reactivos del colorante eosina / nigrosina con tricitrato de sodio.
Reactivo		Cantidad (g)
Eosina	(soluble en agua)	1,00
Nigrosina	(soluble en agua)	2,00
Tricitrato de sodio		3,57
Agua destilada	(ml)	100,00

Fuente: (Ureña, 2007).

El colorante se elabora y utiliza de la siguiente manera: Según Ureña (2007):

- i.- Tras la obtención de una solución homogénea, esta se debe dejar reposar durante 24 h y luego se filtra. Se debe medir el pH, ya que debe estar comprendido entre 6,7 y 6,8 de manera que se debe añadir citrato sódico si fuera necesario ajustar el pH requerido. La presión osmótica de la solución debe ser de unos 310 mOsm/kg y debe conservarse a 4°C y el pH debe controlarse mensualmente.
- ii.- Utilizar un porta objetos limpio y seco sobre una placa calefactable a 30°C.
- iii.- En la parte izquierda del porta objetos, se colocan 3 gotas de colorante.
- iv.- Añadir una gota de semen diluido (dilución de 1 parte de semen y 4 partes de diluyente) y mezclar con el colorante durante 10 segundos.
- v.- Dejar reposar la mezcla durante 50 segundos.
- vi.- Extender la mezcla colorante y semen con la ayuda de un cubre objetos.
- vii.- Identificar el porta objetos con el número del macho y del eyaculado.

- viii.- Conservar la lámina preparada en una estufa a 30°C o en una caja de porta objetos cerrada e identificada y añadir aceite de inmersión cuando se vaya a observar al microscopio. En estas condiciones la preparación puede conservarse sin alteración durante varios meses.

El método de conteo, de las diferentes clases de los espermatozoides procede de la siguiente forma: Según Ureña (2007).

- i.- Colocar la muestra teñida en un porta objetos y se examina distintos campos de la misma muestra hasta que se cuenten aproximadamente unos 150 espermatozoides. Este conteo se debe repetir al menos una vez para obtener una medida precisa.

- ii.- Es necesario distinguir los espermatozoides coloreados: Todo espermatozoide coloreado, en su totalidad o en parte, en rosa o en rojo, se considera como muerto en el momento de la coloración. Este número es utilizado para calcular el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.

- iii.- También se requiere ubicar los espermatozoides anormales que pueden repartirse en distintas clases: Sin cola, con una anomalía a nivel de la cabeza, con anomalía en la cola, con gota citoplasmática proximal o distal. El cálculo de los distintos porcentajes permite clasificar los animales y decidir cuáles pueden ser utilizados para (IA) de manera conveniente. Un examen regular del semen de cada macho permite la detección de anomalías inesperadas en el semen o descubrir que un macho sufre alteraciones espermáticas. En efecto los espermatozoides sufren muy rápidamente alteraciones en el caso de infecciones, incluso muy localizadas.

3.4.4.- Concentración de espermatozoides

El objetivo de esta medida es poder determinar el número de

espermatozoides por ml de semen puro utilizando la mínima cantidad de semen (Ureña, 2007).

La determinación con exactitud de la concentración, se refiere al número de espermatozoides por unidad de volumen (normalmente expresado en ml), es muy importante ya que la relación de dilución depende de ella. El semen de macho cabrío de buena calidad contiene de $3,5$ a $6,0 \times 10^9$ espermatozoides/ml (Evans y Maxwell, 1990).

El número de espermatozoides en el eyaculado depende de factores como la edad, el tamaño de los testículos, la preparación sexual y el método de recolección del semen. Las técnicas usadas para medir la concentración de espermatozoides deben ser muy precisas ya que pequeños errores se traducen en enormes diferencias cuando consideramos los factores de dilución. El diluyente de la fracción seminal utilizada para esta medida debe detener el movimiento y prevenir el agrupamiento de las células. Una solución de alta presión osmótica como el cloruro sódico (NaCl) funciona bien para éste propósito (Laing, Brinley y Wagner, 1986).

Es necesario determinar el número de espermatozoides por unidad de volumen, ya que este multiplicado por el volumen permite conocer el número total de espermatozoides por eyaculado. Aunque se sabe que la relación entre la concentración en el eyaculado y la fertilidad es baja, es un hecho que si no existen espermatozoides en el eyaculado, el macho es estéril; en cierta concentración, el animal es de dudosa fertilidad y en otras, la fecundidad debe ser elevada. Es sobre esta base que el parámetro se vuelve importante, algunos de los métodos son practicables bajo ciertas circunstancias, mientras que otros no (Sorensen Jr, 1982).

La concentración de espermatozoides puede ser valorada por ensayos basados en la consistencia o apariencia del semen, o por el uso de un hemocitómetro, colorímetro o contador electrónico de partículas (Coulter). Los diferentes métodos varían en su rapidez y seguridad. El método del hemocitómetro es más lento pero más seguro. El colorímetro es rápido y seguro, los contadores electrónicos de partículas son caros y no adecuados para utilizar

en el campo (Evans y Maxwell, 1990).

La técnica más empleada en la valoración de la concentración espermática es la espectrofotometría donde la concentración seminal se obtiene mediante una tabla de conversión, asignando a cada valor de transmitancia, un valor de concentración previamente calculado mediante recuento directo o contador de partículas (Sorensen, 1982; Boixo, 1994). Las diferentes tonalidades de color presentes en los eyaculados caprinos no interfieren en el resultado obtenido mediante esta técnica, debido al título de la dilución empleada (Campos et al; 1994).

La concentración media estimada en el ganado caprino es de 2,5 a 3,0 x 10⁹ espermatozoides/ml (Abraham, 1987; Maxwell y Evans, 1990), siendo susceptibles a variaciones estacionales, raciales e individuales (Memon et al; 1986; Corteel, 1981; Pérez, 1992; Cortes et al; 1994). Las diferencias entre eyaculados son menores cuando los machos están sometidos a un ritmo periódico de recogidas.

3.4.5.- Métodos de conteo de espermatozoides en el eyaculado

a.- Cámara de Neubauer o Hemocitómetro

Los componentes del hemocitómetro completo (o contador de células sanguíneas) está formado por una cámara de conteo, un cubre objetos y dos pipetas de mezcla provistas de un tubo flexible y una boquilla. La cámara de conteo es un porta objeto de vidrio grueso provisto de dos retículas de conteo, situadas en las caras inferior y superior del porta objeto. El diseño de la retícula varía según el tipo de hemocitómetro, pero normalmente contiene grupos de 16 cuadros pequeños divididos por líneas dobles o triples en cuadrados más grandes. Cada pipeta de mezcla posee una parte capilar y un bulbo. Para diluir el semen de macho cabrío se debe utilizar una pipeta que tiene una perla de vidrio, de color rojo dentro del bulbo. La pipeta tiene graduaciones de 0,5 y 1,0 en la parte capilar y la marca 101, por encima del bulbo. Es necesario diluir el semen con solución

salina al 3%, para inmovilizar los espermatozoides para el conteo (Sorensen Jr, 1982).

Esta técnica es precisa pero se debe realizar de manera cuidadosa. El principio de la medida es el conteo del número exacto de células espermáticas que se encuentran en un volumen determinado. La mayoría de las cámaras se componen de varias cuadrículas de un tamaño de $1/400 \text{ mm}^2$. La distancia entre el porta objetos y el cubre objetos es constante de manera que el volumen que alberga es de $1/4000 \text{ mm}^3$ por cada cuadrícula. De manera que, contando 10 cuadrículas grandes que a su vez albergan 16 cuadros del tamaño anteriormente mencionado, el volumen que se analiza es de $4/100 \text{ mm}^3$. Si la dilución inicial es de 0,01 ml de semen puro por 4 ml de suero fisiológico, es decir una dilución de 1/400, la concentración real del eyaculado se podrá calcular fácilmente (Ureña, 2007).

Las etapas a seguir para el conteo de espermatozoides con este método según Ureña (2007) son:

- i.- Sacar una muestra de 0,01 ml de semen puro y diluirlo en 4 ml de suero salino formolado (0,9% de cloruro de sodio; 0,1% de formaldehído en agua destilada) y después homogeneizar la solución.
- ii.- Con una pipeta tipo Pasteur o Sally, se deposita una gota de la solución, sin burbujas, en el borde de la cámara, de manera que por capilaridad ingrese la solución del semen al interior de los campos de conteo.
- iii.- Dejar reposar algunos minutos a fin de que los espermatozoides se depositen en el fondo.
- iv.- Colocar la cámara en el microscopio con contraste de fases y un aumento de 100X.

- v.- Contar al menos 10 cuadrados grandes por rejilla. Si un conteo difiere de la media en más del 10% es necesario repetir el conteo.

Esta técnica es muy precisa pero requiere práctica y concentración durante el conteo para ser utilizada como rutina en un centro de inseminación artificial.

b.- Medida de la densidad óptica mediante un espectrofotómetro

Es la técnica más eficaz puesto que combina rapidez y precisión. El principio general es el medir la densidad óptica (a 550 nm) de la solución salina formolada anteriormente mencionada, que contiene los espermatozoides, y compararla con un blanco que no contenga espermatozoides. Antes de utilizar esta técnica es necesario obtener una curva estándar utilizando de 20 a 50 muestras de semen con concentraciones de espermatozoides conocidas, determinadas normalmente con la técnica anterior. La correlación y la pendiente de la regresión lineal se calculan entre la densidad óptica de la muestra y su concentración de espermatozoides. El coeficiente de correlación debe ser superior a 0,9 y la pendiente de la curva próxima a 1. De todos modos todos los años es necesario realizar un control de rutina para evitar que se produzca una deriva en el espectrofotómetro (Ureña, 2007).

c.- Espermodensímetro de Karras

Este instrumento se utiliza para determinar la densidad del eyaculado, a través de la observación volumétrica. Este contiene una graduación donde se puede observar el enturbiamiento producido por la espermiosuspensión de la muestra en distintas escalas. La prueba sirve tanto para usarla con semen de toro como de macho cabrío. Primero se llena en el densímetro con 10,0 ml de una solución salina (NaCl) de 0,9 o 1,0%. La medida de la solución de NaCl es hecha por medio de una pipeta graduada. Luego tome 0,1 ml de semen puro a ser

examinado y agregue a la solución de NaCl, por último cubra el densímetro con su dedo pulgar y voltéelo dos o tres veces cuidadosamente para suspender las células espermáticas uniformemente dentro de la solución salina.

En eyaculados muy espesos es posible leer donde se marca diferencia la turbidez de la solución, y se lee en la escala la concentración con respecto al factor de dilución empleado (0,1/10). En eyaculados menos concentrados, agregue cada vez 0,1 ml de semen a la solución hasta que la turbidez sea diferenciada en el densímetro. Una vez que haya encontrado la mezcla adecuada anote los resultados de la medición (0,2/10; 0,3/10) y luego compárelos en la tabla de interpretación.

La lectura de los valores en el densímetro, se realiza poniendo una hoja blanca detrás de la cámara para facilitar la lectura y tape el densímetro con su dedo pulgar y gírelo dos o tres veces. Coloque en posición correcta la escala con la parte interna del densímetro hacia la mano. Es aconsejable hacer la lectura a la luz del día, teniendo una ventana a su respaldo. Para la lectura coloque el densímetro con el brazo estirado en posición longitudinal al nivel de los ojos. Luego determine el número de la escala (60, 70, 80, etc.) que todavía puede reconocerse como un número. Si la lectura se hace correctamente, los próximos números marcados más altos se deben reconocer solo como una sombra turbia, considerando que los próximos números de la marca más baja debe ser claramente legibles. Entonces se determina, si el valor de la marca más alta del próximo número está en la escala (65, 75, 85, etc.) todavía es legible o no. Si lo es, entonces este es el valor de lectura que debe tomarse. Si no, tome el número entero (60, 70, 80) más cercano. Posteriormente, el valor de lectura en el densímetro se compara con el valor de dilución utilizado, según el valor marcado por el densímetro en relación al factor de dilución utilizado, el número que resulta como indicador de la densidad del semen se da en millones de células espermáticas por mililitro. La limpieza del espermodensímetro se realiza enjuagando con agua y secando a temperatura ambiente, aunque no es necesario secarlo completamente para empezar una nueva medida.

3.4.6.- Consistencia del semen

La consistencia del semen depende de la relación entre los contenido de sus dos constituyentes, espermatozoides y plasma seminal. Las muestras de semen de alta consistencia contienen más concentración de espermatozoides que las que tienen menor consistencia o son más acuosas. El examen de la consistencia es un método rápido y simple que estima la concentración del semen (Evans y Maxwell, 1990).

El semen de carnero y macho cabrío se puede clasificar en diferentes tipos de consistencia, según se muestra en el (Cuadro 2).

Cuadro 2 Sistema de valoración de las ondas de movimiento masal.		
Valor	Clase	Descripción
5	muy buena	Densa, ondas de movimiento muy rápidas. No se pueden observar células individuales. El 90% o más de los espermatozoides son activos.
4	buena	Movimiento vigoroso, pero las ondas y los remolinos no son rápidos como los de valor 5. Alrededor de 70 a 85% de células son activas.
3	regular	Solo aparecen ondas de movimiento lento. Se puede ver espermatozoides aislados. El 45 a 65% de las células son activas.
2	pobre	No aparecen ondas aunque se observa movimiento de espermatozoides. Solo viven del 20 a 40% de las células espermáticas y su motilidad es pobre.
1	muy pobre	Muy pocos espermatozoides (alrededor del 10%) presentan signos de vida pero con movimientos débiles.
0	muertos	Ningún espermatozoide presenta movimiento.

Fuente: (Evans y Maxwell, 1990).

3.4.7.- Morfología de los espermatozoides

El examen morfológico del semen es una prueba de control de calidad.

Cada eyaculado contiene una serie de espermatozoides anormales, pero si la proporción de estos es muy alta entonces nos encontraremos ante un semen de baja fertilidad (Colas, 1980; Evans y Maxwell, 1990; Smith y Sherman, 1994).

Los espermatozoides anormales se pueden detectar en frotis de semen teñidos, preparados sobre un porta objetos. La preparación, tinción y observación de las muestras son tareas que consumen bastante tiempo por lo que es impracticable en cada eyaculado durante un programa de recolección de semen en campo. Sin embargo, es admisible examinar el semen de los carneros y machos cabríos, antes de comenzar, particularmente si se trata de sementales recién introducidos en el programa o que hayan sufrido algún estrés, que pueda afectar a la calidad del semen (Smith y Sherman, 1994).

a.- Preparación de la tinción eosina/nigrosina con citrato

Para el examen rutinario de la morfología de los espermatozoides se puede utilizar la tinción de eosina-nigrosina, colorante que tiene la siguiente composición:

Cuadro 3	
Reactivos del colorante eosina / nigrosina con citrato de sodio.	
Reactivo	Cantidad (g)
Eosina (soluble en agua)	1,67
Nigrosina (soluble en agua)	10,00
Citrato de sodio. 2H ₂ O	2,90
Agua destilada, c.s.p. (ml)	100,00

Fuente: (Ureña, 2007).

Los componentes del colorante se disuelven en un recipiente idóneo colocado en un baño de agua caliente. Antes de usarlo se debe filtrar. Los pasos para valorar la morfología de los espermatozoides, en una muestra de semen, son los siguientes según Ureña, (2007):

- i.- Colocar en lugares separados, 1 a 2 gotas de colorante y una pequeña gota de semen, sobre el extremo de un porta objetos, templado (30°C). Antes de mezclar se deja que las gotas alcancen la misma temperatura.
- ii.- Se mezcla el semen y el colorante y se extiende sobre el porta objetos, con la ayuda del borde de otro porta objetos que actúa como extensor, de tal manera que se forme una delgada película sobre el porta objetos.
- iii.- Dejar que se seque la muestra y observar al microscopio con aumento de (100x).
- iv.- Examinar por lo menos, 100 espermatozoides de diferentes campos, cuantos más espermatozoides se observen más aumenta la seguridad de la prueba. Anotar el número de espermatozoides normales y el de los distintos tipos de anormales, como se presenta en la Figura 2.

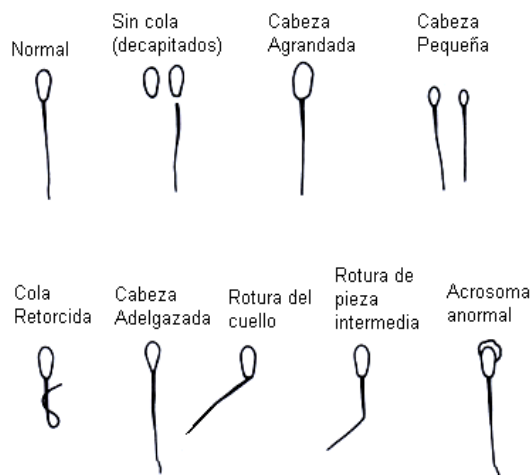


Figura 2. Anormalidades espermáticas.

Fuente: Evans y Maxwell (1990)

La morfología espermática es una de las características más estudiadas en el análisis seminal con el objetivo de eliminar aquellos individuos no aptos para la reproducción. La presencia de altos porcentajes de formas anormales parece estar

asociado con una inmadurez sexual, a procesos degenerativos y patológicos (Smith y Sherman, 1994) e incluso con un excesivo ritmo de recogida.

El porcentaje de morfoanomalías encontradas en el semen parece ser un buen indicador de las lesiones o fisiopatologías del aparato reproductor (Smith y Sherman, 1994; Pomerol y Arrondo, 1994).

El estudio de la morfología espermática ha utilizado tradicionalmente técnicas de tinción, entre las que destaca la eosina-nigrosina (Colas, 1980; Maxwell y Evans, 1990; Smith y Sherman, 1994), cristal violeta (Carbonero, 1954; Cerivaux, 1982; Abraham, 1987) y nitratos de plata (Chinoy et al; 1992). Sin embargo, la fijación en suero salino formulado o en glutaraldehído al 2% en BL-1 (sin tinción previa) y posterior observación en microscopio de contraste de fases, es el método más extendido para la determinación rutinaria de formas anormales en animales domésticos (Memon y Ott, 1981; Volgimayr et al; 1983; Smith y Sherman).

Un eyaculado de macho cabrío se considera normal cuando el porcentaje de formas anormales es inferior al 15% (Abraham, 1987 Maxwell y Evans, 1990). Existen variaciones en la morfología espermática debido al estrés, factor individual, temperatura, estación del año, etc. (Smith y Sherman, 1994).

b.- Prueba de termo resistencia

Los espermatozoides necesitan varias horas tras la eyaculación o tras la inseminación artificial para alcanzar el lugar de fecundación en la hembra. Su capacidad fecundante está en consecuencia, en parte ligada a su aptitud a sobrevivir en el tracto genital de la hembra. Este hecho ha provocado que se realicen pruebas de termo resistencia *in vitro*, para apreciar la supervivencia de los espermatozoides en semen fresco (recién eyaculado) o conservado (refrigerado o descongelado) con respecto a la temperatura ambiental y de incubación a 30 °C . Las condiciones de incubación varían con la especie y con el tipo de semen a probar (fresco o congelado), pero tanto en la especie ovina como caprina, el semen es generalmente diluido a una concentración comprendida entre 1,0 y 1,8 x

10⁸ espermatozoides/pajilla (0,25 – 0,50 ml), y colocado en baño maría a 30 °C. El porcentaje de células vivas y la tasa de mortalidad puede calcularse al comienzo de la prueba y 2 ó 3 horas después o incluso más tarde (Ureña, 2007).

Para la inseminación artificial con semen congelado en la especie caprina, la prueba se realiza sobre una muestra de semen tras su descongelación. Los resultados pueden utilizarse para detectar eyaculados que no hayan soportado bien la congelación. Después de la descongelación, el semen se rediluye en el medio utilizado para la prueba y la incubación se realiza a 30 °C durante 2 horas, de forma tal que se observa la resistencia de los espermatozoides a través del tiempo en esta temperatura o a la ambiental (Ureña, 2007).

3.5.- Dilución del semen

La dilución de los eyaculados tiene como objeto aumentar el volumen y mantener una concentración espermática adecuada para dar servicio al mayor número posible de hembras. El título de dilución depende tanto del volumen de inseminación (varia en función del tipo de inseminación: vaginal, cervical, intrauterina) como de la concentración de espermatozoides móviles que queremos inseminar, ya que independientemente del lugar de la inseminación, el número de espermatozoides móviles está correlacionado con la fertilidad (Maxwell y Evans, 1990; Ritar et al; 1990).

La dilución del semen se realiza por razones técnicas y biológicas.

a.- Razones técnicas

Una de las mayores ventajas del uso de la inseminación artificial es que los sementales de gran valor pueden utilizarse para inseminar muchas más hembras que las que podrían cubrir por monta natural. En la inseminación natural el carnero o el macho cabrío depositan miles de millones de espermatozoides en la vagina de la hembra. Sin embargo, de ese gran número solamente unos 100-140 millones atraviesan el cervix. Cuando se utiliza la inseminación artificial en ovejas y cabras, tanto el volumen de inseminación como el número de espermatozoides que

contiene se reduce sustancialmente al compararlo con la inseminación natural. El límite inferior, generalmente aceptado como resultante de un buen índice de fertilización tras la inseminación artificial cervical, es de 100 millones de espermatozoides por dosis inseminada. De esta forma se puede inseminar un gran número de hembras con un eyaculado (Evans y Maxwell, 1990).

Un volumen adecuado para utilizar tanto en inseminación cervical, como intrauterina es el de 0,05 a 0,20 ml; para inseminación vaginal se debe utilizar un volumen mayor. El disminuir el volumen de inseminado, por debajo de 0,05 ml, no es práctico dada la dificultad de manejar y depositar, cantidades tan pequeñas, en el cervix o útero de la cabra o la oveja. Si se utiliza semen sin diluir, este volumen contendría un número de espermatozoides superior al límite mínimo de seguridad, lo que resultaría en un método más efectivo y menos económico. El problema de reducir el número de espermatozoides a la dosis requerida, manteniendo un volumen adecuado, se soluciona mediante la dilución de semen (Evans y Maxwell, 1990).

b.- Razones biológicas

Los diluyentes apropiados proporcionan a los espermatozoides nutrientes, sistema amortiguador a los cambios de pH y un ambiente isotónico. Además, protegen a los espermatozoides del “choque” térmico cuando se enfrían y se previenen así los daños de la congelación durante el proceso de conservación de semen (Evans y Maxwell, 1990).

La dilución aconsejada en semen caprino varía enormemente entre autores. Algunos investigadores obtienen mejores resultados con títulos de dilución 1: 10 mejor que 1: 1 (Memon y Ott, 1981; Ritar et al; 1990; Sahni y Tiwari, 1992; Ritar y Ball, 1993), existiendo otros trabajos que apuntan a las diluciones superiores a 1:1 como las responsables de un descenso de la fertilidad (Salamon y Ritar, 1982; Park et al; 1989). La bibliografía no parece aconsejar diluciones superiores a 1:5 de los eyaculados destinados a la elaboración de dosis seminales incluidas en programas comerciales de inseminación artificial.

3.5.1.- Diluyentes

Existe una gran variedad de diluyentes y métodos empleados en la conservación del semen de macho cabrío. Sin embargo, todos los medios empleados para este fin, prolongan la viabilidad de la célula espermática por un período limitado de tiempo (refrigeración) o indefinidamente (congelación), rentabilizando en cualquier caso el número de dosis obtenidas por eyaculado.

Los diluyentes empleados en la conservación de células espermáticas deben cumplir una serie de condiciones (Fiser et al; 1981; Abdelhakeam et al; 1991; Pérez Fuentes et al; 1993; Garde et al; 1995):

- a.- Ser isotónico con el plasma seminal (320 mOsm/kg) cuando es utilizado en refrigeración, e hiperosmótico (400 mOsm/kg) en congelación.
- b.- Poseer un pH próximo a 7 y capacidad tampón con el fin de mantener el pH en la neutralidad, compensando la producción de ácido láctico durante la congelación.
- c.- Contener moléculas que protejan a los espermatozoides frente al frío, clasificadas en función de su capacidad de atravesar la membrana plasmática en sustancias crioprotectoras penetrantes y no penetrantes.
- d.- Contener en su constitución una fuente de energía, siendo la glucosa y fructosa las más utilizadas.
- e.- Estar libre de bacterias y contaminación, para lo cual se utiliza antibióticos en su composición.
- f.- Aumentar el volumen substancialmente con el fin de poder realizar múltiples inseminaciones.

El pH óptimo de los diluyentes empleados en la conservación espermática se mantiene en torno a la neutralidad (Vázquez et al; 1986; Dunner, 1991), siendo

necesaria la presencia de soluciones tampones para su mantenimiento. Los tampones deben tener un pH entre 6 y 8 (preferiblemente 7), máxima solubilidad en agua, han de atravesar selectivamente la membrana plasmática, reducir el efecto de la concentración de sales, tener propiedades quelatantes, ser estables y resistir la degradación enzimática (Gram., 1978). Si bien las soluciones tampones más comúnmente empleadas son el citrato, fosfato y bicarbonato sódico, estudios más recientes muestran los compuestos zwitterionicos o amido-orgánicos como el BES, TES, TRIS, HEPES, MES y PIPES tienen mayor capacidad estabilizadora (Gram., 1978; Vázquez et al; 1988; Duner, 1991; Molina et al; 1996).

Los azúcares presentes en los diluyentes ejercen un efecto positivo sobre la viabilidad espermática debido al aporte energético al espermatozoide (Maxwell y Evans, 1990) (son capaces de metabolizar glucosa, fructosa, manosa y arabinosa, esta última por vía oxidativa) y a su acción como crioprotectores (Molina et al; 1990; Dunner, 1990), contribuyendo a mantener el equilibrio osmótico.

Otra particularidad de los medios para la conservación espermática es la presencia de crioprotectores. Dichas moléculas, de características bien definidas en cuanto a tamaño y permeabilidad, protegen las estructuras celulares a las bajas temperaturas, siendo beneficiosa su adición en refrigeraciones a bajas temperaturas (+5°C), y necesaria en congelación. Los crioprotectores pueden clasificarse atendiendo al grado de actividad de paso sobre la membrana plasmática en:

- a.- Crioprotectores no penetrantes. Son aquellos que al ser incorporados en el medio de dilución recubren la membrana plasmática del espermatozoide protegiendo su estructura de la acción del frío. En ninguno atraviesan la membrana espermática debido a su alto peso molecular o especificidad. Destacan por su utilización los azúcares (glucosa, lactosa y fructosa), las proteínas de la leche descremada y yema de huevo (Corteel, 1981; Maxwell y Evans, 1990; Salomón y Maxwell, 1995).
- b.- Crioprotectores penetrantes. Son aquellos capaces de penetrar en la célula

de forma uniforme evitando el estrés osmótico, produciendo deshidratación celular por la sustitución del agua intracelular, amortiguando el incremento de la concentración de solutos del medio extracelular e impidiendo la formación de cristales de hielo en el interior. Destaca por su utilización el glicerol, dimetil-sulfóxido (DMSO), propilen-glicol, etilenglicol, metanol y etanol (Deka y Rao, 1985; Singh et al; 1996; Singh et al; 1995; Salamon y Maxwell, 1995).

La adición de antibióticos a los distintos diluyentes es opcional si bien, se recomienda su utilización como forma de control de la población de gérmenes presentes en el eyaculado. Los antibióticos más utilizados son la penicilina G-sódica y el sulfato dihidro-estreptomicina (Evans y Maxwell, 1990).

3.5.2.- Diluyentes para utilizar semen en fresco

Los medios más comúnmente usados para diluir el semen de carnero y macho cabrío, que se vaya a utilizar se clasifican en sintéticos o naturales según Evans y Maxwell (1990):

a.- Diluyentes sintéticos

i.- Diluyentes para inseminación artificial cervical o vaginal.

Son los diluyentes sintéticos más comúnmente utilizados para diluir semen de carnero, contienen como amortiguadores el tris o el citrato, glucosa o fructosa como fuente de energía y yema de huevo para proteger la membrana del espermatozoide contra el “choque” por frío. Estos diluyentes también se utilizan para el macho cabrío, aunque con menor cantidad de yema de huevo, para evitar que se ponga de manifiesto una reacción enzimática, como consecuencia de que el plasma seminal, de los cabros, contiene una enzima que coagula la yema de huevo. La concentración de la enzima varía entre los diferentes machos cabríos y es más alta cuando se obtiene el semen mediante electroeyaculación.

El problema se puede resolver por la utilización en menor concentración de

yema de huevo, en el diluyente, utilizando un medio que no contenga yema de huevo (por ejemplo leche descremada) o desechando el plasma del semen, por centrifugación, con lo que se eliminará la enzima.

Los diluyentes han de preservar la viabilidad espermática a una temperatura de +15°C a +5°C durante un mínimo de 6 horas. Tiempos mayores de refrigeración implican un beneficio para el inseminador, posibilitando un aumento de tiempo en el rango de trabajo y facilitando el manejo general.

ii.- Diluyentes para utilizar en inseminación artificial intrauterina.

Cuando en los programas de transferencia de embriones, se deban inseminar ovejas y cabras directamente en el útero, con espermatozoides frescos, se recomienda utilizar como diluyente, a fin de aumentar el volumen real de semen fresco, solución salina de fosfato tamponada (PBS) con antibióticos, una forma comercial de este diluyente es el Dubelcco PBS®, a la que se recomienda adicionar 1.000 UI de penicilina G sódica y 1 mg de sulfato de estreptomicina por ml de solución.

b.- Diluyentes naturales

i.- Leche de vaca descremada

En condiciones de campo el diluyente de semen más fácilmente accesible es la leche de vaca, que se puede utilizar tanto entera, como descremada o en polvo para reconstituir. En algunos lugares también se utiliza leche UHT (ultra-high temperature), que tiene la propiedad de conservarse mejor. Este producto no precisa esterilización y, a diferencia de otras formas de leche, se puede utilizar directamente como diluyente, solo se precisa abrir cada día un nuevo envase de leche UHT.

Debido a las características seminales del macho cabrío anteriormente citadas, la utilización de leche de vaca es un diluyente ampliamente utilizado. El diluyente a base de leche descremada reconstituida más utilizado en la

refrigeración de semen caprino es el de Corteel (1981), con buenas propiedades conservantes a una temperatura de + 15°C, aunque se muestre ineficaz a + 5 °C (Guerin, 1990), siendo de complicada elaboración y conservación.

ii.- Yema de huevo

La otra gran alternativa a la leche de vaca como crioprotector externo la constituye la yema de huevo de gallina. Los huevos han de ser frescos, no transcurriendo más de 4 días desde la puesta hasta el momento de su utilización. En el caso de no disponer de huevos frescos se puede utilizar yema de huevo desecada para la realización de los diluyentes (Montero et al; 1995).

La concentración de yema de huevo utilizada en la conservación de semen caprino es menor que en otras especies (ovinas y porcinas) debido a las propiedades antes indicadas de la fosfolipasa A, que en presencia de calcio es capaz de hidrolizar las lecitinas de la yema de huevo en lisolecitinas y ácidos grasos libres. La cantidad de yema de huevo utilizada varía según los autores (Cuadro 4), siendo las concentraciones mayores utilizadas tras la eliminación del plasma seminal.

Cuadro 4. Concentración de yema de huevo utilizada por distintos autores para la refrigeración de semen caprino.		
Diluyente	Yema de huevo (%)	Referencia
Tris/Glucosa	1,5 - 1,2	Ritar y Salamon, 1982
Tris/Cítrico/Glucosa	1,5 - 2,2	Ritar et al, 1990
Tris/Fructosa	10	Azawi et al, 1993
Tris/Cítrico/Fructosa	5	Stojanov et al, 1994
Tris	2,5 - 1,8	Roca et al, 1994

Fuente: Cortéz (1998)

La incorporación de yema de huevo se realiza sobre el volumen final del diluyente base, homogenizándose adecuadamente. Para la eliminación de las partículas groseras se procede a la centrifugación del diluyente a 500 rpm durante 35 minutos.

iii.- Agua de coco

La utilización de agua de coco como diluyente se presenta como un método alternativo en la conservación del semen caprino. Dentro de las alternativas de los diluyentes pobres en fosfolípidos, se ha demostrado que el agua de coco favorece la conservación del semen caprino. La movilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos en semen caprino refrigerado a 4 °C con agua de coco son significativamente superiores a los obtenidos con leche (Nunes, 1993).

3.5.3.- Diluyentes para utilizar semen congelado

La posibilidad de almacenar dosis seminales por un período indefinido de tiempo para su posterior utilización, es una de las mayores ventajas que presenta la congelación dentro de los programas de inseminación artificial (Nunes, 1993)

Las causas de mayor mortalidad espermática durante la congelación se deben al aumento de la concentración de sales, formación de cristales de hielo en el interior del espermatozoide, cambios en el pH, desnaturalización de proteínas y rotura mecánica de elementos estructurales durante el proceso del cambio de estado. La protección de los espermatozoides durante el descenso de temperatura se consigue mediante la incorporación de crioprotectores al diluyente base, tal y como se indicó en el apartado de diluyentes (Deka y Rao, 1985; Singh et al; 1995; Salamon y Maxwell, 1995).

El glicerol es el crioprotector penetrante más ampliamente utilizado debido principalmente a su capacidad “tampón” con las sales, minimizando el daño electrolítico y la formación de cristales de hielo (Deka y Rao, 1985; Salamon y Maxwell, 1995).

La adición del glicerol en función de la concentración espermática muestra los mejores resultados post-descongelación (Salamon y Ritar, 1982). Si bien existen otros crioprotectores utilizados en la congelación espermática como el DMSO o etilen-glicol, pero es el glicerol el que manifiesta resultados post-

descongelación superiores (Deka y Rao, 1985; et al; 1996; Singh et al; 1995; Salamon y Maxwell, 1995).

La concentración de glicerol empleada en la preparación de los diluyentes varía según los autores, manteniéndose entre el 3 y 11% (Cuadro 5). Dicha variabilidad depende principalmente del diluyente base empleado y su sistema de dilución, así como de la temperatura a la cual se añade dicho diluyente glicerado (Tuli y Holz, 1994).

Cuadro 5. Porcentaje de glicerol utilizado por diversos autores en los diluyentes de congelación de semen caprino.			
Glicerol, %	Diluyentes	Referencias	
3 - 11	Cítrico/glucosa*	Chauhan et al; 1994	
4	Tris/glucosa*	Perez y Mateos, 1994	
4	Tris/cítrico/glucosa*	Ritar y Ball, 1993	
4	BesKOH*	Duner, 1991	
4	Leche descremada	Sinha et al; 1992	
6	Tris/cítrico/glucosa*	Ritar et al; 1990	
6	Tris/cítrico/glucosa*	Ritar y Salamon; 1982	
7	Tris/glucosa*	Watson, 1975	
8	Tris/cítrico/fructosa*	Berger, 1989	
8	Tris/glucosa*	Sing et al; 1995	

* diluyentes con yema de huevo

Fuente: Cortés (1998)

En general, los mejores resultados post-descongelación se obtienen tras la utilización de concentraciones intermedias de glicerol (4 y 6%) (Deka y Rao, 1996; Sinha et al; 1992; Tuli y Holz, 1994). Las concentraciones de glicerol utilizadas en semen ovino también oscilan en este rango, si bien en ovino se puede llegar a anular su adición tras un aumento del porcentaje de la yema de huevo hasta el 30% (Abdelhakeam et al; 1991; G Artiga et al; 1993).

La adición del glicerol se puede realizar en una o varias etapas (Corteel, 1975; Deka y Rao, 1985; Salamon y Maxwell, 1982; Tuli y Holtz, 1994; Salamon y Maxwell, 1995), y a una temperatura de 37 °C, 22 °C o 5 °C. El efecto tóxico del

glicerol es menor si se añade a 5 °C; sin embargo, la velocidad de penetración también es menor, por lo que se habrá de aumentar el tiempo de equilibrio (Corteel, 1975). La adición del glicerol a temperatura ambiente permite una penetración más rápida del agente, sin bien ejerce una acción más tóxica sobre los espermatozoides al estar más tiempo en contacto con los mismos (Salamon y Ritar, 1982; Salamon y Maxwell, 1995).

La mayoría de los medios utilizados para la crío conservación espermática son hipertónicos con respecto al plasma seminal (Fiser et al; 1981). El aumento de la presión osmótica de los medios facilita la salida de agua del plasma seminal al medio extracelular con el fin de equilibrar las concentraciones a ambos lados de la membrana plasmática, produciendo un mayor grado de deshidratación en el espermatozoide y por consiguiente reduciendo la formación de hielo en su interior, obteniendo unos resultados mejores tras la descongelación (Fiser et al; 1981).

3.5.4.- Método de dilución

La dilución del semen se debe hacer tan pronto como se pueda una vez recolectado y analizado de forma rutinaria. Tanto el semen como el diluyente se colocan en baño de agua a 30 °C para que en el momento de la dilución tengan la misma temperatura. El diluyente se debe colocar en el baño de agua antes que el semen. La adición del diluyente frío al semen puede ocasionar el “choque” por el frío con la consiguiente reducción de la fertilidad. Para la dilución se debe utilizar una bureta calibrada estéril y seca. La dilución se realiza lentamente, adicionando gota a gota y agitando el recipiente que contiene el semen, la cantidad adecuada depende del grado de dilución. Siempre se debe adicionar el diluyente al semen, nunca al contrario, ya que pueden alterar los espermatozoides con lo que se reduciría su motilidad. Después de adicionar el diluyente se agita todo convenientemente y se examina al microscopio para comprobar la motilidad de los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1990).

3.5.5.- Grado de dilución

Antes de proceder a la dilución del semen de carnero o macho cabrío se debe determinar la concentración de espermatozoides y el volumen de diluyente requerido para la inseminación. Estos factores pueden variar según requerimientos específicos (Evans y Maxwell, 1990).

3.5.6.- Volumen de inseminado

El volumen de inseminado (dosis) puede variar ligeramente dentro de ciertos límites. El límite viene determinado por el volumen mínimo que se puede manejar convenientemente y con cierta seguridad. El límite superior está determinado por la capacidad del órgano o lugar de la inseminación para retener el semen (Evans y Maxwell, 1990). Los volúmenes recomendados para inseminación se muestran en el (Cuadro 6).

Cuadro 6. Volumen de semen recomendado para inseminación artificial.	
Lugar de inseminación	ml /pajilla
Vagina	0,30 - 0,50
Cervical	0,05 - 0,20
Intrauterina	0,05 - 0,10

Fuente: Evans y Maxwell (1990)

Estos volúmenes deben contener un número mínimo de espermatozoides móviles.

3.5.7.- Número de espermatozoides en el inseminado

En la inseminación no quirúrgica de la oveja y la cabra se precisa más concentración espermatozoides que para la inseminación de vacas, debido a la diferencia de las estructuras anatómicas de su respectivo cérvix (Nunes, 1993).

Como norma general, se necesita menos espermatozoides en la inseminación uterina que para la cervical y menos para ésta que para la vaginal. Independientemente del lugar de la inseminación, el número de espermatozoides móviles afecta a la fertilidad. El límite mínimo de seguridad en cuanto al número de espermatozoides móviles por volumen de inseminado se puede encontrar en el (Cuadro 7) (Evans y Maxwell, 1990).

La dilución depende de la concentración de espermatozoides activos en la muestra y el número de dosis que obtengan por cada extracción, dependerá del volumen del eyaculado y de la concentración de espermatozoides activos. Las muestras de semen de buena concentración y motilidad (puntuación 4-5) se diluye, normalmente, 1 parte de semen y 1 parte de diluyente (dilución dos veces) (1+1), 1+2 (dilución 3 veces), o 1+3 (dilución 4 veces), para utilizarlas en inseminación cervical. No se debe diluir el semen de carnero o macho cabrío más de 1+4 (dilución 5 veces) en los programas de inseminación artificial comercial. Las muestras con baja motilidad o concentración requerirán diluciones más bajas, pero no se recomienda utilizarlas (Evans y Maxwell, 1990).

Cuadro 7. Número mínimo en millones de espermatozoides móviles en cada pajilla para practicar la inseminación según el lugar de depósito del semen en la cabra.				
		Semen conservado		Semen congelado
Lugar de inseminación	Semen fresco			
Vaginal	300	No efectivo		No efectivo
Cervical	100	150		180
Intrauterina	60	60		60
Laparoscópica	20	20		20

Fuente: Evans y Maxwell (1990)

En algunos casos se han obtenido buenos resultados de fertilidad con cantidades de espermatozoides inferiores. Sin embargo, en la mayoría de las circunstancias los aquí indicados proporcionan buenos índices de fertilidad y un buen uso económico del semen. Si se dispone de mucho semen se puede incrementar el número de espermatozoides por pajilla, sin que por ello aparezcan efectos secundarios. Si se van a inseminar hembras súper ovuladas (por ejemplo,

en un programa de transferencia de embriones) el lugar de inseminación debe ser el útero y el número de espermatozoides se incrementara al menos hasta 100 millones por pajilla (Evans y Maxwell, 1990; Pérez, 1992).

3.5.8.- Pasos a seguir para la dilución del semen

Según Evans y Maxwell (1990):

- a.- Prepara un baño de agua a 30 °C en un recipiente apropiado y que contenga una gradilla donde poder colocar los tubos de recolección del semen.
- b.- Controlar la temperatura del agua mediante termostato o utilizar un aparato que controle la temperatura automáticamente.
- c.- Colocar un recipiente que contenga el diluyente en el baño de agua.
- d.- Después de recogido el semen, etiquetar el tubo que lo contenga, notar el volumen, la concentración y colocarlo en el baño cubriéndolo con un vidrio de reloj. El nivel de agua estará siempre por debajo del nivel del semen en el tubo.
- e.- Determinar la motilidad de semen sin diluir en el microscopio.
- f.- Determinar el grado de dilución teniendo en cuenta el volumen, la concentración y el número de hembras que se desean inseminar con el eyaculado. En el (Cuadro 8), se incluyen ejemplos de diferentes relaciones de dilución en muestras de semen con distinto grado de concentración y motilidad.
- g.- Lavar la bureta con un poco de diluyente, que se descarta (lavado volumétrico).
- h.- Llenar la bureta con el volumen requerido de diluyente y verterlo con sumo

cuidado, y lentamente, sobre el semen. Agitarlo bien durante el agregado.

i.- Reexaminar la muestra diluida al microscopio para comprobar la motilidad.

Cuadro 8. Relaciones de dilución recomendadas según el grado de concentración y motilidad de los espermatozoides en la preparación de semen diluido fresco.

Grado de concentración	Grado de motilidad	Relación de dilución	Inseminación cervical		Inseminación vaginal	
			Número de espermios móviles (1)	Número de dosis (2)	Número de espermios móviles (1)	Número de dosis (2)
3	4	1+0,5	110 - 130	15	330 - 390	5
3	5	1+1	115 - 135	20	345 - 405	6
4	4	1+2	120 - 140	20	360 - 420	6
4	5	1+2	128 - 135	30	385 - 405	10
5	4	1+3	120 - 140	30	460 - 420	10
5	5	1+3	120 - 135	40	360 - 405	13

(1) Millones de espermatozoides móviles por pajilla. (2) Número de pajillas por ml de semen diluido.

Fuente: Evans y Maxwell (1990)

j.- Mantener cubierto el semen diluido en el baño de agua a 30°C y utilizarlo lo más rápidamente posible, después de diluido.

3.6.- Conservación del semen durante corto tiempo

El fundamento de conservar el semen es prolongar la capacidad de fertilización de los espermatozoides, al reducir o detener su movilidad y reacciones metabólicas. La conservación en estado líquido (por poco tiempo) depende de la reducción reversible de la motilidad y actividad metabólica de los espermatozoides a temperatura reducida (5°C a 15°C) o en dióxido de carbono. En ambas situaciones la vida de los espermatozoides se puede prolongar durante varios días. Sin embargo, el período en que se mantiene la capacidad fertilizante de las células espermáticas es mucho más que su viabilidad (Evans y Maxwell, 1990; Ritar et al; 1990).

Este método consiste en enfriar el semen diluido desde 30°C (temperatura de dilución) a 15°C o, más frecuentemente a 5°C, manteniéndolo en esta temperatura hasta el momento de utilizarlo. El diluyente puede ser yema de

huevo-tris-fructosa, yema de huevo-glucosa-citrato o leche de vaca (leche entera pasteurizada, leche en polvo reconstituida o leche UHT). Estos diluyentes le dan protección al espermatozoide contra el posible “choque” por frío, durante el enfriamiento. Para evitar el crecimiento microbiano se deben adicionar 1.000 UI de penicilina sódica y 1 mg de sulfato de estreptomicina, por cada mililitro de diluyente (Evans y Maxwell, 1990; Ritar et al; 1990).

Cuando se conserve semen de macho cabrío siguiendo el proceder descrito es preferible utilizar leche diluida con glucosa al 0,9 %, con el fin de evitar cualquier posible reacción de coagulación de la yema de huevo durante la conservación. La viabilidad de los espermatozoides puede mejorarse separando, por centrifugación, el plasma seminal, aunque, a veces este proceder no se puede llevar a cabo (Evans y Maxwell, 1990; Ritar et al; 1990).

Para enfriar el semen se emplea viales de vidrio o plástico, que estén limpios y estériles, mantenidos en baño de agua a 30 °C (temperatura a la que se hace la dilución) o se coloca el semen, en pajuelas de plástico de 0,25 ml o de 0,5 ml. Si se utilizan viales se debe procurar eliminar el aire lo mejor posible a fin de prolongar la viabilidad de los espermatozoides; esto se puede realizar utilizando viales de tamaño apropiado (5-8 ml) llenándolos de semen, de tal forma, que cuando se coloque la tapa no quede ningún espacio de aire. Las pajillas o viales se debe etiquetar antes de llenarlas. El llenado se puede hacer mediante vacío por un extremo de la pajilla, que se cierra automáticamente en cuanto contacta con el semen. El otro extremo se cierra ultrasónicamente, por calor, con un balín de vidrio a presión o agregando alcohol polivinílico parcialmente hidrolizado (PVA) (Evans y Maxwell, 1990; Ritar et al; 1990).

El método más simple y más práctico para cerrar las pajillas es introduciendo su extremo abierto en alcohol polivinílico parcialmente hidrolizado (PVA) en polvo (colocado sobre una bandeja) y luego sumergir el extremo sellado en agua estéril a 30 °C para que gelifique. En el comercio existen aparatos para el llenado y sellado automático de pajillas para realizar estas operaciones a gran

escala (Evans y Maxwell, 1990; Ritar et al; 1990).

El enfriamiento del semen se puede hacer en refrigeradora regulada a 5 °C., en termos o cualquier recipiente aislado que contenga hielo (o agua fría). Si se utiliza un refrigerador, los viales o pajillas deben colocarse primeramente en un vaso o recipiente adecuado que contenga agua a 30°C y luego se lleva al refrigerador. El ritmo de enfriamiento debe regularse tomando en cuenta el tamaño del recipiente y la cantidad de agua que rodea los contenedores del semen. Si se utiliza otro medio de conservación, los viales o pajillas que contienen el semen diluido, deben envolverse cuidadosamente en algodón (o papel) y colocarse en bolsas de plástico resistentes al agua, para evitar su contacto directo con el hielo (o agua fría) y en definitiva, previniendo el “choque” por frío de los espermatozoides. La utilización de agua helada en frascos de plástico es un método más seguro que la aplicación del hielo (Evans y Maxwell, 1990; Ritar et al; 1990).

El enfriamiento del semen a 15 o 5 °C se hace de 1 a 1,5 h y de 2 a 3 h, respectivamente, debiendo ser gradual el descenso de temperatura. Se debe poner especial atención para evitar un descenso rápido desde 18 a 5°C ya que en este margen de temperatura los espermatozoides son especialmente sensibles al “choque” por frío. Cuando se conserve a 5°C también es importante que el semen se mantenga precisamente a esa temperatura, durante todo el tiempo que dure su almacenaje. A temperaturas superiores a 5 °C la motilidad y metabolismo de los espermatozoides no están suficientemente inhibidos; las temperaturas por debajo de 0 °C son fatales para los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1990; Salamon et al; 1995).

Cuando se usa semen fresco la inseminación debe hacerse inmediatamente después de la colección. Según la concentración de espermatozoide y del cuidado que se tenga al inseminar, se utilizan dosis de 0,1 y 0,2 ml de semen. Debido a que la viabilidad del semen fresco es corta, el macho y las hembras a inseminar tienen que estar ubicados en el mismo plantel (Vélez,

1993).

La dilución y enfriamiento del semen a 5 °C permite una mayor elasticidad, el semen de caprinos se puede conservar hasta unas 12 horas y el ovino, unas 24 horas. El semen de caprinos se diluye de modo que contenga unos 100 millones de espermatozoides vivos por dosis, y en el caso de los ovinos unos 350 millones. En ambos casos se utiliza una cantidad que varía entre 0,1 y 0,2 ml (Vélez, 1993).

La viabilidad de los espermatozoides es más corta a 15°C que a 5°C, pero lo suficientemente prolongada para permitir el transporte del semen (Evans y Maxwell, 1990; Salamon et al; 1995).

Para inseminar se utiliza un volumen de 0,1-0,2 ml, cuando se conserva en viales, o bien toda la pajilla en la pistola de inseminación. No es necesario calentar el semen ya que esto sucederá tan pronto se le introduzca en el sistema genital de la hembra (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

El periodo máximo de conservación, para obtener un grado aceptable de fertilidad por inseminación cervical es de 24 h para los ovinos y 48 h para caprinos (considerando que en ésta especie se puede hacer una inseminación más profunda). Tanto el semen de carnero como el de macho cabrío deben utilizarse dentro de las 6-12 h siguientes a su conservación a 15°C (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

La principal causa de disminución de la fertilidad del semen conservado parece residir en que se altera la capacidad de transporte de los espermatozoides, desde el cervix al lugar de la fertilización (oviducto) (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

3.7.- Conservación del semen durante largo tiempo

Cuando el semen se congela y conserva a muy baja temperatura, en nitrógeno líquido a -196 °C, las reacciones metabólicas de los espermatozoides quedan detenidas. Esto hace que el semen se pueda conservar durante mucho

tiempo con lo que se puede conservar genes para futuro y se asegura la disponibilidad de un semental en particular. También de esta forma se facilita el transporte de semen, tanto nacional como internacionalmente, y el semen se puede recoger y conservar en épocas distintas a la estación reproductora. En consecuencia, la utilización de los sementales se amplía considerablemente al congelar y conservar el semen (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

3.8.- Conservación del semen congelado

La utilización de dosis seminales congeladas y su posterior aplicación en inseminación artificial es un requisito obligatorio dentro de programas de selección de una raza. La difusión de material genético mejora sin límite geográfico (debido a su fácil transporte) ni de tiempo, hacen que esta técnica sea imprescindible (Mazur, 1990; Watson y Duncan, 1988).

Para congelar el semen se deben utilizar diluyentes que provean nutrientes a los espermatozoides, neutralicen el efecto de sustancias tóxicas producidas por su metabolismo, los protejan del efecto de la congelación y mantengan su balance osmótico (Vélez, 1993).

Los resultados de fertilidad obtenidos con semen congelado son inferiores a los encontrados en semen refrigerado, existiendo grandes variaciones dependiendo de la composición del diluyente, calidad inicial del semen y su tratamiento, lugar de deposición de la dosis, momento de la inseminación, número de inseminaciones, tipo de sincronización, estación del año y raza (Corteel, 1975; Moore et al; 1989; Chauhan y Anand, 1990; Ritar y Ball, 1993; Sinha et al, 1995).

El semen congelado se guarda generalmente en pajillas de plástico de 0,25 y 0,50 ml. En el caprino el semen se diluye de modo que cada pajilla contenga un mínimo de 20 millones de espermatozoides vivos, mientras que en el ovino se llega a 350 millones.

La utilización de dosis descongeladas de semen caprino en programas de

inseminación artificial viene desarrollándose desde hace muchos años de manera experimental con mayor o menor éxito (Cuadro 9) siendo las referencias encontradas de su aplicación industrial escasas fuera de nuestras fronteras y prácticamente nulas en nuestro país (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Cuadro 9. Fertilidades obtenidas con semen caprino refrigerado y congelado.		
Fertilidad %	Técnica	Referencias
40,5	Semen descongelado	Corteel, 1975
55	Semen descongelado	Singh et al; 1995
56,8	Semen descongelado	Ritar y Ball, 1993
58,8	Semen descongelado	Singh et al; 1995
68	Semen refrigerado	Nunes, 1993
81	Semen descongelado	Chauhan, 1990

Fuente: Cortés (1998)

La congelación de las dosis seminales se puede realizar en vapores de nitrógeno líquido (NL), sobre nieve carbónica o mediante biocongelantes (con rampas de velocidad programadas). Las formas más utilizadas en la congelación del semen son las pajillas de 0,25 ml y 0,50 ml, crió tubos de 1,0 ml, píldoras de 0,1 ml y ampollas de cristal de 1,5 ml, existiendo discrepancias entre autores sobre el envase de mayor efectividad (Maxwell et al; 1980; Pontbriand et al; 1989; Ritar et al; 1990; Vázquez et al; 1991; Sahni y Tiwari, 1992).

El descenso de temperatura de 30 °C hasta 5 °C ha de realizarse lentamente, ya que la bajada rápida de temperatura o “cold shock” produce daños celulares irreparables debido principalmente, a cambios en la viscosidad de los fluidos, en la solubilidad de los gases, así como metabólicos y químicos (Darin-Bennet y White, 1977; Robertson y Watson, 1986; Robertson et al; 1990). Este periodo de enfriamiento tiene una duración aproximada de 1 a 2 horas, a razón de (-0,1 °C/min a -0,5 °C/min) dependiendo de la técnica de congelación que se

utilice (Memon y Ott, 1981). Sin embargo, una bajada demasiado lenta de temperatura prolongaría una alta actividad metabólica, lo que conlleva a una muerte celular prematura.

No se ha establecido de manera uniforme el tiempo óptimo de equilibrio, período comprendido desde que se añade el glicerol hasta que el semen es congelado (Gram, 1978), aunque depende en gran medida de la composición del diluyente y técnicas utilizadas (Deka y Rao, 1986; Sahni y Tiwari, 1992; Sinha et al; 1992; Pérez y Mateos, 1994; Salamon y Maxwell, 1995).

Cuando las soluciones se enfrían gradualmente por debajo del punto de congelación, se produce un súper enfriamiento de la célula y del medio exterior a temperaturas de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Watson, 1990). Entre $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ se produce el punto crioscópico de fusión, aumentando la concentración de solutos en el medio. El interior de la célula sigue súper enfriado debido al bloqueo del crecimiento de los cristales de hielo por la membrana plasmática, produciéndose un desequilibrio osmótico entre los medios intracelular y extracelular (Mazur, 1980) y un flujo neto de agua hacia el exterior de la célula en respuesta al equilibrio.

La temperatura crítica de congelación oscila entre los $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, dado que entre dichas temperaturas se produce la formación de cristales de hielo y el efecto solución (incremento de la concentración de solutos, cambio en el pH, precipitación de solutos, aumento de la deshidratación y descenso del volumen del fluido) (Mazur, 1990; Watson y Duncan, 1988).

3.8.1. Utilización de semen congelado en cabras

La fertilidad con semen congelado es más alta en la cabra que en la oveja. Esto es debido, fundamentalmente, a diferencias estructurales durante el estro en estas especies. En un número elevado de cabras el semen se puede depositar dentro del canal cervical o dentro del útero a través del cervix. Por tanto, la fertilidad media en los rebaños de cabras no solo depende de la calidad del semen descongelado, sino también de la proporción de hembras en las que se pueda

realizar la inseminación cervical profunda (hasta 3 cm) o intrauterina (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

La congelación del semen en ganado caprino presenta, además de los problemas comunes a la congelación del semen de otras especies, la formación de cristales de hielo intra y extracelulares y aumento de la concentración de solutos, ciertas características o particularidades específicas en la composición de su plasma seminal (Ureña, 2007).

Por otra parte, en los últimos años, se ha puesto de manifiesto la existencia de una fracción proteica del plasma seminal conocida como BU-III, procedente de las glándulas bulbouretrales, que interacciona con la leche utilizada en los diluyentes produciendo inhibición de la motilidad espermática e induciendo la reacción acrosómica (Stajanov et al; 1994).

Para contrarrestar los efectos perjudiciales que estas sustancias ejercen sobre los espermatozoides, se recomienda separar y posteriormente eliminar el plasma seminal mediante la centrifugación del semen mezclado con un líquido de “lavado”. Otros autores optan por utilizar diluyentes con bajos porcentajes de yema de huevo, o utilizando altas diluciones del semen a fin de minimizar el posible efecto perjudicial del plasma seminal (Ureña, 2007).

Previamente a la dilución del semen se realiza el “lavado” del mismo mezclándolo con una solución salina y someténdolo a 1 ó 2 centrifugaciones a 900 rpm durante un período de 10 minutos, tras la centrifugación procedemos a eliminar el sobrenadante con lo que eliminamos el plasma seminal y con él los efectos perjudiciales para la viabilidad del semen. Junto con el plasma se eliminan también una pequeña cantidad de espermatozoides, aproximadamente un 10%, hecho que hemos de tener en cuenta al determinar el número de dosis seminales que vamos a obtener del eyaculado (Ureña, 2007).

Una vez eliminado el plasma seminal procederemos a la dilución del semen. Se pueden utilizar los mismos diluyentes que se utilizan para el semen fresco (leche de vaca descremada y yema de huevo), con las mismas precauciones que conciernen al plasma seminal. De todos modos, en el caso del

semen de macho cabrío, puede ser beneficioso utilizar las características de crió protección de la yema de huevo (Ureña, 2007).

Una vez que se ha realizado el lavado del semen y después de haber calculado el volumen total de diluyente a añadir, se debe proceder como dicta Ureña (2007):

- a.- Añadir el volumen correcto de diluyente sin glicerol (con la misma composición que con el semen fresco), mantenido a temperatura ambiente, teniendo en cuenta el hecho de que se debe realizar una segunda dilución con diluyente al que se le ha añadido glicerol.

- b.- Los diluyentes utilizados pueden ser, una sustancia orgánica que actúe como crioprotector externo y que proteja a las células contra el “shock” por frío, que se produce al enfriar el semen desde los 20 a los 5°C, como yema de huevo o leche descremada. Además se debe añadir una fuente de energía como la glucosa o fructosa y un componente tampón como el citrato sódico, TES, TRIS.

- c.- Colocar el tubo de colecta en un vaso de agua en el frigorífico. Tras 30 minutos, colocarlo en un baño helado para hacer descender la temperatura a 5°C. Una vez que se ha alcanzado esta temperatura, se debe colocar el tubo de colecta directamente en el refrigerador (sin el vaso con agua). La refrigeración del semen ha de ser muy lenta, bajando la temperatura 1°C cada 5-8 minutos y una vez que se han alcanzado los 4 – 5 °C, se espera un tiempo de “equilibración” de 1 a 5 horas a fin de que las células se acostumbren al frío y se acomoden los fosfolípidos de la membrana plasmática.

- d.- Añadir el diluyente glicerado (14% de glicerol). El volumen de diluyente (que es idéntico al que se ha utilizado para añadir tras el lavado del semen), debe dividirse en tres fracciones sucesivas añadidas cada 10 minutos.

- e.- Acondicionar el semen en pajuelas (100-200 millones por pajuela o 10-20 millones si se van a utilizar para inseminación por vía laparoscopia).
- f.- La congelación se puede realizar utilizando un aparato (crió congelador) que permite programar la temperatura final y la velocidad de caída de ésta.

La apreciación de la capacidad de los espermatozoides para soportar la congelación/descongelación se realiza colocando la pajuela en un baño maría (dentro de un vaso con agua) de 37 a 38 °C durante 30 segundos de forma que el contenido es seguido por la incubación y observación microscópica. No se recomienda utilizar eyaculados con menos del 30% de espermatozoides móviles y deben tener un índice de movilidad de al menos un valor de 3 o más. Esta observación se debe realizar 5 minutos después de la descongelación (Deka Rao, 1985 b; Chauhan et al; 1994, Correa et al; 1996 b).

Con estos componentes pueden realizarse distintas combinaciones que han dado como resultado el desarrollo de distintos tipos de diluyentes para la congelación del semen del ganado caprino como: Glucosa-leche descremada-glicerol, TRIS-glucosa-yema de huevo-glicerol, TRIS-fructosa-yema de huevo-glicerol y Glucosa-yema de huevo-leche-glicerol (Salamon y Maxwell, 1995).

3.8.2. Métodos de procesar y congelar el semen

El semen de carnero y macho cabrío se puede congelar lentamente (método convencional) o muy rápido, bien en vapores de nitrógeno líquido (-196 °C) o en bloques de hielo seco (dióxido de carbono sólido a – 79 °C). Cuando se utilizan los dos primeros métodos el semen generalmente se congela en pajillas de plástico (Ureña, 2007).

El semen de carnero y macho cabrío se suele congelar por el método de los bloques o “pelets”, que tiene la ventaja de ser muy simple, fácil de manejar los bloques congelados y buena recuperación de las características de los espermatozoides después de congelar. Sin embargo, los bloques son más

difíciles de identificar que las pajillas, que pueden ser de coloración variable y además llevar estampado un código de identificación; no obstante, este problema puede superarse usando determinados colorantes para colorear el diluyente del semen y/o colocando los bloques en bolsas, u otro recipiente adecuado, de plástico de diferente color y etiquetados. Otro inconveniente de los bloques es que el semen al estar en el bloque sin protección puede contaminarse fácilmente, durante la congelación y conservación. Esto se puede evitar mediante un cuidadoso manejo y empackado de los bloques (Nunes, 1993).

Cualquiera que sea el método que se utilice para la congelación, el semen deberá diluirse con un diluyente que lleve un agente crioprotector. Para este fin se han utilizado varias sustancias pero ninguna ofrece mejor protección que el glicerol. La dilución del semen se puede hacer en uno o dos pasos; cuando se adopte este último sistema, el semen se diluye a (30 °C), inmediatamente después de recogido, hasta la mitad de la dilución final con un diluyente que no contenga glicerol y, después de enfriado, durante 1,5 a 2 h, a 5 °C, se hace la dilución definitiva con diluyente provisto de glicerol. Este método es similar al utilizado para diluir el semen de toro. Para hacer la dilución en un solo paso, el semen se diluye a la dilución final de pre-congelación a 30 °C con diluyente que contenga glicerol y luego se enfría a 5 °C durante 1,5 a -2 h en refrigerador doméstico o cámara fría. Para el semen de carnero y macho cabrío el método de dos pasos no ofrece ventajas sobre el de un solo paso; por ello, se prefiere este por su simplicidad y menor manejo del semen antes de la congelación (Evans y Maxwell, 1990).

Es importante realizar el congelamiento en un ambiente a baja temperatura y homogenizar bien el semen durante esta operación, a fin de obtener dosis de similar calidad seminal. Se tendrá especial cuidado en la identificación de las partidas de semen (Gibbons y Cueto, 2000).

Para el congelamiento del semen en pajillas se debe tener en cuenta, el alcohol polivinílico y una jeringa con aguja de 1,5 cm o pipeta calibrada de 0,5 ml o 0,25 ml, las pajillas se colocan en la heladera previo al congelamiento. Las pajillas se cargan pipeteando las dosis seminales a través del extremo abierto hasta que

el semen diluido toca el tapón triple (algodón-alcohol polivinílico-algodón), con cuidado se las toma del extremo con tapón (para no transmitir el calor de la mano al semen). El alcohol polivinílico del tapón triple gelifica y sella en contacto con el líquido. Se secan con papel absorbente, se crea una cámara de aire de 1,5 cm en el extremo sin tapón y se sella dicho extremo con golpes suaves y perpendiculares sobre una placa que contenga alcohol polivinílico. Inmediatamente se sumergen las pajillas en un recipiente con agua a 30 °C para permitir que el extremo sellado gelifique (Gibbons y Cueto, 2000).

3.9.- Control del semen después de descongelado

La temperatura y tiempo de descongelación varía dependiendo del tipo de envase elegido (Salamon y Maxwell, 1995), no existiendo uniformidad de criterios entre los diferentes autores para un mismo envase, si bien se ha demostrado que las descongelaciones a altas temperaturas durante escasos segundos muestran mejores resultados (Fiser et al; 1981; Pontbriand et al; 1989; Ritar et al; 1990; Tuli et al; 1991; Salamon y Maxwell, 1995; Correa et al; 1996).

La viabilidad de las dosis descongeladas va ser una sumatoria de los procesos de dilución, refrigeración, glicerolización, congelamiento y descongelación, cuyo resultado final es una pérdida de movilidad, vitalidad, morfoanomalías, acrosomas, permeabilidad de membrana y por consiguiente de la fertilidad (Deka y Rao, 1985; Chauhan et al; 1994, Correa et al; 1996).

La descongelación del semen es un punto muy crítico. Aparte de los daños por la conservación, los espermatozoides también se pueden lesionar si el proceso de descongelación no se lleva a cabo de una forma apropiada. Como norma general cuanto más rápidamente se congele el semen más rápidamente se debe descongelar, a fin de obtener una más rápida recuperación de los espermatozoides. El semen de carnero o macho cabrío congelado, por cualquiera de los métodos de los “pelets” o pajillas, se debe descongelar a una temperatura no inferior a 37 °C. La descongelación a temperaturas superiores a 37 °C puede mejorar la recuperación de los espermatozoides viables, pero existe el peligro de

la explosión del semen a temperaturas por encima del nivel crítico, que pueden ser fatales para las propias células. Por tanto, lo más seguro es hacer la descongelación del semen a temperaturas no superiores a 37 °C. Se han diseñado varios tipos de aparatos para descongelar “pelets” o pajillas de semen, pero en la práctica lo más normal es utilizar un baño de agua con termostato (Evans y Maxwell, 1990).

Es de suma importancia asegurar la calidad del semen después de congelado y descongelado, con el fin de conocer la posible capacidad de su fertilización. El control real de la integridad funcional y de la fertilización es su capacidad para fertilizar huevos “*in vivo*” y, por ende, producir descendencia. Tales ensayos de fertilidad precisan de un tiempo y disponibilidad considerables (Evans y Maxwell, 1990).

La evaluación de un 10% de las dosis congeladas nos permite determinar la aceptación de la partida de congelamiento. Es importante realizar varias observaciones de la misma pajilla. A los 5 minutos de incubación a 36 °C, la evaluación de motilidad masal se lleva a cabo con un lente de 100x en un portaobjetos templado sobre platina térmica. Luego se coloca otra gota de semen entre portaobjetos y cubreobjetos templado, para estimular que los espermatozoides vivos salgan del letargo metabólico en el que estaban y se determina la motilidad individual progresiva velocidad de desplazamiento hacia delante de los espermatozoides vivos (0 mínimo - 5 máximo) (Cueto, Gibbons y Abad, 2000).

Para aceptar una partida seminal, las pajillas deben poseer:

- a.- Motilidad masal al descongelamiento.
- b.- Un porcentaje de espermatozoides vivos superior al 30%.
- c.- Motilidad individual progresiva igual o superior a 3.

Consecuentemente se han realizado muchos trabajos para disponer de métodos simples, rápidos y efectivos para predecir la fertilidad del semen. Con la fertilidad del semen se han relacionado varios parámetros como la motilidad, viabilidad, ultra-estructura y cambios bioquímicos de los espermatozoides después de su congelación – descongelación. No se dispone de ensayos simples; sin embargo, la combinación de algunos de los que se señalan más adelante proporcionarían una información sobre la calidad del semen después de descongelado. El problema es que muchos de estos ensayos no son fáciles de realizar, con lo que el examen de la motilidad y viabilidad del semen descongelado son los que resultan más comúnmente útiles; de esta forma, se estima la calidad del semen en la mayor parte de las circunstancias (Evans y Maxwell, 1990).

3.9.1. Congelabilidad y fertilidad del semen en diferentes épocas del año

Como la oveja y la cabra son especies de cría estacional, la calidad del semen del carnero y el macho cabrío varía a lo largo del año, siendo de menor calidad en verano. Sin embargo, a lo largo de los otros períodos del año la calidad del semen no varía demasiado cuando procede de sementales sanos, si bien en el otoño es la época en la que se obtienen mayores volúmenes de semen. La actividad sexual, así como la recogida y congelación de semen de machos cabríos, particularmente de la raza Angora, queda reducida al otoño y principio del invierno (Marzo a Julio en Australia) (Evans y Maxwell, 1990).

La manipulación del foto período en razas estacionales es sencilla. Pueden ser utilizados distintos tratamientos foto periódicos, si bien en todos ellos, la intensidad lumínica a utilizar debe ser como mínimo 200 lux a la altura de los ojos de los animales (Ureña, 2007).

Los distintos tipos de tratamientos foto periódicos existentes son los siguientes:

- a.- Sucesión precoz de días largos, y días decrecientes en el borrego con el fin de adelantar la pubertad.
- b.- Inversión del régimen foto periódico.
- c.- Régimen foto periódico acelerado para provocar dos estaciones sexuales por año.
- d.- Sucesión de días largos y tratamiento con melatonina.
- e.- Alternancia rápida de días largos y cortos para provocar la desaparición de las variaciones estacionales.

3.9.2. Pruebas de calidad espermática

a.- Capacitación espermática

En condiciones fisiológicas los espermatozoides eyaculados de mamíferos no reúnen las condiciones adecuadas para fecundar el ovocito, debiendo experimentar una serie de cambios estructurales y fisiológicos antes de adquirir dicha capacidad. Este proceso ocurre “*in-vivo*” en el tracto genital de la hembra, y se conoce con el nombre de “capacitación espermática” (Austin, 1952; Chang, 1951). Estas modificaciones habilitan la célula espermática para sufrir la reacción acrosómica (RA) mediante cambios a nivel de membrana que facilitan la penetración de las células del ovocito. Al iniciarse el proceso de capacitación, el espermatozoide adquiere una hiperactivación caracterizada por un batido del flagelo más vigoroso y una mayor amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza, hiperactivación (HA), Ver Figura 3:

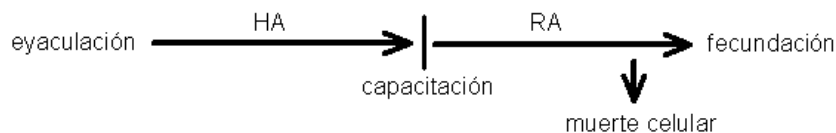


Figura 3. Flujo de capacitación espermática.

La capacitación se realiza de manera secuencial sobre la población espermática (Mendoza, 1996; Dobrinski et al; 1997). La adquisición del estado “capacitado” es mas rápido “*in-vivo*” debido a las múltiples interacciones bioquímicas entre los espermatozoides y el tracto reproductor de la hembra (Mortimer, 1995).

El lugar de deposición del semen durante la cubrición, característico de cada especie, condiciona el momento del inicio de la capacitación espermática así como el tiempo requerido para completarla Cuadro 10 (Cummins, 1995). En especies de deposición uterina (porcino y roedores de laboratorio), la capacitación y almacenamiento espermático se produce en el istmo oviductal (Dobrinski et al; 1997). En especies de deposición vaginal (ovino, caprino y conejo) la capacitación comienza durante el contacto de los espermatozoides con el moco cervical. En estos animales, las criptas presentes en el tracto cervical suponen un reservorio de espermatozoides con capacidad fertilizante (Hunter et al; 1980; Hunter et al; 1982; Mortimer, 1995).

Cuadro 10. Tiempo de capacitación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de los espermatozoides recuperados de la region caudal del epididimo o eyaculados.			
Especie	<i>in vivo</i> (horas)	<i>in vitro</i>	
		Espermatozoides epididimo (horas)	Espermatozoides eyaculado (horas)
Hombre			2
Ratón		1,5 a 2	
Hámster	4 a 6	3	
Rata		4	
Verraco	1,5 a 3		>4
Toro	8		>6
Morueco	2		>5
Conejo	6 a 8	>6	6 a 8
Cobaya		10 a 12	

Fuente: Cortés (1998)

El transporte de espermatozoides desde el lugar de deposición hasta el oviducto se realiza combinando el movimiento activo desarrollado por las propias células espermáticas con movimientos del tracto reproductor de la hembra.

b.- Membrana Espermática

Las membranas biológicas de las células de los mamíferos están constituidas bajo un patrón común, conteniendo en su estructura proteínas, lípidos (principalmente fosfolípidos), colesterol y glúcidos. Estas constan de una bicapa de fosfolípidos como unidad estructural básica. El porcentaje y la naturaleza de las proteínas adheridas a esta bicapa dependen del tipo de membrana (Darnell et al; 1998). La proporción de fosfolípidos, proteínas y glúcidos presentes en la membrana plasmática de las células espermáticas es característica de cada especie, (Darnell et al; 1988; Jiménez Cabras, 1995) y varía dependiendo del estado fisiológico en que se encuentre (Curry y Watson, 1995; Lin y Kan, 1996).

La membrana que recubre la porción cefálica se puede considerar a su vez en tres regiones:

a) membrana que recubre la región acrosomal, por donde dará comienzo la vesiculación y fusión durante la reacción acrosómica.

b) zona ecuatorial, lugar donde las membranas acrosomal y plasmática se fusionan durante la reacción acrosómica.

c) región post-acrosómica. Donde la membrana que protege el flagelo presenta dos dominios: pieza intermedia y pieza principal (Curry y Watson, 1995).

Todas estas regiones de la membrana plasmática se diferencian entre sí por la afinidad selectiva de su unión con lecitinas (Berger, 1990; Jiménez Cabras, 1995), reflejando diferencias en la composición de su glucocalix.

La membrana plasmática del espermatozoide está sujeta a cambios en su composición durante su paso por el epidídimo (Sundhey et al; 1992), en el momento de la eyaculación (interacciones específicas con compuestos procedentes de las distintas glándulas accesorias) y en el transcurso de la capacitación (Curry y Watson, 1995; Nolan y Hammersedt, 1997).

Durante la capacitación, el gameto masculino experimenta numerosas modificaciones bioquímicas, esto debido a múltiples interacciones con diversos componentes presentes en los fluidos del tracto genital de la hembra que deben realizarse hasta alcanzar el complejo cúmulos-ovocito. Como respuesta a un sistema de señalización, ya sea procedente del ovocito o de agentes capacitantes, se produce un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática, en los niveles de calcio intracelular y del intercambio de fosfatidil-inositol, así como un descenso de la actividad ATP-asa, predistribución de proteínas dependientes de calmodulina y cambios en la composición lipídica de la membrana (Langlais et al; 1988; Fraser, 1992; Roldan, 1994). Se produce un incremento de fosfolípidos, debido al descenso en la proporción de colesterol/fosfolípidos dentro de la membrana (Davis et al; 1980; O'Rand, 1982; Go y Wolf; 1985), de la cantidad de fosfatidil-colina (Evans et al; 1980) y fosforilación proteica.

El proceso de capacitación es reversible durante la hiperactivación, lo cual implica la existencia en el medio donde están vehiculizados los espermatozoides de sustancias decapacitantes, como el colesterol, capaz de modificar la fluidez de la bicapa lipídica. Los agentes capaces de estimular su pérdida se definen como factores capacitantes (Fayrer-Hosken et al; 1987; Cross, 1996).

El incremento de la fluidez de la membrana plasmática favorece el movimiento de proteínas y receptores, permitiendo la transducción de señales y la interacción entre los dos gametos (Roldan, 1994; Fusi et al; 1996; Nolan y Hammerstedt, 1997). Estas migraciones proteicas permiten la formación de pequeños parches precursores de la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa. Se produce un descenso del peso molecular en algunas proteínas de origen epididimario incorporadas en la membrana plasmática y en proteínas estructurales como consecuencia de la pérdida de residuos glucídicos (Fournier-Delpech y Thibault, 1993).

El descenso de los niveles de colesterol en la membrana espermática está relacionado con la presencia de proteínas captadoras de esteroides en el tracto

reproductor de la hembra. Debido a la menor concentración de colesterol en las células uterinas, los espermatozoides presentes en útero experimentan un gradiente negativo de colesterol hacia el exterior, induciendo la capacitación espermática (Ureña, 2007).

c.- Factores de capacitación

El fenómeno de la capacitación espermática es un proceso reversible, tal como demuestran diversos autores (Bedford et al; 1962; Chang, 1951). Dicho proceso se debe a la habilidad de ciertas moléculas, conocidas con el nombre de “factores de capacitación” (FD), que están presentes en el plasma seminal, actuando como vesículas donadoras de colesterol y por tanto inhibiendo la capacitación (Davis et al; 1980; Carbonero y Vázquez, 1984). La mayor parte de los mecanismos de acción de los factores de capacitación son desconocidos en la actualidad, existiendo evidencias de la modulación de la concentración de (Calcio) intracelular en espermatozoides de ratón por dichos factores. Durante el paso de los espermatozoides a través del tracto genital de la hembra el plasma seminal se elimina, y con él, las moléculas responsables de la capacitación espermática.

d.- Hiperactivación

La capacitación de los espermatozoides de mamífero implica numerosos cambios a nivel de la membrana plasmática, metabólicos, iónicos y cinéticos, estableciéndose una situación celular que se conoce con el nombre de hiperactivación espermática (HA) que es un fenómeno reversible. Siempre que hay capacitación se produce una hiperactivación pero no siempre que hay hiperactivación tiene lugar la capacitación ni la reacción acrosómica.

La hiperactivación espermática no es un evento sincronizado, presentándose subpoblaciones de espermatozoides hiperactivados a lo largo de la capacitación, apreciando su máximo momento antes de realizar la reacción acrosómica (Robertson et al; 1988; Aitken, 1990; Burkman, 1995). Esta asincronía puede deberse a la gran variabilidad existente entre distintos eyaculados con

respecto al pico de hiperactivación, o a la heterogeneidad en la duración de la misma (Núñez et al; 1995).

La utilización de analizadores computerizados de la movilidad espermática Computer Assisted Sperm Analyzer (C.A.S.A.), ha permitido la valoración de diversos componentes de la movilidad, imposibles de determinar de forma visual. La utilización de estos equipos permite la obtención de una medida objetiva del movimiento del espermatozoide y de su trayectoria, la cual se ve modificada cualitativa y cuantitativamente a lo largo del proceso de hipercinésis. Mediante estos sistemas se ha caracterizado el movimiento espermático, observándose un aumento de la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y velocidad curvilínea, así como una disminución del porcentaje de linealidad y velocidad lineal (Burkman, 1995; Gomes et al; 1996).

La movilidad espermática "*in vitro*" varía en función del medio donde se encuentren los espermatozoides, siendo muy susceptible a contaminaciones o cambios en las condiciones del medio (Burkman, 1995; Dinader et al; 1997). Concentraciones de potasio extracelulares muy altas o muy bajas inducen un descenso en la hiperactivación y en la reacción acrosómica (Fraser, 1983). Las fluctuaciones intracelulares de calcio también inciden en la hiperactivación de las células espermáticas (Robertson et al; 1988), así niveles altos de calcio estimulan una hipercinésis y niveles bajos inhiben tal característica. La utilización de calcio ionóforo o dibutilil AMP cíclico acelera la capacitación y la aparición de la hiperactivación (Suárez y Osman, 1989).

e.- Reacción acrosómica

La reacción acrosómica (RA) en espermatozoides de mamíferos es un proceso exocítico dependiente de calcio (Robertson y Mortimer, 1988; Anand et al;

1989; Brucker y Lipford, 1995; Fraser et al; 1995). El acrosoma espermático, vesícula secretora procedente del aparato de Golgi, está formado por una envoltura acrosómica en cuyo interior existen una gran variedad de enzimas hidrolíticas (Olson y Winfrey, 1991; Brucker y Lipford, 1995). Dichas enzimas, desempeñan un papel esencial durante la reacción acrosómica, siendo la liberación inicial de acrosina un estimulador de la reacción acrosómica (Meizel y Lui, 1976), y el responsable de la fijación del espermatozoide al ovocito (Aitken, 1990).

Debido a la posición que ocupa el acrosoma en la cabeza espermática, la membrana acrosómica se dobla, transcurriendo en forma paralela por casi todo el territorio por el que se extiende (Fawcett, 1975).

Las enzimas liberadas del acrosoma durante la reacción acrosómica facilitan el paso del espermatozoide a través de las envolturas de ovocito, cúmulo oóforo y zona pelúcida (Chang, 1984; Fraser, 1994; Cummins, 1995). Los espermatozoides que sufren la reacción acrosómica después de atravesar el cúmulo oóforo son capaces de unirse a la membrana pelúcida, dando lugar a la penetración del ovocito (Crozet y Dumont, 1984; Crozet, 1988; Brucker y Lipford, 1995).

En la mayoría de los espermatozoides de mamíferos es necesario que se produzca la reacción acrosómica, como consecuencia de la capacitación, para que la fusión con la membrana pelúcida tenga lugar (Crozet y Dumont, 1984; Myles et al; 1987; ORand, 1987; Crozet, 1988; Aitken, 1990; Fraser, 1994).

La determinación de la motilidad de los espermatozoides es el análisis más simple para asegurar la calidad del semen congelado-descongelado y es el ensayo más utilizado. El análisis se hace en un porta caliente (37 °C), provisto de un cubre objeto, inmediatamente de descongelado el semen, si el semen se congeló con una baja relación de dilución y la recuperación, después de descongelado, es relativamente buena, se podrá visualizar una onda de movimiento al observar la muestra al microscopio sin cubre objetos. Para obtener

una indicación de la viabilidad de los espermatozoides, los análisis de motilidad se deberán hacer a intervalos de una o dos horas, durante la incubación de una muestra de 0,5 ml de semen descongelado, en un baño de agua a 37 °C (Evans y Maxwell, 1990).

Los eyaculados individuales de carnero y macho cabrío, solamente se pueden considerar adecuados para su conservación y uso en la inseminación, si el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo hacia delante no es menor del 40% al descongelarlos, y del 30% después de 5 a 6 horas de incubación (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

La congelación y descongelación además de afectar a la motilidad puede lesionar los acrosomas de las células espermáticas. La lesión acrosomal se puede presentar durante el enfriamiento a 5 °C, aunque lo más normal es que se produzca durante la congelación. La proporción de espermatozoides de carnero y macho cabrío con acrosomas lesionados varía con el método de congelación y con el volumen del "pelet" en relación a la temperatura y método de descongelación, pero no excederá al 70%. La integridad del acrosoma se puede observar de dos maneras básicas. Las lesiones físicas se pueden detectar con un microscopio simple, utilizando técnicas especiales de tinción, por ejemplo, eosina/nigrosina o Giemsa. Análisis más detallados requieren el empleo del microscopio electrónico. Un método alternativo incluye un ensayo bioquímica para determinar la cantidad de enzima liberada, como consecuencia de la lesión acrosomal. Ambos métodos precisan de laboratorios bien equipados y tienen un valor práctico limitado (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

3.9.3. Resumen de los puntos importantes implicados en la congelación, conservación y descongelamiento del semen según (Evans y Maxwell, 1990)

a.- Asegurarse que todo el material así como las sustancias químicas estén

disponibles y en buenas condiciones. Todos los utensilios que vayan a estar en contacto con el semen deberán estar limpios, secos y estériles.

- b.- Controlar la temperatura (5 °C) del refrigerador o cámara fría, para refrigerar el diluyente con el semen.
- c.- Preparar el diluyente para la congelación. Colocar en una probeta graduada todos los constituyentes, exactamente pesados y disolverlos en agua bidestilada. Adiciónese los antibióticos, el glicerol y la yema de huevo de último para completar el volumen final con el resto de agua, una vez diluido los componentes del diluyente, colocarse en baño de agua a 30 °C, antes de usarlo.
- d.- Colocar los tubos (debidamente identificados) de recolección con el semen en baño de agua a 30 °C, una vez analizado su concentración y calidad espermática, realizar los cálculos de dilución y diluir agregando la cantidad adecuada al semen, lentamente y agitando constantemente para aumentar la dilución.
- e.- Para congelar las pajillas de semen, primero se hace el llenado de pajillas a temperatura ambiente, debidamente identificadas, dejar un pequeño espacio de vacío entre el tapón de cierre y el semen, para evitar que la pajilla explote durante la congelación. Sellar las pajillas con alcohol polivinílico parcialmente hidrolizado y situarlas en una bandeja o frasco que contenga agua a 30 °C para completar el sellado adecuado de las pajillas, luego llevarlas al refrigerador para aclimatarlas.
- f.- Enfriar las pajillas a 5 °C de 2 a 3 horas.
- g.- Luego de este tiempo, sacar las pajillas y tomar una al azar para comprobar su calidad y motilidad espermática post-enfriado, asegurarse de que cumpla con los requisitos mínimos establecidos. El mínimo de motilidad aceptable es 40%.

- h.- Para congelar las pajillas, antes deben sufrir un proceso de acondicionamiento en vapores de nitrógeno líquido, durante aproximadamente 20 min a $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$, los vapores se disponen en una hielera de polietileno con una gradilla (contenido las pajillas horizontalmente) situada de 9 a 10 cm de la base de la hielera, para llenar con nitrógeno líquido hasta la marca de 5 cm, así la gradilla con las pajillas estén de 3 a 4 cm por encima del nivel de nitrógeno líquido.
- i.- Realizar el trasvase de las pajilla a canastas que las contengan en los termos de nitrógeno líquido y consumir las mismas lentamente hasta colocarlas adecuadamente en el tanque.
- j.- Asegurarse de que el nivel de nitrógeno sea el indicado antes de meter las canastas con las pajillas, se sabe de que el nivel de nitrógeno debe estar por encima del nivel de las canastas o más arriba de la mitad del tanque. Para conocer el volumen del mismo, se puede utilizar una varilla de madera pintada de negro. Una vez sumergida por 30 segundos, se retira y se agita hasta observar una capa blanca de congelación, cuya altura es igual a la del nitrógeno líquido en el interior del termo. Se debe tener precaución debido a que a medida que el volumen disminuye, la pérdida de nitrógeno por evaporación es mayor.
- k.- Utilizar pinzas y guantes adecuados al manejar el nitrógeno líquido.
- l.- Para descongelar las pajillas de semen, colocar estas en un baño de agua a $30 - 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos aproximadamente, realizar las pruebas de motilidad y viabilidad espermática una vez descongelado el semen, teniendo en cuenta que se mueren aproximadamente un 20% de espermatozoides en el proceso de descongelación, lo cual el límite inferior de sobre vivencia es de un 50% con un 30 a 40% de espermatozoides con movimiento progresivo hacia delante.

3.10.- Manejo de los termos de nitrógeno líquido

El semen congelado se almacena en la finca dentro de un tanque lleno de nitrógeno líquido. Este tanque es un termo conservador de frío, en forma de botella, tiene dos cubiertas de aluminio o acero inoxidable: una externa y otra interna, separadas por un material aislante, sometido a una presión de vacío extremo, dejando aislado un compartimiento interior. Con esta construcción, el depósito interno del tanque se aísla totalmente del medio ambiente. El depósito interno del tanque contiene el refrigerante (nitrógeno líquido). El nitrógeno líquido tiene una temperatura de -196°C y el espacio vacío por encima del refrigerante, hasta el cuello del tanque, es solamente unos pocos grados más caliente. La velocidad de evaporación y el tiempo de conservación del nitrógeno líquido en el depósito interno depende de la construcción del tanque (Boschini, 2006).

Se recomienda revisar el nivel de nitrógeno al menos una vez por mes. El refrigerante evaporado debe ser repuesto antes de que el nivel baje a 10 cm por encima del fondo, para que se mantenga la temperatura deseada en forma constante. El nivel de nitrógeno líquido se mide introduciendo en el tanque una regla de madera, durante 10 a 15 segundos. La regla se extrae y se agita vigorosamente por 5 segundos para que se forme una escarcha en la porción que tuvo contacto con el nitrógeno. La introducción de la regla dentro del tanque provocará la evaporación de nitrógeno en forma abrupta (se forma una nube densa blanquecina), debido al intercambio de calor con la regla (20 a 25°C a temperatura ambiente) (Boschini, 2006).

El tanque debe mantenerse en posición vertical, boca arriba, y ser protegido de daños externos, ocasionados por golpes con objetos contundentes o punzo cortantes. Un tanque averiado podría secarse en menos de 24 horas y el semen almacenado se perdería. Si en alguna parte externa del tanque se encontrara un área cubierta de escarcha, señala la zona de evaporación e indica que aun hay nitrógeno dentro del termo y que está en ebullición. En estos casos se recomienda trasladar el semen a otro tanque, lo más pronto posible. Estos tanque pueden empezar a perder la capacidad de conservación de frío por vejez (deterioro

inespecífico), y se observa ello cuando al termo se le debe reponer el nitrógeno en intervalos más cortos de lo normal. Para proteger el tanque se recomienda colocarlo dentro de un cajón de madera, ajustado a sus dimensiones. En la tapa del cajón, debe llevarse un registro de control del nivel de nitrógeno y el llenado del tanque (Boschini, 2006).

Dentro del tanque se colocan 5 o 6 canastillas de metal “canisters”, las cuales cuelgan de un anillo o plato ubicado en la boca del termo por medio de un gancho. Además de sujetar los ganchos de la canastilla, el anillo o plato sirve para identificar el semen (razas o cabros) que se encuentra en cada canastilla. Dentro de cada canastilla de metal se colocan tubos de plástico “globlets”, de un centímetro de diámetro, cerrados en el fondo. Dentro de estos contenedores se colocan las pajillas o pajuelas de semen, en grupos de 5 a 10 pajillas por contenedor. Cada pajilla de semen tiene la correspondiente identificación: nombre de registro del cabro, su número de registro genealógico, la fecha de procesamiento y raza. Cada raza de cabras tiene un color asignado: Alpina morado - La Mancha amarillo - Nubiana rojo - Saanen azul - Toggenburg verde (Boschini, 2006).

3.10.1. Precauciones en el manejo del tanque

Según Boschini (2006):

- a.- El tanque de almacenamiento de semen debe estar siempre en un lugar fresco, ventilado, al menos sobre una plataforma o base de madera para aislarlo del piso de concreto y la humedad.
- b.- Cuando se llena por primera vez con nitrógeno, antes del llenado se colocan las canastillas de metal dentro del tanque, luego se lleva al distribuidor más cercano para el correspondiente llenado.
- c.- El semen congelado se coloca dentro de las canastillas cuando el tanque esta lleno de nitrógeno.

d.- Nunca introduzca los dedos dentro del cuello del tanque. La excesiva baja temperatura del nitrógeno líquido congela y cristaliza en segundos. En contacto con la piel, produce quemaduras severas.

e.- Cuando se reemplaza una canastilla, ella está a temperatura ambiente (20 a 25° C), al introducirla en el tanque se provoca un choque térmico que hace ebullición del congelante. Se recomienda introducir la nueva canastilla de manera que los vapores de nitrógeno la enfríen progresivamente. Una vez que la canastilla está enfriada, se colocan las escalerillas con el semen congelado que se requiere.

f.- Nunca trasvase nitrógeno de un tanque a otro. Es una operación sumamente peligrosa; el nitrógeno en estado líquido puede adherirse a la ropa y quemar bruscamente la piel y los ojos.

g.- Revise el nivel de nitrógeno al menos una vez por mes.

3.10.2. Inventario de semen almacenado en el tanque

En el tanque de cada finca se encuentra almacenado la mitad genética del hatillo futuro. Por ello debemos conocer permanentemente su contenido en detalle (inventario). En la Figura 4 se detalla el registro de inventario mínimo que debe contener un tanque de almacenamiento de semen:

Nombre del cabro:			
Raza:		No. Identificación:	
Fecha	Unidades compradas	Unidades usadas	Unidades que quedan

Figura 4. Registro e inventario de semen

Fuente: Boschini (2006)

Este registro se confecciona en una libreta o bitácora, destinando una página para cada animal. En el encabezado de cada página se anota el nombre, el número de identificación y la raza del animal. Debajo de ese encabezado, el espacio se divide en cuatro columnas: fecha en que recompra o se usa el semen, cantidad de pajillas compradas, cantidad ocupadas y el saldo remanente en el termo. Cada vez que se compra o se saca semen del tanque, se registra en la bitácora. La bitácora de registro debe estar literal o físicamente amarrada al tanque (Boschini, 2006).

3.11.- Inseminación

La inseminación de la oveja y la cabra puede ser vaginal, cervical o intrauterina. Los métodos difieren en cuanto a su complejidad y expectativas de éxito (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

La inseminación vaginal es el método más simple y más rápido cuando se utiliza semen fresco diluido pero requiere una dosis de semen generalmente mayor que si se utiliza alguno de los otros métodos. Aunque no se pueda recomendar de una forma general, la inseminación vaginal puede ser útil cuando el tiempo y las disponibilidades sean factores limitantes o para inseminar hembras vírgenes en las que la estrechez de la parte vesicular no permite la penetración del especulo (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Los programas de inseminación artificial y mejoramiento genético están normalmente destinados a las cabras de alto valor genético de la cabaña o el establecimiento. Antes de incorporar los animales a un programa de inseminación, es necesario tener en cuenta los siguientes aspectos de nutrición, sanidad y reproducción según Cueto, Gibbons y Abad (2000):

- a.- Las hembras deben alcanzar como mínimo 2-3 puntos de condición corporal al momento de la inseminación artificial. La condición corporal es un valor subjetivo o índice de la gordura de los animales. Consiste en medir la deposición grasa de los músculos lumbares, con un grado máximo de 5 y

uno mínimo de 0 (Morand-Fehr, P; Hervieu, J; 1999).

- b.- Las cabras deben estar libres de enfermedades.
- c.- El destete de los cabritos debe realizarse 6 a 8 semanas antes de la inseminación artificial.
- d.- Se deben separar las cabras viejas y con problemas de ubre (pezones ciegos, ubres cortadas o mastitis), así como aquellas cabras que no han parido durante 2 años consecutivos.

El método más comúnmente utilizado para ovejas y cabras es la inseminación con semen fresco. El equipo necesario es simple y, si se dispone de personal suficiente, el número de animales que se inseminan en poco tiempo es muy grande. Cuando se practica adecuadamente, la inseminación cervical con semen fresco o semen sin diluir da por resultado una alta fertilidad, comparándola con la obtenida en rebaños con monta natural. Este es el método generalmente recomendado de inseminación cuando se utiliza semen fresco diluido o sin diluir (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

En algunas cabras se puede practicar la inseminación intrauterina, vía cervix. La inseminación intrauterina con semen fresco diluido se utiliza para inseminar hembras súper ovuladas en los programas de transferencia de embriones (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

En el Cuadro 11 se presentan valores de eficiencia reproductiva para distintas alternativas de inseminación artificial (valores de referencia para razas lecheras) según Cueto, Gibbons y Abad (2000).

3.11.1. Preparación de las hembras para inseminar

Las cabras candidatas a inseminar son únicamente aquellas que han mostrado dos celos regulares consecutivos; entonces, se puede decir que, desde el punto de vista del reloj estral, están aptas para la inseminación, con alta

probabilidad de éxito. Los animales con ciclos regulares tienen celos programables, lo cual permite, con anticipación, esperarlos y observarlos desde que aparecen los primeros signos de celo, ver su evolución y el período de duración. Por el contrario, la inseminación de cabras con ciclos irregulares tienen una alta probabilidad de fracaso (Boschini, 2006).

Cuadro 11		Valores de eficiencia reproductiva con distintas alternativas de inseminación artificial.		
Semen	Vía	Dosis, millones	Inseminación artificial	Preñez, %
Fresco	Cervical	100	Con detección de celo	60 - 70
Congelado	Cervical	200	Con detección de celo sistemática*	50 (+-10)
	Laparoscópica	100	Con detección de celo sistemática**	55 (+-10)

* 45 horas post retiro de las esponjas intravaginales.
 ** 55 horas post retiro de las esponjas intravaginales.

Fuente: Evans y Maxwell (1990)

Los signos externos de celo, como la erección de la cola, con movimientos intensos de vaivén, el abultamiento y coloración rosado intenso de la vulva, la descarga de moco en presencia del macho, los periplos por acercarse, son signos claros de celo, pero insuficientes para conocer el momento de ovulación. Se espera que el celo dure unas 24 horas en cabras jóvenes y de 2 a 3 días en cabras adultas. Esta información permite acercarse mejor a un pronóstico del tiempo de ovulación y disponer el momento ideal para la inseminación. La inspección vaginal del cuello uterino, observando el color de la tumefacción, la intensidad de la vaso dilatación, así como la mayor densidad y coloración opaco-blanquecina del moco, contribuyen, en conjunto, a mejorar un pronóstico más acertado para realizar la inseminación (Boschini, 2006).

Tomando en cuenta que los espermatozoides tienen una vida media de 6 a 12 horas en el útero y contando con pajillas de semen que tienen 100 % de

calidad biológica, la probabilidad de éxito de la inseminación artificial (preñar la cabra) puede dividirse en tres partes:

- a.- Regularidad de celo (33 %).
- b.- Escoger el momento de realizar la inseminación (33 %).
- c.- Calidad de la destreza y habilidad instrumental del inseminador (33 %).

La regularidad del ciclo estral es mayor en hatos bien alimentados, acompañado de una vigilancia permanente de la condición corporal. Una herramienta de gran ayuda es la inducción y sincronización hormonal de celos (Boschini, 2006).

Los equipos detectores de celo ayudan a medir la evolución de celo y a determinar con mucha preedición los cambios que anteceden la ovulación. Es una excelente herramienta para determinar el momento de realizar la inseminación (Boschini, 2006).

3.11.2. Sincronización de celos

El mejor resultado en cabras cíclicas (con ciclo estral), con anestro poco profundo en la estación reproductora o con anestro estacional, ha sido el uso de progestágenos, especialmente el acetato de fluorogestona (FGA) impregnado en esponjas, que se aplican por vía vaginal o por implantes subcutáneos de otros progestágenos, los cuales se van absorbiendo poco a poco, provocando un bloqueo de la actividad estral, por un efecto de retroalimentación negativo hacia la producción de hormonas hipofisarias, en un período relativamente corto. Logrando este objetivo, se interrumpe el tratamiento de progestágenos por retiro de la esponja o el implante, entonces la hipófisis envía al ovario una descarga de hormona folículo estimulante (HFE), que induce el crecimiento folicular y enseguida el celo y la ovulación. Al final del tratamiento con progestágenos, puede aplicarse prostaglandinas para provocar o acelerar la lisis de cualquier cuerpo lúteo presente en los ovarios. Además, para potenciar la asociación celo-

ovulación, puede aplicarse gonadotropina sérica (PMSG-Pregnance Mare Seric Gonadotrophin) para asegurar el crecimiento folicular y una mayor descarga de la hormona luteinizante (LH), responsable de la ovulación y cuerpo lúteo. También puede aplicarse gonadotropina coriónica (eCG-equine Corionic Gonadotrophin) para estimular la maduración de los folículos, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Boschini, 2006)

El tratamiento más recomendado es la utilización de progestágenos (derivados de progesterona), en dosis de 30 a 40 mg de acetato de fluorogestona (FGA) o 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP), impregnadas en esponjas intravaginales. Las mismas simulan la acción de un cuerpo lúteo mediante la liberación lenta de progestágenos. Se colocan en la vagina por 15 a 17 días, período de tiempo que iguala o excede la vida media del cuerpo lúteo (Cueto, Gibbons y Abad, 2000).

Debido a la alteración del transporte espermático producida por efecto de los progestágenos y con el objetivo de mejorar la sincronía de los celos y las ovulaciones, se aconseja la utilización de progestágenos en forma combinada con una dosis de gonadotropina coriónica equina (eCG) (Cueto, Gibbons y Abad, 2000).

La eCG se administra por inyección intramuscular (IM) al momento de retirar las esponjas, en la estación reproductiva; o 48 horas antes del retiro, en el anestro estacional. Provoca un pico importante de estrógenos, induciendo la aparición de un pico preovulatorio de LH y la ovulación; al tiempo que mejora la sincronía de celos. Las dosis utilizadas de eCG varían entre 200 y 600 UI, dependiendo fundamentalmente del peso corporal, de la raza y de la época del año, aconsejándose probar en principio la dosis menor. Es importante destacar que dosis elevadas de eCG ocasionan ovulaciones y gestaciones múltiples, generando altas pérdidas por mortalidad prenatal (Cueto, Gibbons y Abad, 2000).

Las hormonas que acompañan la aplicación de progestágenos como las prostaglandinas, la hormona folículo estimulante, la hormona luteinizante y las

gonadotropinas mencionadas, solo son de aplicación complementaria para lograr objetivos anatómico-funcionales específicos del ovario, cuando se estime necesario el complemento y este debe ser en dosis suficiente y exacta para la estimulación funcional que se pretende obtener en cada cabra, según su edad y peso (Boschini, 2006).

Además, la aplicación de estas hormonas complementarias se hace siguiendo los tiempos y movimientos en que ellas sean necesarias para estimular el proceso estral y funcional del ovario, como: lisamiento de cuerpo(s) lúteo(s) previo(s), crecimiento y desarrollo folicular, manifestación de celo, ovulación y formación del cuerpo lúteo nuevo (Boschini, 2006).

Las dosis inapropiadas causan diversos trastornos; por ejemplo, la aplicación insuficiente de PMSG puede inducir a un crecimiento inmaduro de los folículos, mientras que una dosis excesiva induce el crecimiento y desarrollo polifolicular y superovulatorio, útil cuando se pretende la extracción de embriones, pero perjudicial cuando todos compiten por implantarse sin resultado positivo y sobreviene la muerte embrionaria total, sin obtenerse la preñez y gestación por la cual se hizo el trabajo; más allá, podrían presentarse en el futuro trastornos ováricos residuales (Boschini, 2006).

Cuando se tiene por objetivo el manejo de una reproducción programada, el dominio de la planificación de la conducta reproductiva del hato esta ligada al uso de hormonas, para inducir y sincronizar los celos. Existen varios protocolos para ello, por usar, unos dentro y otros fuera de la estación sexual. Por lo general, los protocolos son métodos cronológicos de aplicación y dosificación que se establecen en hatos de países no tropicales, con muy buenas condiciones de alimentación, excelente crecimiento, tamaño y condición corporal del animal (Boschini, 2006).

En las condiciones tropicales típicas, el método cronológico de aplicación es el mismo por la naturaleza misma del ciclo estral; sin embargo, la dosificación debe ser investigada, a fin de proporcionarla adecuadamente al peso corporal,

debido a la gran variabilidad de peso en los hatos caprinos tropicales (Boschini, 2006).

En Patagonia, para las cabras de la raza Angora, se recomienda un tratamiento con esponjas intravaginales durante 17 días y una aplicación de eCG de 200 UI al retiro de las mimas (Cueto, Gibbons y Abad, 2000).

En Francia, para las razas lecheras de alta producción, el esquema de sincronización de estros consiste en la colocación de esponjas intravaginales durante 11 días. A las 48 horas antes del retiro de las esponjas, se aplica intramuscular una inyección de eCG (400 a 500 UI durante la estación reproductiva y 500 a 600 UI en contra estación reproductiva) y una de prostaglandina (100 microgramos de cloprosterol) (Cueto, Gibbons y Abad, 2000).

El método de sincronización de estros con esponjas intravaginales y eCG, permite alcanzar una elevada concentración de celos y llevar a cabo la inseminación artificial a un tiempo fijo luego de finalizado el tratamiento hormonal, sin detección de celos (inseminación artificial sistemática). Asimismo, facilita el servicio dirigido a corral y también permite la concentración de los estros fuera de la estación reproductiva. Los estros se presentan en el 85 a 95% de las cabras, entre las 24 a 48 horas post retiro de las esponjas (Cueto, Gibbons y Abad, 2000).

No se recomienda utilizar esponjas en las cabritas de primer servicio ya que, debido a la necesidad de romper el himen durante su colocación, un gran número de animales pueden presentar los laterales de la esponja adheridos a las paredes internas de la vagina al momento de su retiro (Cueto, Gibbons y Abad, 2000).

Durante la estación reproductiva, cuando las cabras están ciclando, el estro puede ser sincronizado por la administración de prostaglandinas F2 alfa (Pf2alfa) mediante la aplicación de 100 microgramos intramuscular de cloprostenol. Es a partir del día 4 hasta el día 17 del ciclo estral cuando se presenta el efecto luteolítico. Cuando se utilizan dos aplicaciones, separadas por 11 días, cualquiera

que sea el día del ciclo estral en que la cabra estuviese al momento de la primera inyección, estará en fase luteal al momento de la segunda, aumentando la eficiencia de la sincronización. El estro se presenta dentro de las 66 horas de aplicada la segunda dosis, con eficiencia variable y una marcada dispersión de los estros (Cueto, Gibbons y Abad, 2000).

Uno de los protocolos más usados es el de Intervet®, aplicable a la inducción y sincronización de celo en cabras, dentro y fuera de la estación reproductiva. Este protocolo se denomina Chrono Gest®, con 45 mg de cronole (acetato de fluorogestona o FGA) impregnado en una esponja de aplicación intravaginal. El protocolo corresponde a la siguiente Figura 5:

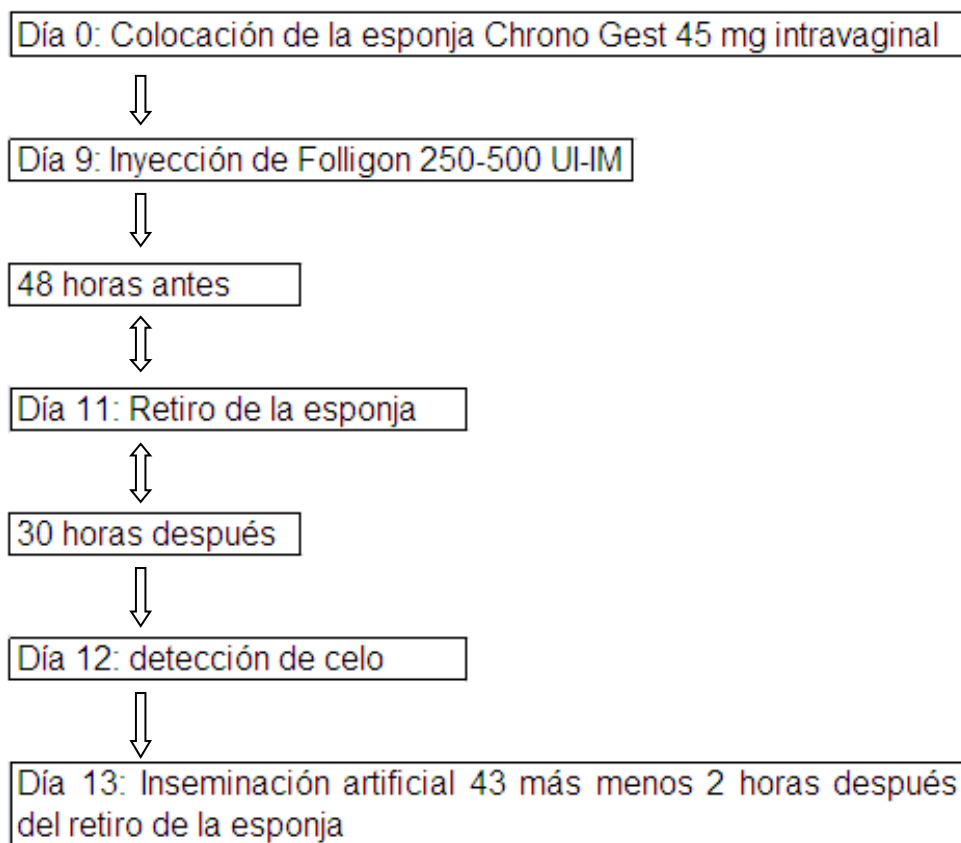


Figura 5: Protocolo de inducción y sincronización de estro (Chrono Gest)®

3.11.3. Métodos de inseminación

a.- Inseminación vaginal

La inseminación vaginal consiste en la deposición de semen dentro de la vagina anterior sin intento de localizar el cérvix. En Australia este método se le conoce como “disparar a oscuras o método SID” (shot in the dark) (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

La vulva de la hembra se debe limpiar con un poco de algodón para evitar la contaminación de la vagina al introducir la pipeta, esta se carga primero con un poco de aire, hasta la división 0,2 ml, y luego con la dosis requerida de semen, cogida del tubo que se mantiene en el baño de agua a 30 °C. El aire tiene la función de ayudar a que se expulse toda la cantidad de semen contenido en la jeringa o pistola de inseminación. La pipeta se debe introducir con sumo cuidado, lo más lejos posible en la vagina, deslizando su punta por la parte superior de ésta, evitándose así su introducción accidental en la uretra, que está en el suelo de la vagina (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Como por lo general no se utiliza espéculo, la introducción de la pipeta puede ser facilitada abriendo la vulva con la mano libre y tratando de mover de un lado a otro, con suavidad la pipeta para que penetre mejor. Se aprieta, una vez en su sitio, el émbolo de la jeringa y se retira la pipeta. La pipeta de inseminación se puede utilizar varias veces siempre que se limpie adecuadamente, mediante el método de “flameado” (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Los resultados de este método son también los menos confiables, ya que el semen se deposita en la entrada de la cervix, donde los espermatozoides tienen la oportunidad más limitada de fertilizar los óvulos (Durán, 2007).

b.- Inseminación Cervical

La inseminación cervical implica la deposición del semen a una profundidad de hasta 3 cm dentro del cérvix. Si, como sucede en algunos animales, el cérvix

permite el paso de la pipeta, el método se transforma en inseminación intrauterina, no quirúrgica (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Hasta hace poco tiempo la inseminación cervical era un método muy arriesgado, además de no resultar muy efectivo en cabras. Para éste procedimiento se utiliza un pequeño endoscopio óptico capaz de atravesar el cérvix y funciona como una técnica no quirúrgica de inseminación, entrando en el útero, pasando por la vagina y el cérvix (Durán ,2007).

Para la inseminación cervical se suele emplear la técnica de “sobre la barra”. La vulva de la hembra, oveja o cabra, se limpia con algodón. Los genitales externos suelen estar limpios, de todas formas la introducción del espejulo será más sencilla si el animal carece de pelo o lana en la región (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Si se utiliza un espejulo, tipo “pico de pato”, se debe introducir en la vagina con las valvas cerradas y paralelo a los labios de la vulva. Se debe tratar de introducir el espejulo con mucha suavidad, sin ocasionar daños o lesiones en los tejidos. Después de insertado unos 10-13 cm, el espejulo puede rotar unos 90° (arriba o abajo) y abrir sus valvas, se dirige, entonces el haz de luz de la bombilla hacia la vagina profunda, a través del espejulo abierto. El cérvix se localiza fácilmente manipulado el espejulo hacia los lados. Las valvas del espejulo no deben permanecer abiertas mucho tiempo para evitar que molesten al animal. Si se hace difícil la localización del cérvix, es aconsejable mover la postura de sujeción del animal (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Si en la vagina se observa cualquier material extraño (simientes de pasto, por ejemplo) se deben eliminar, antes de la inseminación, con la ayuda de unas pinzas largas. Cuando en la vagina se encuentre acumulada gran cantidad de mucus, o cuando éste cubra la entrada del cérvix, se debe limpiar o drenar la vagina, lo que se consigue presionando cuidadosamente la punta del espejulo contra el suelo de la vagina y en esa posición se procede a abrir y cerrar el espejulo. Esta operación es más eficiente si un ayudante eleva la parte anterior

del animal para que el drenaje sea más fácil (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Algunas hembras, particularmente las que son susceptibles de estrés o las que se manejan con poco cuidado, pueden orinar cuando se las coloca en posición de inseminar. Si la orina se acumula en la vagina se debe drenar de inmediato y lavar la vagina con solución salina, leche u otro diluyente o dejarla en recinto aparte para inseminarla más tarde (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

El lugar donde se practica la inseminación artificial debe estar limpio, a una temperatura ambiente de 20 a 25 °C, y libre de corrientes de aire (Cueto, Gibbons y Abad, 2000).

En la especie caprina, a diferencia de la ovina, tanto la inseminación artificial con semen fresco como semen congelado, puede realizarse por vía cervical. Debido a la reducción de la viabilidad espermática producida por el proceso de congelamiento y descongelamiento, la dosis de inseminación con semen es de 200 y 100 millones de espermatozoides, respectivamente (Cueto, Gibbons y Abad, 2000).

El primer paso en la inseminación cervical es la introducción de un espéculo lubricado a través de la vagina de la cabra; los fórceps quirúrgicos se usan para mantener abiertos los pliegues de tejidos en la entrada del cérvix. El endoscopio se introduce en la entrada del cérvix y su conformación acodada facilita su manipulación a través de primer anillo. Luego apoyado en el ojo óptico se conduce el endoscopio a través de los anillos del cérvix. Una vez que haya atravesado el último anillo cervical, el semen se deposita en el cuerpo del útero. Por este método se han reportado fertilidades que oscilan entre el 40 y 60 % (Durán ,2007).

La cabra debe sujetarse de pie, en un mínimo de tiempo, evitando causar estrés innecesario. Se limpia la vulva con una toalla de papel descartable. Se introduce el vaginoscopio hasta el fondo vaginal en donde se localiza el cérvix. A

continuación la punta de la vaina de inseminar se guía hasta el orificio uterino externo y se introduce mediante suaves movimientos, sin lesionar la mucosa, llevándose a cabo la descarga del semen (Cueto, Gibbons y Abad, 2000).

El inseminador intentara introducir la pipeta lo más profundamente posible dentro del cérvix, pero sin utilizar la fuerza. Si la pipeta penetra el cérvix, el semen puede depositarse en el útero al empujar el embolo de la jeringa. Cuando la pipeta queda insertada dentro del cérvix, se retira ligeramente el espéculo y se empuja el émbolo de la jeringa, esa retirada del espéculo permite el cierre de la vagina anterior lo que impide el reflujo del semen. Después de depositar el semen se retira, primero la pipeta y luego el espéculo (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

La posición y forma de los pliegues de la entrada del cérvix varía considerablemente de unos animales a otros y en algunas hembras se puede introducir la pipeta dentro del cérvix manipulando cuidadosamente, sus pliegues. La utilización de pipetas con la punta angulada ayuda a este proceder. Se necesita un tanto de práctica para localizar el cérvix e introducir la pipeta lo más profundamente posible. En las cabras suele ser necesario introducir la pipeta como si se tratara de la rosca de un tornillo. Si no hay resistencia la penetración de la pipeta suele ser muy fácil, pero también habrá que tener cuidado, en estos casos, de no introducirla demasiado ya que se podría lesionar la pared del útero (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Se ha demostrado, tanto en la oveja como en la cabra, que cuanto más profundo se deposite el semen mayor es el índice de fertilidad Cuadro 12 (Evans y Maxwell, 1990).

En general, el cérvix puede ser penetrado, y depositado el semen dentro del útero, en el 30 a 50% de las cabras. Es importante advertir que en las hembras en las que el cérvix es penetrado en una inseminación, no necesariamente presentan un cérvix penetrable en subsiguientes inseminaciones (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

En un trabajo de campo se inseminaron 15 cabras por vía cervical, utilizando semen fresco; el 60 % de las hembras quedaron preñadas y parieron crías viables, algunas de ellas mellizos y trillizos, todos mostraron gran similitud de rasgos con la raza Saanen de la cual se tomó el semen utilizado. Los resultados muestran que es posible inseminar cabras en cualquier momento del año y en consecuencia, lograr nacimientos y lactancias cuando sea económicamente más conveniente. Este tipo de programas abre la posibilidad de utilizar semen congelado de reproductores de gran calidad que permitan enriquecer la genética caprina nacional (Durán, 2007).

Para evitar la dispersión de enfermedades es necesario limpiar cuidadosamente todo el instrumental entre cada inseminación. Es muy importante que la pipeta este limpia y seca antes de introducirla en el tubo que contiene toda la cantidad de semen, ya que cualquier contaminación puede acabar con todos los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Después de la inseminación, tanto las ovejas como las cabras, se procurara liberarlas en un lugar donde estén tranquilas y permanecer relajadas, sin alteraciones de ningún tipo, de 2-3 horas luego de inseminadas (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Cuadro 12. Índices de fertilidad (%) en relación con la profundidad de la inseminación cervical en cabras Angora cruzadas.		
Profundidad de inseminación	Semen fresco diluido	Semen congelado
Hasta 1 cm	42,0	27
1 a 3 cm	58,3	45,9
Dentro del útero	69,1	68,6

Fuente: Evans y Maxwell (1990)

c.- Inseminación intrauterina

La laparoscopia es una técnica que mediante un sistema óptico introducido

por punción en la cavidad abdominal que permite realizar la visualización de los cuernos uterinos. El acceso con la dosis de semen se realiza a través de un pequeño orificio que se efectúa con un trocar en proximidad de la glándula mamaria. La inseminación consiste en inyectar la mitad del semen en cada cuerno uterino, mediante una jeringa que dispone de una fina aguja (Cueto, Gibbons y Abad, 2000).

Esta técnica de inseminación es utilizada ampliamente en la especie ovina, donde los porcentajes de preñez con semen congelado por vía cervical son del 20 al 25%, debido a la dificultad que presenta el cérvix para ser traspuesto con la pipeta de inseminación. En el caprino está siendo utilizada con la doble finalidad de elevar el porcentaje de preñez respecto a la inseminación artificial por vía vaginal y de reducir el número de espermatozoides por dosis de inseminación. Otra ventaja que presenta la inseminación artificial por laparoscopia es que permite realizarla a un tiempo fijo con respecto al retiro de las esponjas (inseminación artificial sistemática), alcanzándose una fertilidad aceptable (Cueto, Gibbons y Abad, 2000).

Las ovejas y cabras que se vayan a inseminar quirúrgicamente deben ser privadas de agua y alimento, al menos 12 horas antes (normalmente toda la noche) antes de practicar la operación. Esta medida reduce el contenido de la vejiga y el rumen, lo que da por resultado una localización más fácil del útero y evita, así mismo, la regurgitación del contenido ruminal durante la laparoscopia (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

La inseminación artificial intrauterina se procurará realizarla en lugar próximo a donde estén los animales y en una zona lo más limpia y confortable posible. Las ovejas y cabras se esquilan alrededor de la ubre y en los primeros 10 a 12 cm de la panza, lo que se puede hacer tanto manual como con máquina eléctrica, la suciedad y la grasa se eliminan mediante lavado con agua y jabón antiséptico, la piel se puede esterilizar con un antiséptico, por ejemplo alcohol al 70% en agua. A continuación se anestesia localmente (por ejemplo, 2 a 4 ml de

clorhidrato de lignocaína al 2%) inyectándola por vía subcutánea, 5 a 7 cm anteriores a la ubre y 3 a 4 cm laterales a la línea media. Poner especial cuidado para evitar lesionar vasos sanguíneos al poner la anestesia. El animal es colocado para la inseminación con sus cuartos traseros levantados, con un ángulo de unos 40° o más, desde la horizontal (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

La cánula- trocar y el telescopio, sin ocultar, se sumergen en una solución esterilizante que debe estar en un recipiente próximo al operador. El telescopio se conecta a la fuente de luz mediante un tubo de fibra óptica conectando el aparato para comprobar su funcionamiento. La cánula de 7 mm de grosor se conecta a la bomba a través de la línea de gas y el regulador se desconecta hasta el aumento de la insuflación. El trocar-cánula de 7 mm de diámetro se introduce en la cavidad abdominal a la izquierda de la línea media. Se debe poner especial atención para no lesionar órganos abdominales ni los grandes vasos sanguíneos. El trocar y la cánula de 5 mm de diámetro se colocan a la derecha de la línea media antes, o para más seguridad, después de la insuflación de la cavidad abdominal. El trocar de 7 mm de diámetro se puede retirar de la cánula y en su lugar se coloca el telescopio (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Se insufla gas dióxido de carbono en la cavidad peritoneal, lo que debe hacerse con cuidado; solo se precisa un pequeño volumen de gas para separar la capa muscular de los tejidos abdominales y visualizar mejor los órganos abdominales, la sobre inflación produce malestar en el animal. A través del telescopio es fácil ver el interior del abdomen. El útero se localiza justamente anterior a la vejiga (pero según la posición que mantiene la oveja, en el carrillo, está por debajo de aquella). Si la vejiga se encuentra llena se debe vaciar con el telescopio la cánula (sin trocar). Se puede introducir un par de forceps a través de la cánula de 5 mm de diámetro para ayudar a la localización del útero. En algunos casos, particularmente si el trocar no es lo suficientemente agudo, la punta no penetra el omento (capa de tejido entre la pared abdominal y las vísceras que, a menudo tienen grasa). Esto dificulta la identificación de los órganos internos, pero se puede remediar retirando el omento, lo más posible o atravesándole el trocar,

procurando no llegar a los órganos internos. La grasa visceral, que puede oscurecer el útero, se puede apartar con el telescopio (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Para la inseminación, un ayudante debe preparar las pipetas de inseminación aspirando primero un poco de aire (0,3 ml) y después el volumen requerido de semen. Después que el operador haya localizado el útero se retira el trocar de la cánula de 5 mm de diámetro y se reemplaza por la pipeta de inseminación. El operador, observando a través del telescopio, puede guiar la punta de la pipeta hacia un cuerno del útero. Debido a la posición del útero en la cavidad abdominal, el semen se deposita más fácilmente en cada uno de los cuernos del útero que ocupan una posición intermedia entre la bifurcación uterina y la unión útero-tubal. Una vez localizado el sitio, la pipeta- aguja atraviesa la pared uterina, llegando hasta el lumen. Se empuja, luego, el émbolo de la jeringa para depositar el semen que debe observarse como fluye por la punta de la pipeta. Se retira la pipeta y se repite la operación en el otro cuerno del útero (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Después de depositar el semen se retira el telescopio. Se puede desinflar la cavidad abdominal antes de retirar la cánula. Las pequeñas heridas abdominales se pueden tratar con polvo antibiótico o aerosol antiséptico. Asegurarse que el animal no sangre antes de soltarlo. Después de cada inseminación el instrumental debe volver a la solución antiséptica para esterilizarlo. Si se reusan, en una misma sesión, las pipetas se deben limpiar y enjuagar con solución salina fisiológica (0,9%), manteniéndose a 30 °C en el baño de agua (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Después de terminada la intervención, si la cabra no ha sangrado, no es necesario cerrar los cortes de incisión; pero se aplica una inyección antibacterial para impedir una posible infección, luego se traslada al corral, para que se recupere. La tasa de preñez alcanzada con éste método es del 70 al 85 % aproximadamente (Durán, 2007).

3.11.4. Número de inseminaciones por estro

En condiciones de campo, las hembras solo se inseminan una vez por cada estro. Si se quiere aumentar la fertilidad se deben practicar dos inseminaciones por estro. El efecto de la doble inseminación varía según el tiempo de haber practicado la primera con relación a la ovulación (o momento de retirar la esponja). Para ovejas y cabras, con estro natural, el efecto de la doble inseminación es más manifiesto cuando la primera inseminación se practica al principio del estro, que cuando se hace en el medio o final de este. En la práctica, la doble inseminación previene de la posibilidad de que una inseminación se practique demasiado temprana, en relación con la ovulación. Para hembras con estro sincronizado, la doble inseminación se realiza 48 a 50 y 58 a 60 horas después de retirar el pesario. Cuando las hembras están en estro natural, la primera inseminación se realiza tan pronto como aparecen marcadas por los recelas o machos celadores y la segunda 8-12 horas después (Durán ,2007).

Se debe indicar que, en circunstancias particulares, el aumento (6 a 10%) de corderos o cabritos por inseminación doble no garantiza el esfuerzo extra que se realiza. Sin embargo, se recomienda la doble inseminación, en un estro, cuando se utiliza semen conservado o congelado y se emplea la inseminación cervical. Si se practica la inseminación intrauterina, la doble inseminación no está recomendada (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

3.12.- Manejo de las cabras después de inseminadas

El manejo de las ovejas y cabras una vez inseminadas no difiere, en líneas generales, del manejo normal para este tipo de animales. El conocimiento de los principios básicos de manejo, particularmente con respecto a la nutrición, sanidad y manejo durante la gestación, parto y lactancia están fuera del alcance de esta tesis (Evans y Maxwell, 1990).

3.12.1. Recruce de hembras que no conciben después de la inseminación

La proporción de hembras que conciben depende de varios factores, pero normalmente no excede del 75%. Sin embargo, las hembras que no conciben después de la inseminación pueden ser recruzadas en un estro próximo con el fin de aumentar el índice de corderaje o cabritaje. Esto es posible si el programa de inseminación artificial se realiza dentro de la estación reproductora. Las hembras en las que el estro y la ovulación han sido estimados artificialmente, fuera de la estación reproductora, normalmente no continúan cíclicas. Las hembras pueden cruzarse de nuevo bien por inseminación artificial o por monta natural, siendo preferible este último método dada su simplicidad y bajo costo (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

3.12.2. Diagnóstico de gestación

El diagnóstico de gestación es muy útil para el manejo del rebaño. Si se sabe que las hembras que no están preñadas se las puede separar para cruzarlas de nuevo. Las gestantes deben ir a los mejores pastizales (Evans y Maxwell, 1990).

Se emplean dos los métodos de campo para la detección temprana de preñez: la determinación del nivel de progesterona y el uso de equipos productores de ondas ultrasónicas. El primero se basa en el hecho de que la secreción de progesterona cesa en el animal vacío poco antes del celo (Pennington y colaboradores, 1982) y en que esta hormona se puede determinar en su leche, mediante una prueba relativamente sencilla (por medio de enzimas) un día antes al que se estima que el animal debería de entrar en celo. Si el nivel de progesterona es alto quiere decir que el animal tiene un cuerpo lúteo funcional y esta preñado; si es bajo, que no hay cuerpo lúteo y que, por lo tanto, esta vacía. La exactitud de esta prueba es de un 85 a 90%. A partir de la novena semana de gestación se puede usar, además, la reflexión de ondas de alta frecuencia del feto y sus envolturas. La prueba es sencilla, rápida y exacta, aunque la desventaja es que el equipo necesario es relativamente costoso (Vélez, 1993).

Aparte del indiscutible método de “vuelta al servicio” existen otros para diagnosticar la gestación en ovejas y cabras, en los que se incluyen la determinación de hormonas en sangre, las técnicas ultrasónicas y la laparoscopia. Alguno de los métodos de diagnóstico precisa conocer, con exactitud, la fecha de servicio. Por el momento no se dispone de un método barato y capaz de detectar la gestación antes de los 17 a 20 días. El diagnóstico de gestación no es muy utilizado en cabras y ovejas (Evans y Maxwell, 1990).

Cuando una cabra es montada o inseminada, se presume que en la fecha correspondiente al próximo celo debe ocurrir una de dos situaciones:

- a.- Si el celo regresa en forma normal o silente, se presume que la cabra esta vacía (no preñada).
- b.- Si el celo no regresa en forma normal o silente, se presume que la cabra esta cargada.

Lo anterior es regla generalizada y la esperanza de preñez así se conforma. Para validar esa esperanza de preñez, la medición de la resistencia eléctrica en el moco vaginal se comienza a medir a partir del día 18 pos celo. Si se observa que la resistencia eléctrica comienza a bajar, la preñez se descarta (la cabra esta vacía) y se comienza a preparar la nueva monta o inseminación. Por el contrario, si los valores de resistencia eléctrica en el moco vaginal no bajan, a partir de los 18 días pos monta o inseminación, se confirma que no hay preparativos de un nuevo celo; entonces son los mismos signos de una gestación en progreso (detección temprana de preñez) (Boschini, 2006).

Cuando la monta o inseminación se lleva a cabo en cabras con ciclos estrales irregulares, se debe tener en cuenta que la próxima fecha de celo es incierta. En estos casos, se requiere un monitoreo más constante. La historia de los celos anteriores va a marcar la pauta en la frecuencia de monitoreo. Si en un caso particular la historia es de ciclos cortos, el monitoreo debe iniciar más temprano; por el contrario, si la historia es de ciclos largos, el monitoreo se inicia a

los 18 días y se prolonga por al menos una semana (Boschini, 2006).

Según Durán (2007), el método del ultrasonido se basa en la pulsación de la arteria uterina media y por medio de sonidos de las pulsaciones del corazón del feto, después de 45 a 50 días de preñez. Otros síntomas observados son: Abultamiento del vientre, crecimiento de la ubre, tendencia a engordar y cambio de pelo, todos estos acompañados de una cierta calma y tranquilidad en el animal.

3.12.3. Manejo durante la gestación

La fertilización del óvulo ocurre en el oviducto. El embrión tarda unos tres o cuatro días en llegar al cuerno del útero, impulsado por las contracciones musculares de las paredes del oviducto. Allí y durante las primeras dos a tres semanas de vida en el útero, el embrión se nutre de las secreciones de las paredes, al tiempo que se desarrollan las membranas que lo envuelven: el corion, el amnios y el alantoides (Vélez, 1993).

El corion es la membrana exterior; en su superficie se forman nudosidades ricas en vasos sanguíneos (cotiledones) que se unen a la carúncula de los cuernos del útero. En esta unión hay difusión de nutrientes y desechos entre la madre y el feto, pero no intercambio de sangre. El amnios forma un saco que se llena de fluido en el cual flota el feto y queda protegido de golpes. El alantoides forma una cavidad entre las otras dos membranas, en la cual se deposita la orina del feto (Vélez, 1993).

La gestación en la cabra y la oveja dura unos 150 días, con una diferencia de uno o dos días según la raza y una variación normal que oscila entre 140 y 162 días; cuando se trata de gemelos se acorta, en promedio, medio día y cuando es de trillizos, en dos o tres días. Los animales gestantes se muestran tranquilos y tienen una mayor tendencia a depositar grasa. En las últimas seis semanas de gestación reducen la ingestión de alimentos (Vélez, 1993).

Como la inseminación artificial implica un considerable esfuerzo y tiempo, el

éxito de la operación no debería ser empañado por negligencia de las exigencias de las hembras gestantes. No obstante son inevitables algunas pérdidas de embriones y fetos. Pero la realidad es que con un manejo adecuado y si no hay factores ambientales adversos se pueden obtener buenos índices de nacimientos (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

El manejo básico de hembras en un programa de inseminación artificial es similar al de cría natural pero, como el tiempo de la inseminación se conoce con exactitud, el manejo se puede controlar mejor. Esto es todavía más cierto para las hembras que se han sincronizado y pueden ser tratados en grupos. Los procedimientos normales de manejo implican que los mejores pastos se reserven para las ovejas o cabras que estén al final de la gestación o lactación, cuando la demanda de nutrientes es más alta. Este hecho se debe considerar al planear un programa de inseminación artificial. También es muy importante que las hembras estén en muy buena condición corporal en el momento de la inseminación y al principio de la gestación (primer tercio) que es cuando se desarrolla la placenta.

Temperaturas adversas (40 a 45 °C) pueden afectar negativamente al desarrollo de la placenta y consecuentemente, al crecimiento del feto. Para evitar pérdidas embrionarias o fetales, por causas patológicas, se deben observar estrictamente todas las medidas profilácticas que se recomiendan para estas especies (Evans y Maxwell, 1990).

3.12.4. Manejo durante el parto

Varios son los síntomas de la proximidad del parto, donde la ubre se llena de calostro, los ligamentos y los músculos de la cadera y el anca se relajan, la vulva se nota hinchada y el tapón de moco que cierra la cérvix se disuelve, y el animal se muestra inquieto (Vélez, 1993).

El parto se inicia con la contracción de los músculos de las paredes del útero. Estos impulsan las membranas llenas de líquido (amnios y alantoides) contra la cérvix, la cual se dilata y por un acto reflejo, secreta el moco que la

lubrica. Luego se inician las contracciones de los músculos abdominales que expulsan al feto; por lo general, esta segunda fase demora en las cabras y las ovejas unos pocos minutos, aunque, cuando el parto es múltiple, puede haber intervalos de 5 a 10 minutos entre el nacimiento de cada una de las crías. La mayoría de los partos ocurren sin necesidad de la intervención del hombre. Sin embargo, una ayuda puede ser necesaria en los siguientes casos: Según Vélez (1993)

- a.- Cuando la presentación de la cría es anormal. Durante la gestación la cría flota generalmente de espaldas y unas horas antes del parto, rota a la posición normal; las patas anteriores primero. Una posición anormal se corrige introduciendo la mano previamente desinfectada por la vagina.
- b.- Cuando la presentación de la cría es normal pero es demasiado grande, o cuando la madre está débil. En este caso se agarra la cría de las manos y se hala al mismo ritmo de las contracciones de la madre.
- c.- Cuando falta dilatación de la cervix. En este caso la corrección se hace por medio de medicamentos o mediante cirugía (cesárea).
- d.- Cuando hay una torsión del útero a lo largo de su eje longitudinal.

Mientras la cría se encuentra en el vientre de la madre recibe oxígeno por el cordón umbilical; por ello, cualquier intervención, si bien debe ser rápida, no necesita ser precipitada. No se deben descuidar las normas de higiene (Vélez, 1993).

La placenta (envolturas fetales) es expulsada, por lo general, pocas horas después del parto. Si a las 12 horas no ha sido expulsada, se habla de una retención. Esta ocurre por la falta de separación en la unión entre las carúnculas y los cotiledones. Cuando la placenta no se desprende, la cervix permanece abierta, de manera que es posible introducir la mano y removerla suavemente. Después

de cualquier intervención es aconsejable colocar antibióticos en el útero para prevenir una posible infección (Vélez, 1993).

Cuando se conoce el momento de la inseminación se puede predecir la fecha del parto. La duración de la gestación, tanto en ovejas como en cabras, varía ligeramente con la raza, edad de la hembra y el número y sexo de los fetos. El promedio de duración de la gestación en la oveja es de 148 días y 149 en la cabra (extremos de 143 y 155 días) (Evans y Maxwell, 1990).

Cuando la inseminación sea sincronizada el manejo a la hora del parto es muy simple. Varios trabajos han demostrado que la supervisión del parto, en pequeños apartaderos, puede reducir, considerablemente (menos de un 3%), las pérdidas neonatales, pérdidas que se presentan durante o inmediatamente después del parto y que en condiciones normales pueden alcanzar un 20%. Los nacimientos sincronizados facilitan también la adopción de los animales huérfanos. Sin embargo, hay que advertir que los rebaños sincronizados son particularmente susceptibles a grandes pérdidas neonatales debido a las condiciones adversas climáticas que suelen coincidir cuanto mayor número de partos se presentan (Evans y Maxwell, 1990).

Cuando se conoce el momento de la inseminación y se ha confirmado la gestación, el parto puede adelantarse ligeramente o sincronizarse mediante la administración de fármacos y hormonas, justamente antes del tiempo teórico del alumbramiento. Esto suele ser útil en explotaciones intensivas, por ejemplo en Francia, aunque no sea práctica muy común (Evans y Maxwell, 1990).

3.14.- Factores que influyen en la fertilidad después de la inseminación

Cuando se compara la fertilidad de la oveja y la cabra después de utilizar inseminación artificial, con la monta natural se observa que en el último de los casos las hembras suelen ser montadas más de una vez, por diferentes machos, dentro de un mismo período estral. La comparación quizás sea imparcial si las hembras control solo son cruzadas una vez en un estro. No obstante, si

todas las condiciones para la inseminación artificial son favorables, la fertilidad después de la inseminación, generalmente, es similar a la de la monta natural en el rebaño (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

En un programa de inseminación artificial y si los animales están sanos y libres de anomalías en su aparato genital hay un número de factores que pueden influenciar notablemente los resultados. Los más importantes son los siguientes: Según Evans y Maxwell (1990).

a.- Número de espermatozoides.

Un número de espermatozoides viable y normal por debajo del límite mínimo afecta a la fertilidad. El número necesario varía según el estado de conservación (fresco, refrigerado, congelado) y el lugar de la inseminación.

b.- Método y técnica de inseminación.

La fertilidad varía según el método de inseminación. La inseminación intrauterina (por laparoscopia en la oveja y por vía cervical en la cabra) proporciona mejores resultados que la inseminación cervical o vaginal, particularmente si se usa semen congelado. Para la inseminación vaginal solamente se debe utilizar semen fresco y las hembras no deberán ser tratadas con fármacos, "sincronizarse". Al aumentar la profundidad de la inseminación se mejora la fertilidad.

c.- Tiempo de la inseminación.

La inseminación practicada demasiado temprano o demasiado tarde, en relación al momento de la ovulación, altera la fertilidad. El tiempo de la inseminación es mucho más crítico cuando se utiliza semen refrigerado o congelado que cuando se utiliza fresco, dado que los espermatozoides conservados tienen un período de viabilidad más corto en el aparato reproductor de la hembra. Las hembras con estros cortos suelen tener menor fertilidad.

d.- Tipo de estro (natural o controlado).

La fertilidad de la oveja, después de la inseminación cervical, es, a menudo, más baja cuando se ha sincronizado el estro, por fármacos, aun cuando este problema se puede sopesar utilizando gonadotropinas exógenas o inseminación intrauterina. En las cabras existe muy poca influencia de la sincronización sobre la fertilidad. El tipo y nivel de tratamiento con fármacos puede afectar a la fertilidad.

e.- Edad de las hembras.

Generalmente, la fertilidad es más baja en las hembras jóvenes o primíparas que en los animales maduros.

f.- Momento de la inseminación.

La fertilidad suele ser más baja cuando los animales se inseminan fuera de la estación reproductora.

g.- Factores estresantes.

La poca atención o un manejo inadecuado de las hembras en el momento de la inseminación o en el período de establecerse la gestación afecta la fertilidad.

h.- Mortalidad embrionaria y fetal.

El estrés ambiental o nutricional, o las enfermedades, durante la gestación pueden afectar a la mortalidad embrionaria o fetal. La insuficiencia de placenta o, en las cabras principalmente, el fallo del cuerpo lúteo de la gestación puede producir aborto.

i.- Higiene.

El manejo descuidado o la contaminación del equipo pueden reducir, notablemente, la viabilidad de los espermatozoides o propagar las enfermedades del aparato reproductor.

Es importante señalar que cuando se obtenga resultados no esperados es muy probable que la causa sea la propia tecnología de la inseminación artificial;

los fallos se pueden encontrar, casi con toda certeza, en (i) aplicación impropia de la tecnología, (ii) manejo inapropiado, o (iii) factores ambientales (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

3.15.- Registro de datos reproductivos

Para conocer el valor y el resultado de la técnica es necesario el registro de datos en cualquier programa de inseminación artificial. En el momento de la inseminación se debe registrar las características del semen de cada semental, así como de las hembras inseminadas. Estos datos pueden compararse con los de nacimiento y tener, así, una idea de la capacidad de los sementales individualmente. Los registros de nacimientos se pueden obtener por grupos de hembras o, en el caso de la oveja y la cabra, por individuos aislados. Estos registros se deben hacer inmediatamente después de los partos, ya que las demoras en la elaboración de los registros conducen a olvidos y a las posibles pérdidas de recién nacidos desde el nacimiento hasta el momento de anotar el registro y que pueden ser debido a variaciones climáticas u otras que nada tienen que ver con el programa de inseminación artificial. Los registros se pueden hacer en el momento del parto, si se supervisa este 7 a 10 días después para permitir el acoplamiento entre madres y recién nacidos. Téngase en cuenta que la identificación de corderos o cabritos, en un grupo de ellos, es muy difícil a posteriori del parto, con lo que es más sencillo supervisar este o mantener a las hembras gestantes confinadas hasta el parto (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Además de los registros de los animales, debe llevarse un control de la producción agrícola y del consumo de alimentos (concentrados, y en el caso de la estabulación heno, ensilaje u otro forraje). En este control debe llevarse preferencia en tarjetas individuales que permitan su clasificación sin mayores dificultades (Vélez, 1993).

En algunos países, las asociaciones de criadores o los ministerios de agricultura, supervisan los registros mediante inspectores que anotan oficialmente

la producción de cada animal; en el caso de los animales lecheros, toman muestras para análisis de grasa y proteína (Vélez, 1993).

El registro de los animales, independientemente de que sea realizado por el ganadero o por una institución ajena a la empresa, debe contener la siguiente información:

- a.- Identificación del animal, fecha de nacimiento y ancestros, preferiblemente incluyendo los abuelos.
- b.- Producción. En el caso de animales lecheros, producción mensual de leche, grasa, proteína y producción por lactación. En animales para lana, controlar el peso de la misma después de cada esquila, y en animales para carne los pesos, por lo menos al momento de nacimiento, destete y la venta.
- c.- Reproducción, incluyendo fechas de parto, celos post-parto y servicios.
- d.- Sanidad, incluyendo vacunaciones y tratamientos, en especial aquellos problemas que puedan afectar la producción.

De los registros de cada animal se deben extraer los datos necesarios para su adecuado manejo rutinario. Cuando el rebaño es pequeño, esta tarea puede hacerse fácilmente a mano. En rebaños grandes, el uso de una computadora y de un programa de manejo de hatos facilita el trabajo; su costo se cubre rápidamente al facilitar la toma de decisiones más exactas y oportunas (Vélez, 1993).

En los países similares a Australia, donde las ovejas y cabras se mantienen pastando en grandes superficies, durante todo el año, el registro de los nacimientos puede ser dificultoso. Las hembras paridas se pueden identificar examinando las ubres, presencia de leche o por algún otro signo, lo que se puede hacer rápidamente en un recinto adecuado y deberá realizarse no más de 160 días después de practicada la inseminación. Cuando se realiza correctamente

este método proporciona unos datos reales sobre las hembras que paren, pero, desde luego, no de las que no paren y una información valiosa sobre el número de corderos o cabritos nacidos (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

El camino más adecuado para expresar los resultados de un programa de inseminación artificial es el conocer el porcentaje de hembras que parieron sobre el total de inseminadas (Vélez y Maxwell, 1990).

Cuando se registre el número de recién nacidos, en el momento del parto, se puede calcular también el porcentaje de corderos o cabritos nacidos del número de ovejas o cabras paridas, lo que nos informara a la vez del número de partos dobles o múltiples. En algunos lugares el porcentaje de corderaje/cabritaje se define como el número de corderos o cabritos nacidos del número total de hembras del grupo. Algunos ejemplos de cálculos son los siguientes:

Porcentaje de corderaje/cabritaje (hembras que paren con relación a las inseminadas):

Número de hembras inseminadas = 800

Número de hembras que paren = 568

Porcentaje de corderaje/cabritaje = $568 / 800 * 100 = 71,0\%$

Porcentaje de corderaje/cabritaje (corderos/cabritos nacidos de hembras inseminadas):

Número de hembras inseminadas = 800

Número de corderos/cabritos nacidos = 650

Porcentaje de corderos/cabritos = $650 / 800 * 100 = 81,3\%$

Partos múltiples (o gemelares) (corderos/cabritos nacidos de hembras que paren):

Número de hembras que paren = 568

Número de corderos/cabritos nacidos = 650

Porcentaje de corderos/cabritos nacidos = $650 / 568 * 100 = 114,4\%$

3.16.- Equipo requerido en el laboratorio de inseminación artificial

Según Boschini (2006) los implementos necesarios para inseminación artificial son los siguientes:

- a.- Caja de herramientas: De acero inoxidable o plástico resistente, para guardar y transportar el equipo y los materiales de inseminación. Se debe mantener su interior totalmente aséptico.
- b.- Espéculo: Es un tubo de vidrio, plástico acrílico o PVC (opaco) de 1,5 o 2 cm de diámetro por 20 cm de largo, con los bordes romos. El lado frontal puede ser recto o inclinado. Puede tener luz incorporada (tipo Jorgensen®) o no.
- c.- Fuente de luz: Se requiere una fuente de luz para ver a través del especulo, como un foco liviano o una linterna tubular de 0,5 cm de diámetro por 15 cm de largo. Es recomendable tener un parque de baterías y bulbos incandescentes.
- d.- Pistola de inseminación: Es un instrumento largo de 30 a 35 cm de largo, cilíndrico (una pipeta) y una varilla (embolo) en su interior, ambos de acero inoxidable y con un aro en uno de los extremos para la manipulación manual. En el interior del cilindro se coloca la pajilla de semen y con el embolo se descarga. Externamente tiene un anillo para sostener las fundas.
- e.- Fundas desechables: Son plásticas. Se utilizan para enfundar la pistola de inseminación por un extremo y sostiene la pajilla de semen dentro de la pistola. En éste extremo tiene un pequeño agujero, por donde fluye el contenido de la pajilla de semen.
- f.- Cortador de pajillas: Es un aparato que sirve para abrir un extremo de las pajillas que contiene el semen. Las pajillas se colocan en un agujero y con

un pequeño manubrio se baja una cuchilla transversalmente, cortando el extremo de la pajilla.

- g.- Termo liviano y termómetro: Un termo para un litro de agua caliente. Un termómetro para medir temperaturas entre 0 y 50 °C. Los termómetros digitales son muy fáciles de leer, y deben cuidarse de los golpes para que no se descalibren.
- h.- Pinzas de punta curva: Una pinza de 15 cm de largo, con la punta curva, preferiblemente de plástico. Se utiliza para tomar la pajilla de semen al sacarla del tanque de almacenamiento de semen. También se usa para introducir y extraer la pajilla del terno de agua caliente durante el descongelamiento.
- i.- Utensilios de limpieza: Para la limpieza de los espejos, se requieren hisopos con el calibre de cerdas apropiado. El lavado de los instrumentos se hace con abundante agua y solución antiséptica, que no produzca espuma; se secan con papel toalla. Para lubricar la punta del espejo, se recomienda emplear sustancias gelatinosas (geles) solubles en agua; que no sean espermaticidas.

Para el lavado de los instrumentos, no usar jabones o detergentes. Sin embargo antes y después de tocar los instrumentos y materiales de inseminación, debe lavarse las manos con jabón detergente líquido de poca espuma (Boschini, 2006).

Principales suplidores internacionales de equipos y materiales son:

- a.- Caprine Supply. [http://www. caprinesupply.com](http://www.caprinesupply.com)
- b.- Hoegger Supply Co. [http://www. hoeggergoatsupply.com](http://www.hoeggergoatsupply.com)
- c.- Nasco. [http://www. enasco.com](http://www.enasco.com)
- d.- North East Caprine Cooperative. <http://www.hroldlbt@ix.netcom.com>

3.17.- Normas de limpieza e inocuidad de equipo y materiales

Todo el instrumental utilizado para la recogida y manejo del semen así como para la inseminación deberá ser cuidadosamente limpiado y esterilizado. Un equipo sucio puede ser muy dañino para un programa de inseminación artificial (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Para el lavado se debe utilizar agua corriente o de lluvia, usando, a la vez, un detergente líquido para material de laboratorio diluido en agua. Los detergentes de cocina solo se deben utilizar en caso de emergencia y en caso de utilizarlo el material se enjuagará mucho más. Es muy conveniente dejar 1 a 2 horas el instrumental sumergido en la solución con detergente antes de limpiarlo. También es importante que parte del equipo como vaginas artificiales, tubos colectores y pipetas se sumerjan en agua o detergente inmediatamente después de utilizados para evitar la adherencia de posibles contaminantes (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Para limpiar el equipo que tenga superficies expuestas se deben utilizar escobillas de tamaño apropiado con solución detergente en agua caliente. Las pipetas se deben remojar antes de lavarlas varias veces con agua caliente. Después de que está bien lavado, el equipo se debe aclarar adecuadamente para evitar que quede restos de detergente, primero con agua corriente y luego con agua destilada. Después se debe sacudir cada material para eliminar el exceso de agua y a continuación secarlo en estufa o secador de aire (Durán, 2007).

La esterilización del equipo es esencial. El material de vidrio se puede esterilizar por calor, contenido en una estufa de acero inoxidable, a una temperatura no inferior a 105 °C durante por lo menos una hora. Los instrumentos se pueden dejar en esa estufa, que estará sellada hasta el momento de su uso. Alternativamente, cada elemento se puede envolver en láminas de papel aluminio (antes de la esterilización); este método es el más recomendado para las pipetas de vidrio, las de plástico o se esterilizan sumergiéndolas en alcohol de 70°, durante por lo menos una hora. Al cabo de este tiempo se dejan al aire para que

se evapore el alcohol y se envuelven como las otras. Antes de utilizarlas se deben enjuagar con solución salina isotónica, para arrastrar los posibles restos de alcohol (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

El protector externo de la vagina artificial no precisa de esterilización después de su lavado. Sin embargo, la parte interna se debe lavar, enjuagar, secar y esterilizar con alcohol de 70° antes de usarla (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Ritar, 1982).

Se debe poner especial atención cuando se limpie y esterilice el material durante su uso, por ejemplo, el espéculo y las pipetas de inseminar durante la inseminación. El espéculo se debe limpiar con una gasa empapada en alcohol de 70° cuidando de que este muy seco antes de volverlo a utilizar. No se recomienda esterilizar las pipetas entre cada inseminación ante el riesgo que supone el que los restos de desinfectante puedan alterar la viabilidad de los espermatozoides en la siguiente inseminación, solo se deben limpiar con algodón o papel toalla y retirar de su uso si se sospecha que estén contaminadas. Con el fin de proteger el instrumental limpio del polvo, insectos u otros contaminantes, se debe guardar en armarios limpios o en lugares adecuados (Vélez, 1993).

3.18.- Condiciones sanitarias aplicables a los centros de inseminación artificial e instalaciones de toma de semen y laboratorio

Según Código sanitario para los animales terrestres (2007)

a.- Condiciones aplicables a los centros de inseminación artificial

El comprenderá:

- i.- Espacios de alojamiento de los animales (incluido un espacio destinado al aislamiento de animales enfermos) y un local de toma de semen, globalmente denominados a continuación “instalaciones de toma de semen”; los espacios de alojamiento serán distintos para cada especie siempre que proceda.

- ii.- Laboratorio de tratamiento del semen y locales de conservación del semen.
- iii.- Locales administrativos.
- iv.- El centro puede incluir una estación de cuarentena a condición que debe estar situado en un lugar distinto de las instalaciones precitadas.
- v.- El centro deberá estar oficialmente autorizado por la Autoridad Veterinaria.
- vi.- El centro deberá ser supervisado y controlado por los Servicios Veterinarios, los cuales verificarán, por lo menos cada 6 meses, los protocolos, procedimientos y registros prescritos en relación con la salud y el bienestar de los animales alojados en el centro, así como con la producción, conservación y expedición del semen en condiciones higiénicas.
- vii.- El centro deberá funcionar bajo la supervisión y el control directo de un veterinario designado por el centro de inseminación artificial y acreditado por la autoridad veterinaria correspondiente, para el ejercicio de las funciones oficiales pertinentes.

b.- Condiciones aplicables a las instalaciones de la toma de semen

- i.- Las instalaciones de toma de semen comprenderán locales separados y distintos para el alojamiento de los animales residentes, la toma de semen, el almacenamiento de alimentos, el depósito de estiércol y el aislamiento de animales que se sospeche que estén infectados.
- ii.- Sólo se permitirá que ingresen en las instalaciones de toma de semen los animales asociados a la producción de semen. En el centro podrán residir animales de otras especies que sean necesarios para el traslado o la manipulación de los reproductores donantes y animales excitadores o para la seguridad del centro, pero sus contactos con los reproductores donantes y animales excitadores deberán ser lo menos frecuentes posible. Todos los

animales que residan en las instalaciones de toma de semen deberán cumplir los requisitos sanitarios mínimos que se exigen de los reproductores donantes.

- iii.- Los reproductores donantes y animales excitadores presentes en las instalaciones de toma de semen deberán estar debidamente aislados de los animales de granja y demás animales para evitar la transmisión de enfermedades. Se tomarán medidas para impedir la entrada de animales salvajes susceptibles a las enfermedades de los rumiantes transmisibles por el semen inscritas en la lista de la OIE.(Organismo Internacional de Epizootias).
- iv.- El personal del centro deberá ser técnicamente competente y observar normas estrictas de higiene personal para evitar la introducción de gérmenes patógenos. El centro suministrará al personal ropa de protección y botas para uso exclusivo y permanente dentro de las instalaciones de toma de semen.
- v.- Se reducirá al mínimo el número de personas que accedan a las instalaciones de toma de semen y su acceso estará sujeto a autorización y control oficial. El material necesario para el cuidado de los animales deberá estar exclusivamente destinado a las instalaciones de toma de semen o ser desinfectado antes de ser introducido en dichas instalaciones. Todo el material y todas las herramientas que se introduzcan en los locales deberán ser examinados y sometidos, si es necesario, a un tratamiento que garantice que no transmitirán ninguna enfermedad.
- vi.- Se prohibirá la entrada en las instalaciones de toma de semen de los camiones y vehículos utilizados para el transporte de los animales.
- vii.- El local de toma de semen se limpiará todos los días después de las tomas de semen. Los espacios de alojamiento y el local de toma de semen se limpiarán y desinfectarán una vez al año por lo menos.

viii.- Las operaciones de introducción de forraje y de remoción del estiércol deberán llevarse a cabo de manera que no entrañen ningún riesgo para la salud de los animales.

c.- Condiciones aplicables a los laboratorios de tratamiento del semen

i.- El laboratorio de tratamiento del semen deberá estar físicamente separado de las instalaciones de toma de semen y comprender espacios separados para la limpieza y preparación de la vagina artificial, el control y tratamiento del semen y la conservación previa y definitiva del mismo. Se prohibirá el acceso al laboratorio al personal no autorizado.

ii.- El personal del laboratorio deberá ser técnicamente competente y observar normas estrictas de higiene personal para evitar la introducción de gérmenes patógenos durante el control, el tratamiento y la conservación del semen.

iii.- Se reducirá al mínimo el número de personas que accedan al laboratorio y su acceso estará sujeto a autorización y control oficial.

iv.- El laboratorio deberá estar construido con materiales que permitan una limpieza y una desinfección eficaces.

v.- El laboratorio se limpiará con regularidad. Las superficies de trabajo para control y tratamiento del semen se limpiarán y desinfectarán al final de cada jornada.

vi.- El laboratorio será tratado contra roedores e insectos con la frecuencia que requiera el control de estos animales dañinos.

vii.- Los contenedores y locales de almacenamiento del semen deberán ser fáciles de limpiar y desinfectar.

viii.- En el laboratorio se tratará únicamente semen de reproductores donantes cuyo estado de salud sea igual o mejor que el de los reproductores donantes de las instalaciones de toma de semen.

3.19.- Condiciones aplicables a los controles sanitarios de los moruecos, machos cabríos y animales excitadores

Sólo podrán ingresar en el centro de inseminación artificial los moruecos, machos cabríos y animales excitadores que cumplan con los requisitos siguientes:

a.- Controles sanitarios antes de la cuarentena

Los animales deberán reunir las siguientes condiciones antes de ser aislados en la estación de cuarentena y no deberán haber manifestado signos clínicos de estas enfermedades durante los 2 últimos años.

i.- Brucelosis caprina y ovina

ii.- Epididimitis ovina

iii.- Agalaxia contagiosa

iv.- Peste de pequeños rumiantes

v.- Pleuroneumonía contagiosa caprina

vi.- Paratuberculosis

vii.-Prurigo lumbar

viii.- Maedi-visna

ix.- Artritis/encefalitis caprina

x.- Lengua azul

xi.- Tuberculosis

xii.- Enfermedad de frontera

b.- Controles sanitarios en la estación de cuarentena antes de entrar en las instalaciones de toma de semen

Antes de entrar en las instalaciones de toma de semen del centro de inseminación artificial, los moruecos, machos cabríos y animales excitadores deberán permanecer en una estación de cuarentena durante, por lo menos 28 días. Todos los animales deberán ser sometidos a las pruebas de diagnóstico descritas a continuación, como mínimo 21 días después de haber ingresado en la estación de cuarentena, y los resultados deberán ser negativos:

i.- Brucelosis caprina y ovina

ii.- Epididimitis ovina

iii.- Maedi-visna o artritis/encefalitis caprina

iv.- Lengua azul

c.- Controles sanitarios de los moruecos, machos cabríos y animales excitadores que residen en las instalaciones de toma de semen

Todos los moruecos, machos cabríos y animales excitadores que residan en las instalaciones de toma de semen deberán ser sometidos una vez al año por lo menos a pruebas de detección de las siguientes enfermedades, si su país de origen no está libre de ellas, y dar un resultado negativo a:

i.- Brucelosis caprina.

ii.- Artritis/encefalitis caprina (CAE).

iii.- Tuberculosis bovina.

iv.- Lengua azul.

v.- Pleuroneumonía contagiosa caprina.

vi.- Paratuberculosis.

vii.- Agalaxia contagiosa.

viii.- Clamidiosis ovina.

ix.- Prúrigo lumbar.

x.- Leptospirosis.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Material Biológico

4.1.1.- Machos reproductores

Fueron seleccionados para este estudio 12 machos cabríos, 3 de la raza Saanen, 2 de la raza Toggenburg y 7 de la raza LaMancha, los cuales pertenecen a la Estación Experimental Alfredo Volio de la Universidad de Costa Rica y al productor Federico Cantillo Malavassi. La edad media del grupo fue de año y medio, los cuales tuvieron un entrenamiento de cabestreo y monta previa durante 3 meses a la extracción de semen.

Los machos fueron mantenidos en régimen de estabulación, con alimentación homogénea durante todo el año: Pienso fresco de Estrella Africana, concentrado (750 g/animal/día), pasto de corta King grass, Taiwán y Morera aproximadamente (750 g/animal/día), bloques de minerales, oligoelementos y agua a libre disposición a lo largo de todo el experimento.

4.1.2.- Huevos de gallina

Se utilizó como crioprotector no penetrante yema de huevo de gallina, con no más de 3 a 4 días desde la puesta hasta el momento de su utilización, siendo este tiempo variable de la estación del año. La calidad de la yema de huevo varió en función de la raza y de la alimentación de las gallinas.

4.2.- Material empleado en la recolección del semen

- a.- Se usó una funda protectora para vagina artificial con un caparazón externo (15 cm de largo por 5,5 cm de diámetro) con insuflador de aire y un "innerliner o camisa interna" de goma para vagina artificial de cabra. Para unir la parte interna con la externa de la vagina se emplearon bandas o

ligas de goma, así como un tubo cónico de goma intermedio entre la vagina artificial y el tubo colector de semen de 15 ml.

- b.- Un potro o plataforma de sujeción de la hembra maniquí.
- c.- Como material de limpieza se usaron tijeras para recortar pelos prepuciales, paños y jabón.

4.3.- Materiales y equipos empleados en la conservación del semen

- a. Baño María con termómetro, graduado a 30 °C.
- b. Gradillas para colocar los tubos cónicos en baño María.
- c. Microscopio con fuente de luz y bombilla de recambio.
- d. Portas y cubres, para colocar las muestras de semen.
- e. Pipetas tipo Pasteur limpias (estériles) y tetinas.
- f. Hemocitómetro o cámara de Neubauer completa con cubre objetos especial y pipeta tipo Sally con bola roja y boquilla, además solución salina al 10%.
- g. Espermodensímetro de Karras o colorímetro completo, con pipeta graduada en 0,1 ml así como densímetro de 9,0 ml y el cuadro de valores para determinar la concentración.
- h. Colorantes o tintes para los espermatozoides (eosina-nigrosina).
- i. pHmetro, tiras colorantes.
- j. Portaobjetos con bisel para correr tinciones.
- k. Papel de parafina.
- l. Pajillas de 0,5 y 0,25 ml.
- m. Viales con tapa de 1,8 ml para refrigerar semen.
- n. Rampa horizontal de acero inoxidable para colocar pajillas en hielera de polietileno.
- o. Hielera de polietileno para climatizar el semen contenido en las pajillas.
- p. Pinzas con muesca para pajillas.
- q. Secador de pelo para secado de equipo y vagina artificial.
- r. Refrigerador doméstico con congelador y cabina fría para graduar a 15 y 5 °C.

- s. Recipientes criogénicos para almacenamiento de pajillas en los tanques de nitrógeno líquido.
- t. Tanques de nitrógeno líquido.
- u. Contenedor de tanque de nitrógeno graduable, especial para realizar trasvase de nitrógeno líquido.

4.4.- Materiales y reactivos utilizados en la dilución del semen

- a. Ingredientes para hacer reactivos (fructosa, ácido cítrico, tris-(hidroximetil) aminometano, agua bidestilada y glicerol).
- b. Alcohol polivinílico (PVA) parcialmente hidrolizado, para sellar pajillas.
- c. Balanza analítica para pesar los ingredientes.
- d. Probetas de capacidad adecuada (25, 50 y 100 ml).
- e. Erlenmeyer de 50 y 100 ml
- f. Beaker de 50, 100 y 250 ml.
- g. Papel filtro circular, diámetro de 9 y 11 cm.
- h. Pipetas graduadas de vidrio (0,5, 1, 2, 5 y 10 ml).
- i. Tubos de ensayo de vidrio.
- j. Soportes de estereofón para colocar raquetas con pajillas y realizar trasvases o llenado de canastas o “globelets” con pajillas.
- k. Raquetas para dos “globelets”.
- l. Canastas o “globelets” para 5 pajillas.
- m. Embudo de acero inoxidable grande para realizar trasvases o llenados de tanques de nitrógeno líquido.

4.5.- Método

4.5.1.- Obtención y valoración seminal

Se seleccionaron 10 machos cabríos en base a la libido y características seminales (volumen eyaculado, color y consistencia, movimiento masal, % motilidad, concentración (millones/mm³), % vivos y morfoanomalías).

El semen fue obtenido mediante vagina artificial, utilizando una hembra maniquí (en estado de estro generalmente) como estímulo sexual. Los machos cabríos fueron sometidos a un régimen sexual de extracción de dos a tres recogidas semanales, obteniéndose tres eyaculados por extracción.

Los machos cabríos fueron sometidos a un régimen de entrenamiento, primero cabestreando los animales durante un mes consecutivo a razón de dos veces por semana, para conocer su temperamento y cualquier anomalía física del animal. Luego se realizó la etapa de palpación y limpieza de los testículos, epidídimos, conductos y pene generalmente. Esto para poder diagnosticar cualquier problema reproductivo y verificar el estado externo del aparato reproductor, más que todo determinado por manifestación de un dolor en la zona palpada, herida o golpe.

La etapa de limpieza fue realizada cada vez que se hizo recolección seminal de cualquier animal, se recortaron los pelos prepusiales y la zona lavada con jabón antibacterial y abundante agua limpia. De esta forma se estimuló al animal para el momento de la monta. Luego de esto se secó con paño limpio adicional al efecto secante del aire libre. El macho cabrío listo para la etapa de recolección de semen.

Tras la recolección del semen, se procedió al traslado del mismo, depositado en la copa recolectora graduada, al laboratorio mediante el cobertor de la vagina artificial, para evitar el contacto directo de la luz y cambios bruscos de temperatura.

En el laboratorio se determinó de manera rutinaria las características más significativas de evaluación del semen como: volumen, color, consistencia, pH, movimiento masal, % motilidad, concentración espermática expresada en millones/mm³ así como % de vivos y diluyente utilizado en cada caso. Anotándose cada vez que se obtenía una muestra de semen en la libreta de extracción donde se le lleva un seguimiento a cada individuo.

a- Volumen y Aspecto físico.

El volumen se evaluó visualmente en la misma copa recolectora graduada

donde fue recogido. Junto a este parámetro se observaron posibles irregularidades en cuanto a color, consistencia, olor y aspecto que pudiera presentar algún eyaculado.

b- Color y consistencia.

El color fue evaluado y se caracterizó esta cualidad del semen, en forma proporcional a la concentración del mismo, la consistencia y el color se dio en un rango de cremosa espesa a lechosa o líquida con coloración amarillenta y blanco grisáceo.

c- pH.

Se tomó medida del pH mediante un indicador de tiras reactivas que cambian de color según su reacción.

d- Movimiento masal.

Se evaluó el movimiento masal según la clasificación gradual en escala de 0 a 5, se valoró la formación y progresión de ondas de movimiento, producidas por la masa espermática en movimiento, correlacionándose su motilidad con el porcentaje de espermias vivos, así como calidad de movimiento: Sea progresivo, circular o rotatorio y rectilíneo.

e- % Motilidad.

Se estimó el porcentaje de espermatozoides vivos y en movimiento adecuado para las muestras de semen, analizándose el porcentaje visualmente, en valores enteros como 70% o 70%+ si refería a un poco más de movimiento y viabilidad que su valor anterior.

f- Concentración espermática.

La concentración espermática se realizó utilizando dos métodos de conteo, el conteo directo por cámara de Neubauer o hemocitómetro y el de densidad óptica mediante espermodensímetro utilizando una cámara de Karras como medio

para obtener un valor de concentración, la cual fue expresada en millones de espermatozoides por milímetro cúbico.

g- % Vivos.

El % de espermatozoides vivos se tomó en relación al parámetro de motilidad, caracterizándose óptimamente el porcentaje aproximado de espermatozoides muertos o flotantes y mediante tinción de los mismos en eosina-nigrosina.

h- Diluyente.

Para los casos en que se realizaron las pruebas de dilución y conservación espermática se procedió a anotar el respectivo diluyente utilizado para cada ocasión.

De manera periódica se realizaron otras mediciones de la calidad seminal de los machos cabríos como: morfoanomalías, % vivos y termo resistencia.

4.5.2.- Diluyentes empleados y método de preparación

Se partió de las soluciones comercialmente preparadas para su uso, en este caso:

α.- Triladyl®

Es un concentrado estéril para la preparación de un diluyente con yema de huevo, para la congelación de semen bovino en un solo paso, además se presta para la congelación de semen de otros rumiantes por ejemplo caprino, ovino y ciervo etc.

a. Composición:

- i. TRIS-(hidroximetil) aminometano
- ii. Ácido cítrico
- iii. Azúcar

- iv. Tampones
- v. Glicerina
- vi. Antibióticos
- vii. Agua de extrema pureza.

b. 100 ml del diluyente preparado contiene:

- i. Tilosina 5 mg
- ii. Gentamicina 25 mg
- iii. Espectinomicina 30 mg
- iv. Lincomicina 15 mg

c. Forma de presentación

Cada frasco de Triladyl® contiene 250 g de concentrado para la preparación de 1250 ml de diluyente listo para su utilización.

d. Para la preparación del diluyente se requiere de:

- i. Triladyl® concentrado
- ii. Agua pura estéril
- iii. Yema de huevo fresca
- iv. Probeta graduada estéril o matraz de erlenmeyer
- v. Papel filtro estéril
- vi. Filtro—embudos estériles

El diluyente listo se compone de una parte de concentrado de Triladyl®, tres partes de agua pura estéril y de una parte de yema de huevo, lo que equivale al 20% de su volumen final.

La solución madre se prepara vertiendo primero un frasco completo de Triladyl® concentrado (250g) en un matraz graduado, y agregando en varios pasos 750 ml de agua pura estéril. Esta solución madre es estable y puede mantenerse a 5 °C por alrededor de una semana.

Para completar el diluyente, deben agregarse a la solución madre 250 ml de yema de huevo fresca. Es posible pesar 250 g de yema de huevo, por cuanto el volumen y peso son equivalentes. Se puede esterilizar la cáscara del huevo pasándola por una llama o lavados con agua y jabón y luego con alcohol, en seguida se parten los huevos cuidadosamente, tratando de separar la yema de la clara, vertiendo la yema, sin romperla, de una a otra mitad de la cáscara. Para liberar completamente la yema de la clara y las membranas, se coloca la yema sobre papel de filtro, haciéndolas rodar sobre el papel, que retiene los restos. Finalmente, la yema de huevo se posiciona en el borde del papel filtro, se envuelve en éste y se presiona para abrir la membrana de tal forma que el contenido de la yema escurra libremente, dejando adherida la membrana al papel.

Enseguida, se le agrega a la yema lentamente la solución madre, mezclándola con un agitador magnético o una varilla de vidrio estéril. La observación estricta de este orden es de importancia para permitir el total desarrollo de las cualidades de conservación del Triladyl®. Se debe agregar la solución madre a la yema, no al revés.

Para terminar, el diluyente preparado debe pasarse a través de un filtro colocado sobre un embudo estéril o una gasa estéril, con lo que queda listo para su utilización.

La condición del agua es muy importante y es posible prepararla mediante destilación, desionización, osmosis inversa, o mediante una combinación de los métodos mencionados, y eventualmente esterilizada adicionalmente.

e. El agua purificada debe tener las siguientes características:

- i. Conductibilidad baja 1 Ms/cm
- ii. Contenido de gérmenes bajo 1 CFU (unidades que forman colonias) por 10 ml
- iii. TCO (total carbón orgánico) bajo 50 ppb.
- iv. Especial atención requiere el posible ingreso de gérmenes en agua previamente preparada, por ejemplo por mangueras no estériles, conductos o

envases de almacenamiento. Si no se dispone de un equipo de preparación de agua, debe recurrirse a la adquisición de agua bidestilada estéril de un fabricante confiable. El agua desalinizada para baterías o de uso doméstico no es adecuado.

f. Recomendaciones técnicas

Después de colectar el semen, el eyaculado es mantenido en un baño maría de 28 a 30 °C. Una vez evaluado mediante examen macroscópico y microscópico, se prediluye el semen en una proporción de 1:1 en el mismo vaso colector, dejando escurrir lentamente el diluyente a lo largo de la pared del vaso. Una vez calculada la dilución final, el semen prediluido es vertido cuidadosamente, a lo largo de su pared, a un envase temperado de mayor tamaño, agregando a continuación el volumen de diluyente aun requerido. Es conveniente agitar el envase durante la dilución, para lograr una adecuada mezcla del semen con el diluyente. Recomendamos el uso de una balanza electrónica o del sistema “Smart Dispenser” en vez de utilizar envases graduados para medir volumen, por ganar precisión en el proceso. Es muy importante que el semen, el diluyente y los envases de vidrio tengan siempre igual temperatura, para evitar el “choque” térmico del semen.

Después de la predilución, el semen puede ser retirado del baño maría, continuando el procesamiento a temperatura ambiente de laboratorio. El envasado en pajuelas se hace a temperatura ambiente.

g. Congelación de las pajuelas

La congelación de las pajuelas se efectúa sobre rampas posicionadas horizontalmente a 4 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido (N₂), o en un equipo congelador profesional con una temperatura de inicio de -120 °C. El tiempo de congelación debe extenderse para pajuelas de 0,25 ml a un mínimo de 7 minutos, para pajuelas medianas de 0,5 ml a un mínimo de 10 minutos. Luego las pajuelas son inmediatamente sumergidas en nitrógeno líquido.

h. Aplicaciones especiales.

La preparación del diluyente de congelación de semen caprino, requiere de una cantidad menor de yema de huevo, en comparación con el diluyente descrito para semen bovino y ovino. Se usa solo un 2% de yema, lo que equivale a 25 ml de yema. Las cantidades de concentrado de Triladyl® y de agua bidestilada permanecen iguales: 250 g y 750 ml respectivamente. El grado de dilución recomendado para semen caprino es de 5 a 7:1 (diluyente: semen).

i. Almacenamiento, estabilidad e indicaciones.

El concentrado debe ser almacenado en refrigeración a 5 °C. La etiqueta tiene la fecha mínima de utilización recomendada impresa. Restos de diluyente preparado y calentado pueden guardarse hasta dos días en refrigeración. La solución madre no calentada puede mantenerse a 5 °C por alrededor de una semana.

b.- AndroMed®

Es un concentrado estéril para la preparación de un diluyente libre de yema de huevo, es apropiado para la congelación del semen y para la conservación en fresco, se utiliza para semen caprino, ovino, y ciervo. Su contenido en antibiótico corresponde al estándar de la UE:EC norma 88/407.

a. Composición:

- i. Fosfolípidos,
- ii, TRIS
- iii. Acido cítrico
- iv. Azúcar
- v. Antioxidantes
- vi. Tampones

- vii. Glicerina
- viii. Antibióticos
- ix. Agua de extrema pureza.

b. 100 ml del diluyente preparado contienen:

- i. Tilosina 5 mg
- ii. Gentamicina 25 mg
- iii. Espectinomicina 30 mg
- iv. Lincomicina 15 mg

c. Forma de preparación

Cada frasco de AndroMed® contiene 200 ml de concentrado para la preparación de 1000 ml de diluyente listo para su utilización. Para la preparación del diluyente se adicionan 800 ml de agua destilada estéril al contenido de un frasco de AndroMed® (200 ml), a una temperatura de 30 °C hasta 35 °C. También es posible preparar volúmenes menores, manteniendo la proporción (1 parte de concentrado + 3 partes de agua).

d. Proceda del siguiente modo

Vierta la cantidad requerida de concentrado de AndroMed® en una probeta o matraz graduado de tamaño suficiente. Caliente la cantidad requerida de agua purificada a un rango aproximado de 30 °C a 35 °C y agréguela al concentrado. Mezcle bien mediante movimiento o con un agitador magnético.

Para optimizar las cualidades de conservación de AndroMed® es importante que el volumen requerido de agua bidestilada sea vertido sobre el concentrado, y no de forma inversa.

Antes de su utilización, el diluyente AndroMed® preparado debe precalentarse en un baño María graduado de 30 °C a 32 °C.

e. Recomendaciones técnicas

A fin de evitar daños espermáticos de origen térmico, la temperatura interior de la vagina artificial no debe superar 43 °C al momento de la colección.

Se recomienda prediluir el semen ingresado al laboratorio con Andromed[®], en proporción 1:1. Para ello, el diluyente debe tener la misma temperatura que el eyaculado (± 1 °C). Mientras se procede al exámen de microscopía y determinación de concentración, el semen debe permanecer en el baño María de 30 a 32 °C. Sin embargo, la permanencia en el no debería extenderse por más de 10 minutos; tras la evaluación debe procederse inmediatamente a la dilución final. El eyaculado diluido desciende en forma pasiva a la temperatura de laboratorio (20 a 22 °C) y el semen es envasado a esta temperatura. En forma alternativa, Andromed[®] también es adecuado para proceder al envasado a 5 °C. El semen diluido debe equilibrarse a 5 °C por lo menos 2 horas.

Andromed[®] proporciona imágenes microscópicas extremadamente claras y por ello se presta muy especialmente para el análisis de motilidad apoyado en computación.

f. Congelación de pajuela.

La congelación de pajuelas se efectúa sobre rampas posicionadas horizontalmente a 4 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido o en un equipo congelador profesional con una temperatura de inicio de -120 °C. El tiempo de congelación debe extenderse para pajuelas de 0,25 ml a un mínimo de 7 minutos, para pajuelas de 0,5 ml a un mínimo de 10 minutos. A continuación, las pajuelas son inmediatamente sumergidas en nitrógeno líquido.

g. Aplicaciones especiales.

Andromed[®] se presta para tasas de dilución mayores (por ejemplo 10 millones de espermios/pajuela), como igualmente para la congelación de eyaculados de baja concentración. También es utilizable como diluyente para semen fresco con una temperatura de almacenaje entre 5 a 10 °C, y se recomienda como medio de referencia para la prueba de resistencia en el control

de calidad rutinario de la producción diaria. Andromed® es recomendado para humedecer las vaginas artificiales al momento de la colección del semen.

h. Almacenamiento.

El concentrado debe ser almacenado en refrigerador a 5 °C. La etiqueta tiene impresa la fecha mínima de utilización recomendada.

c.- Yema de huevo-Tris-Fructosa

En el (Cuadro 13) se muestra la composición del diluyente yema de huevo-tris-fructosa

Cuadro 13 Composición de diluyente para semen de macho cabrío, yema de huevo - tris - fructosa para dos especies, Ochomogo, 2008.		
Ingredientes	Carnero	Macho cabrío
Tris(hidroximetil)aminometano (g)	3,634	3,634
Fructosa (g)	0,50	0,50
Acido citrico (g)	1,99	1,99
Yema de huevo (ml)	14	2,5
Agua destilada c.s.p (ml)	100	100

Fuente: Evans y Maxwell (1990)

d.- Yema de huevo-Glucosa-Citrato

En el (Cuadro 14) se muestra la composición del diluyente yema de huevo-glucosa-citrato.

Cuadro 14 Composición de diluyentes para semen de macho cabrío,yema de huevo - glucosa - citrato,Ochomogo, 2008.		
Ingredientes	Carnero	Macho cabrío
Citrato (2H ₂ O) (g)	2,37	2,37
Glucosa (g)	0,80	0,80
Yema de huevo (ml)	20	2,5
Agua destilada c.s.p.(ml)	100	100

Fuente: Evans y Maxwell (1990)

Cuando se utilicen estos medios sintéticos, para diluir el semen de macho cabrío, la concentración de la yema de huevo no debe exceder el 2% después de diluida, para que no ocurra la reacción de coagulación. Esto se debe considerar a la hora de hacer los cálculos de dilución del semen. Con las concentraciones indicadas en las tablas no habrá peligro siempre que no se diluya más de 1+3 (semen + diluyente); si se precisa una mayor concentración se debe reducir la cantidad de yema de huevo (Evans y Maxwell, 1990).

Cuando se prepararon los diluyentes indicados en las Cuadros 13 y 14, las sustancias químicas se pesaron y luego se disolvieron en una probeta de 100 ml, adicionando de 90 a 95 ml para semen de macho cabrío. Luego se agregó la yema de huevo y se llevó al volumen final con agua destilada. El diluyente se mezcló moviendo la probeta hacia atrás y adelante hasta obtener una buena distribución de la yema. Los diluyentes indicados fueron preparados cada día que se colectó el semen.

5.- RESULTADOS

Se describen a continuación las actividades realizadas a través de todo el año (2007).

El proceso se inició con una capacitación en el Centro de Inseminación Artificial de Bovinos (CIA) del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), brindada por los Médicos Veterinarios Dr. Erasmo Ugalde y Dr. Claudio Brenes. La capacitación incluyó la preparación sanitaria de los machos, la extracción y recolección del semen, la preparación de diluyentes, el manejo del equipo y de los materiales, el proceso de congelamiento y conservación en nitrógeno líquido. Así mismo, se ofreció una lista de equipos, materiales y reactivos requeridos para el procesamiento de semen caprino. El entrenamiento incluyó los métodos de colección, la observación y evaluación de semen en microscopio, los cálculos de la cantidad de diluyente a usar según la concentración de espermatozoides por eyaculado. Se recibió el asesoramiento administrativo y técnico deseado para ejecutar el trabajo en un centro específico de inseminación caprina, a establecer en la Estación Experimental Alfredo Volio Mata (EEAVM) de la Universidad de Costa Rica (UCR) en el Alto de Ochomogo, Provincia de Cartago.

Con el propósito de desarrollar un centro de procesamiento y conservación de semen caprino en la Estación Experimental Alfredo Volio Mata de la Universidad de Costa Rica, siguiendo los objetivos generales y específicos expuestos previamente, se trazó un plan de trabajo dividido en cinco etapas.

La primera consistió en la adaptación de los machos cabríos al proceso de recolección y manipulación mediante el cabestreo y adiestramiento y palpación rutinaria de cada uno de los animales, para familiarizarlos con los procedimientos requeridos para la extracción de semen, incluyendo en esta etapa los exámenes sanitario obligatorios para autorizar su empleo.

La segunda etapa fue conseguir los equipos, reactivos e implementos necesarios en el proceso de recolección, dilución y conservación del semen caprino.

En la tercera etapa, se comenzó con el proceso de recolección de semen,

análisis macro y microscópico, así como su termoestabilización a una temperatura ideal. En la cuarta etapa se realizó la prueba de diluyentes y métodos de conservación de semen fresco, refrigerado y congelado.

En la quinta y última etapa, se realizaron los análisis de viabilidad del semen sometido a los procesos de conservación y se practicó la respectiva inseminación artificial de un grupo de cabras con el semen congelado producido. Durante todas las etapas se llevó a cabo un registro de datos.

5.1.- Experiencia en el Centro de inseminación Artificial (CIA) del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG)

a.- Objetivos

- i.- Tener una primera experiencia en el manejo de las técnicas de extracción, dilución y conservación de semen bovino, durante dos meses.
- ii.- Adaptar un protocolo de recolección y conservación de semen del establecido para los bovinos a los caprinos.

b.- Actividades

- i.- Se trabajó en la preparación y limpieza de los sementales bovinos.
- ii.- Se practicó la preparación de diluyentes, desde el pesado de los componentes, el proceso de mezclado, la dilución y conservación hasta su respectivo uso.
- iii.- Se realizó una valoración de las características del esperma como volumen, movimiento masal, % de motilidad, concentración, % de espermatozoides vivos y pH al semen recolectado.

- iv.- Una vez despejado los valores de concentración y volumen así como tamaño de pajillas a conservar, se procedió al cálculo de la cantidad de diluyente a preparar.
- v.- Se diluyó el semen, se llenaron y sellaron las pajillas para luego climatizarlas en refrigeración durante 3 horas a 5 °C, seguido del precongelmiento a vapores de nitrógeno líquido a -110 °C durante 20 minutos, para finalizar con su congelamiento directamente en los tanques de nitrógeno líquido a -196 °C.

c.- Preparación y limpieza de los sementales bovinos

Primero se colocan los toros en el brete uno por uno y se preparan para el proceso de recorte de pelos prepusiales y limpieza de sus órganos sexuales, ver Figura 6.



Figura 6. Semental colocado en el brete. Ochomogo, 2008.

La limpieza del prepucio y testículos de los sementales bovinos, se realizó temprano en la mañana utilizando abundante agua y jabón. Esta operación

estimula la libido sexual de los machos, ver Figura 7.



Figura 7. Testículos y prepucio limpios. Ochomogo, 2008.

Los animales fueron sujetos mediante naricera a una pared que divide en dos partes iguales la zona de limpieza, quedando tres animales a ambos lados de la pared, con dos bretes a cada lado, los toros o sementales bovinos presentan un comportamiento dócil durante todo el proceso de limpieza, ver Figura 8. De esta forma los animales fueron preparados individualmente y puestos a secar al sol antes de realizar los saltos.



Figura 8. Animales en proceso de limpieza y secado, Ochomogo, 2008

d.- Preparación de diluyentes para bovinos

En el Centro de Inseminación Artificial del Ministerio de Agricultura y Ganadería se usó únicamente un diluyente, el TRIS y a continuación se describen los componentes y su cantidad respectiva en gramos para la preparación del diluyente madre o base.

e.- Diluyentes TRIS según J. STEINBACK (1963) para bovinos usado en el CIA

Se usa para la conservación de semen en ampollas 1ml, pajillas 0,5ml y mini tubos 0,25ml. Los ingredientes requeridos para la preparación de la solución base se muestra en el Cuadro 15. Una vez preparada la solución base o madre de TRIS se anota la fecha de elaboración y se guarda en refrigeración a 5 °C. Esta solución madre se preparó 24 horas antes de la preparación del diluyente I y II, con el propósito de estabilizarla.

f.- Preparación del diluyente I:

En el Cuadro 16 se muestran las cantidades requeridas para preparar el diluyente I.

Cuadro 15	
Ingredientes para preparar el diluyente TRIS. Ochomogo, 2008.	
Ingredientes	Cantidad (g)
Tris-(hidroximetil) aminometano $C_3H_{11}NO_3$ (contenido mínimo 97%)	36,5
Acido cítrico monohidratado	20,24
D-Fructosa ($C_6H_{12}O_6$)	14,88
Penicilina (G-Na) 1.000.000 U.I	0,599
Dihidroestreptomicina-sulfato (1,28g correspondiente a 1g de Estreptomicina base)	1,48
Agua bidestilada	hasta completar 1L
Fuente: J. Steinback (1963)	

g.- Preparación del diluyente II:

Se utilizaron los mismos ingredientes y cantidades empleados en la preparación del diluyente I, con la variante en el diluyente II de que el agua bidestilada se sustituye completamente por glicerina.

Materiales	Cantidades a preparar (ml)									
	100	200	300	400	500	800	1000	1200	1500	2000
Solución base (ml)	67,2	134,4	201,6	268,8	336,0	537,6	672,0	806,4	1098,0	1240,0
Agua bidestilada (ml)	12,8	25,6	38,4	51,2	64,0	102,0	128,0	153,6	192,0	256,0
Yema de huevo (ml)	20,0	40,0	60,0	80,0	100,0	160,0	200,0	240,0	300,0	400,0

La particularidad es que se constituyen dos diluyentes, ver Figura 9, en los cuales se utilizan los mismos ingredientes en iguales cantidades, con la variante de que en uno de ellos el agua bidestilada es sustituida por glicerina.



Figura 9. Preparación de los diluyentes I y II. Ochomogo, 2008.

Los huevos usados fueron comprados como frescos del día (con no más de tres días de postura), se lavaron con agua y jabón. Luego de secados, se frotaron con una gasa estéril impregnada de alcohol de 70°. Se usó únicamente la yema,

ver Figura 10.



Figura 10. Limpieza de los huevos con agua y jabón. Ochomogo, 2008.

Para la extracción de la yema, el huevo fue quebrado por la mitad y se separó la clara de la yema por pases sucesivos desde una mitad de la cáscara hacia la otra, dejando escapar el mayor contenido de clara. Luego la yema, aun con un residuo de clara, se vertió sobre un papel filtro y se terminó de limpiar la clara residual mediante el deslizamiento de la yema sobre el papel de filtro, manteniendo la yema entera, de modo que el papel de filtro absorbiera la restante clara residual, ver Figura 11.



Figura 11. Técnica de limpieza a yema de huevo con papel filtro. Ochomogo, 2008

Mediante esta técnica se limpió cuidadosamente la membrana de la yema. Una vez que la yema estuvo completamente limpia, se llevó al extremo del papel filtro, se envolvió la yema con los lados sobrantes del papel filtro (formando un embudo), se rompió la membrana de la yema mediante compresión y su contenido se agregó a la solución del diluyente I y II, ver Figura 12.



Figura 12. Agregado de la yema de huevo al diluyente I.
Ochomogo, 2008

Tanto el diluyente I como el II fueron filtrados y controlados el pH, ambos se prepararon el día que se fueron a usar en la conservación del semen para garantizarse la frescura de la yema de huevo entre la preparación de la solución y el proceso de congelamiento del semen extraído ese mismo día, ver Figura 13.



Figura 13. Filtración del diluyente. Ochomogo, 2008.

Luego de homogenizadas y filtradas las soluciones, se conservaron en baño de agua a 37 °C, Figura 14. De esta manera quedaron listos los diluyentes I y II, para utilizarlos posteriormente en la dilución de semen.



Figura 14. Diluyente I y II atemperados a 37°C. Ochomogo, 2008.

La preparación de la vagina artificial se realizó anticipadamente a la extracción de semen, Figura 15, y se mantuvo a 37 °C en una estufa, Figura 16. En el momento justo antes de usarse la vagina artificial, se le llenó con agua a 48 °C.



Figura 15. Vagina artificial para bovinos. Ochomogo, 2008.



Figura 16. Vagina artificial preparada y lista para usar en estufa a 37°C. Ochomogo, 2008.

Tanto el toro maniquí como el toro semental se colocaron en la manga de extracción en posición de listo para el salto. El operario preparado para la extracción, con la vagina artificial en mano, se apresta a interceptar el pene del animal y provocar la eyaculación mediante el efecto de la temperatura y compresión del pene provocado por la presión de aire en el interior de la vagina artificial, Figura 17.



Figura 17. Extracción de semen con vagina artificial.
Ochomogo, 2008.

Tras la eyaculación, se realizó una evaluación del volumen obtenido y se valoró visualmente el color y la consistencia seminal, Figura 18. Luego se determinó en una muestra de semen, tanto la motilidad como el movimiento masal. Para ello, se vertió una gota de semen recién extraído sobre un portaobjetos colocado en una plantilla térmica a 37 °C para conservar la temperatura natural de los espermatozoides, Figura 19.



Figura 18. Copa recolectora conteniendo el eyaculado. Ochomogo, 2008

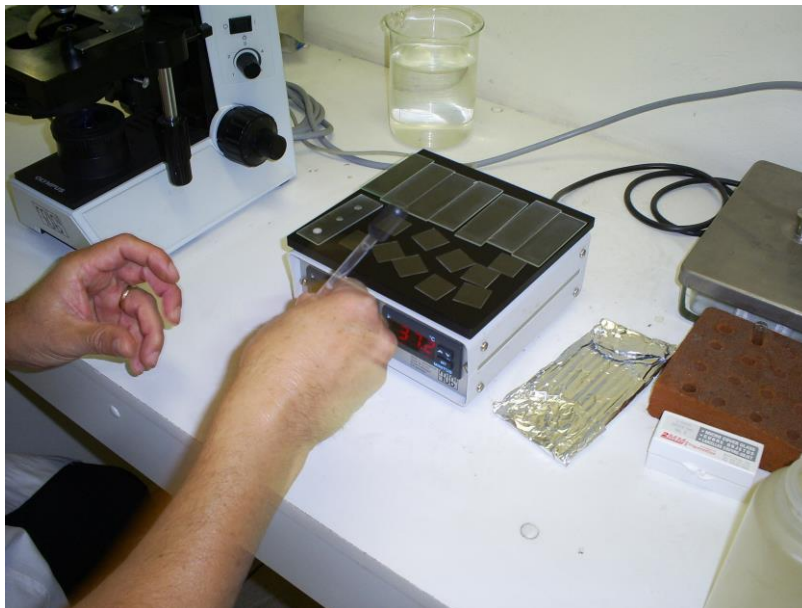


Figura 19. Muestra de semen en portaobjetos colocada en la plantilla térmica. Ochomogo, 2008.

Se realizó la valoración visual del semen, empleando un microscopio con plantilla térmica integrada y calibrada a 37 °C. En él se determinó la motilidad

espermática, movimiento masal y se estimó el porcentaje masal de espermatozoides vivos. Posteriormente, se observó la morfología del esperma, mediante tinción con azul de bromofenol, Figura 20.



Figura 20. Evaluación del esperma bovino en microscopio. Ochoмого, 2008.

Una vez evaluadas las características microscópicas del semen, se procedió a la determinación de la concentración espermática utilizando un espermodensímetro de amplio espectro, este equipo de alta tecnología realiza la lectura digital de la cantidad de espermatozoides en millones por mililitro, Figura 21.

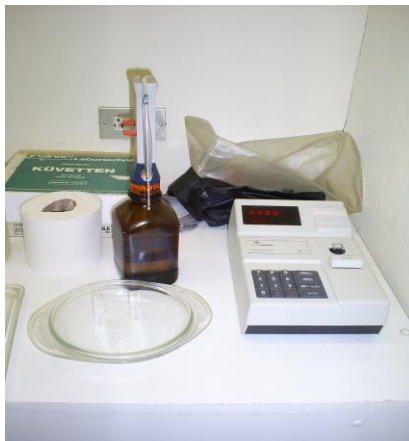


Figura 21. Espermodensímetro digital para determinar concentración espermática. Ochoмого, 2008.

Una vez determinada la concentración de espermatozoides en el eyaculado, se realizaron los cálculos de la cantidad de diluyente a utilizar.

La cantidad de diluyente se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$CD = \frac{V \times C \times T \times 1000}{CS}$$

Donde:

CD = Cantidad de diluyente, ml

V = Volumen del eyaculado, ml

C = Concentración de espermatozoides en el eyaculado, millones/mm³

T = Tamaño de las pajillas, (0,25, 05, 1 ml)

CS = Cantidad de espermatozoides en millones por pajilla.

La identificación de pajillas se realizó en una impresora especial para pajillas, las letras quedaron impresas directamente sobre la pajilla, ver Figura 22.

Un ejemplo de la información impresa es la siguiente:

CIA EL ALTO 100 07 (lugar, día y año)

JYM 2030 JACK (Nombre del propietario, N° registro del animal y su nombre)



Figura 22. Pajilla identificada y sellada..
Ochomogo, 2008

Luego, se continuó con el procedimiento de dilución del semen. La cantidad de diluyente requerido y el semen permanecieron en el baño maría ambos a 37 °C, ver Figura 23.



Figura 23. Diluyentes y semen a 37 °C en baño maría.
Ochomogo, 2008.

Para la dilución del semen, se mezclaron los diluyentes I y II en iguales cantidades, se homogenizaron en un agitador mecánico. Una vez realizada esta operación, se trasvasó la cantidad de diluyente mezclado (I y II) a una bureta aforada. Sobre este material se agregó lentamente, y con agitación constante, el diluyente al semen, nunca de la manera inversa. El semen diluido se mantiene en agitación constante para acelerar el proceso de dilución y homogenización del semen con el diluyente, de esta manera ambos diluyentes I y II quedaron en iguales cantidades agregados al semen y finalmente formaron una sola disolución, Figura 24

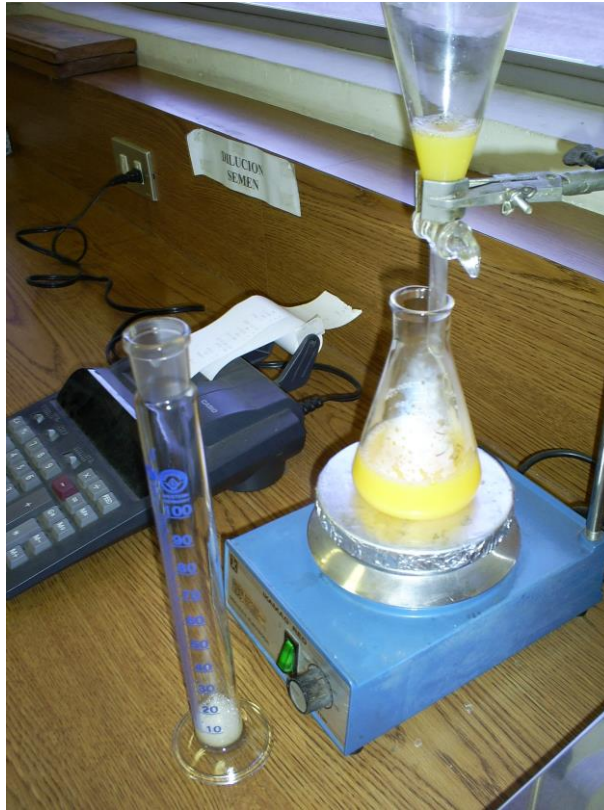


Figura 24. Dilución del semen. Ochomogo, 2008.

Una vez diluido el semen, se realiza el llenado de pajillas mediante una máquina especial que realiza dicha labor, Figura 25; las pajillas se colocan en una raqueta para 36 pajillas Figura 26 y se llena sucesivamente en grupos de 6 pajillas con un volumen de 0,5 ml cada una. En este volumen se tiene una concentración de 25 millones de espermatozoides por pajilla.



Figura 25. Llenado de pajillas. Ochomogo, 2008.

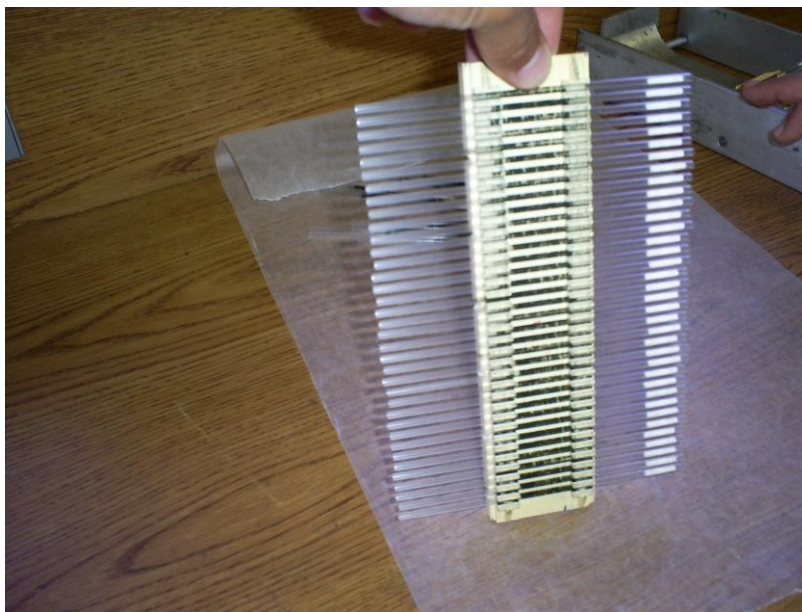


Figura 26. Raqueta para 36 pajillas. Ochomogo, 2008.

El sellado de pajillas se realizó introduciendo un balín de vidrio a presión,

por el extremo abierto de la pajilla, esto también lo realizó una máquina embaladora de pajillas que trabaja a gran velocidad, Figura 27.

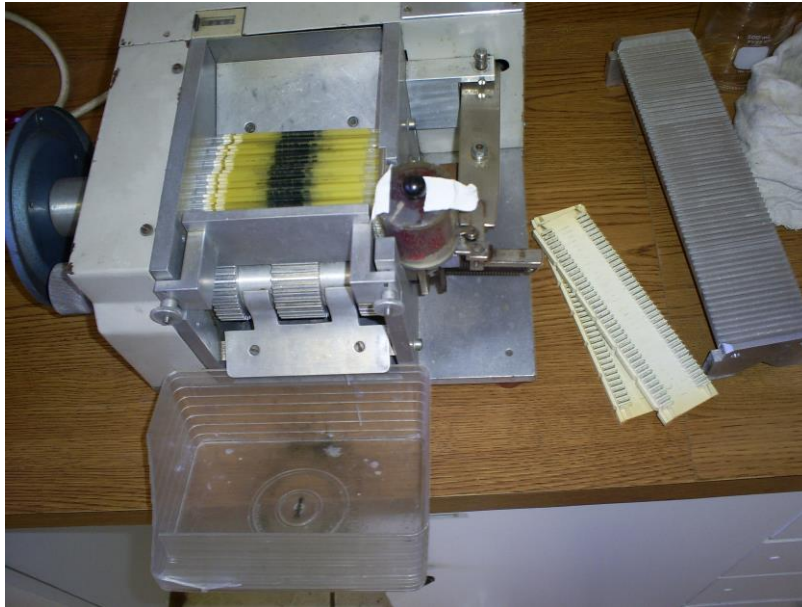


Figura 27. Selladora de pajillas. Ochoмого, 2008.

Una vez selladas, la totalidad de las pajillas se introducen a la refrigeradora para mantenerlas a 5 °C por 3 horas, Figura 28.



Figura 28. Grupo de pajillas con semen diluido en refrigerador a 5 °C. Ochoмого, 2008.

Posteriormente, se preparó la hielera de inmersión, la cual tiene dos soportes para la raqueta, colocados a 10 cm de altura sobre el piso de la hielera. A la hielera se le agregó nitrógeno líquido hasta la altura de 5 cm sobre su base. Las pajillas se sacaron del refrigerador, se pasaron a una raqueta de inmersión y ésta se introdujo en la hielera de polietileno, colocada sobre los soportes durante 20 minutos, para descender la temperatura de los espermatozoides hasta unos $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$, Figura 29, lo que provoca el letargo o inactividad de los espermatozoides antes de introducirlos a los tanques de nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figura 29. Grupo de pajillas en vapores de nitrógeno líquido.
Ochomogo, 2008.

Finalmente, las pajillas se sacaron una vez transcurrido este tiempo, para ser introducidas de inmediato a los “globelets” que contienen grupos de 100 pajillas, los cuales fueron colocados en las canastas de los tanques de almacenamiento con nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, Figura 30; temperatura que conserva los espermatozoides indefinidamente. De esta manera quedaron congeladas las pajillas de semen de uno o varios sementales, debidamente identificadas en la parte externa de la boca del tanque de almacenamiento.



Figura 30. Trasvase de las pajillas contenidas en una canasta y sometidas a la temperatura final de los tanques de nitrógeno líquido a -196°C .

Ochomogo, 2008.

FORMACIÓN DE UN CENTRO DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CAPRINOS

La etapa efectuada en la Estación Experimental Alfredo Volio Mata de la Universidad de Costa Rica, tuvo la meta de establecer un centro de procesamiento y conservación de semen caprino.

El laboratorio de conservación de semen caprino (LCSC) se ubicó en una sección del laboratorio de análisis bromatológico, Figura 31; destinada para ese fin, ver Figuras 32.



Figura 31. Laboratorio de análisis forrajeros. Ochomogo, 2008.



Figura 32. Parte del Laboratorio de Congelamiento de Semen Caprino (LCSC). Ochomogo, 2008.

a.- Elección de los primeros machos cabríos

La siguiente etapa fue entrenar los animales, mediante el cabestreo diario, durante dos meses, con el fin de adaptarlos al manejo, traslado y ver el temperamento de cada uno de los machos, además se determinó por simple palpación de los órganos sexuales si existía alguna anomalía o dolencia testicular.

La respectiva elección de los machos se realizó en base a sus características fenotípicas y estado de salud, realizándose las consecuentes pruebas sanitarias para poder autorizar la utilización de su esperma.

b.- Procedencia, razas y edades.

El hato de machos cabríos lo comprende tres razas: LaMancha, Saanen y Toggenburg. La mayor parte de los animales son propiedad de la Estación Experimental Alfredo Volio de la Universidad de Costa Rica a diferencia de dos animales Saanen y dos Toggenburg propiedad del productor Federico Cantillo Malavassi (FCM) que los prestó momentáneamente para las pruebas de extracción y conservación espermática.

La siguiente es una lista de ellos, con la imagen de cada uno de los sementales cabríos, su raza, nombre y número de identificación el cual corresponde al año en que nació y el número de cría correspondiente a ese mismo año.



Figura 33. LaMancha – Penny Stein – 0402. Ochomogo, 2008.



Figura 34. LaMancha - Tyrone – 0609. Ochomogo, 2008.



Figura 35. LaMancha - Rafita – 0508. Ochomogo, 2008.



Figura 36. LaMancha - Toledo – 0601. Ochomogo, 2008.



Figura 37. LaMancha - Kurt – 0611. Ochomogo, 2008.



Figura 38. LaMancha - Juan – 0638. Ochomogo, 2008.



Figura 39. Saanen - Trueno – 0634. Ochomogo, 2008.



Figura 40. Saanen – Jayco – FCM. Ochomogo, 2008.



Figura 41. Toggenburg - Enriquez – FCM. Ochomogo, 2008.

c.- Entrenamiento y preparación de los cabros

La etapa de preparación de los machos cabríos consistió en ubicarlos en la banca de extracción para familiarizarlos con el lugar, Figura 42. Se recortaron los pelos prepusiales y se procedió a la limpieza de órganos sexuales con agua y jabón. La siguiente etapa, fue la de conocer la respuesta de los machos cabrios a una cabra en estro sujeta en el potro de extracción de semen y su conducta al salto con la vagina artificial.



Figura 42. Macho cabrío subido en potro de extracción de semen. Ochomogo, 2008.

d.- Exámenes sanitarios realizados a los machos cabríos

Los requisitos para la importación de semen caprino, establecidos por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), para animales caprinos proveniente de Nueva Zelanda (único protocolo aparentemente disponible y aprobado oficialmente) dicta que los machos cabríos deben estar libres de 10 enfermedades: Lengua azul, Brucelosis caprina, Pleuroneumonía contagiosa caprina, Paratuberculosis, Artritis encefalitis caprina, Agalaxia contagiosa, Clamidiosis ovina, Prurigo lumbar, Leptospirosis y Tuberculosis bovina. En los laboratorios oficiales del LANASEVE (MAG) solo es posible realizar dos de estas pruebas específicas para las enfermedades de la especie caprina: Brucelosis y Tuberculosis.

Con la colaboración del Dr. Juan Araya del Ministerio de Agricultura y Ganadería, se realizaron ambas pruebas sanitarias (brucelosis y tuberculosis) a todos los machos cabríos que participaron en el proceso de extracción de semen, con el propósito de determinar el estado de estas enfermedades infecto contagiosas en ellos. El diagnóstico inequívoco de la brucela fue mediante el aislamiento e identificación del germen a partir de sangre. En el caso de la tuberculosis se realizó mediante la inyección de antígeno (tuberculina) en la porción ventral de la cola, a 2,5 cm del pliegue basal o de inserción de la cola. Se realizó la medición y lectura de la reacción a las 72 horas posteriores. El reporte de la prueba de brucelosis, extendido en el Folio 0607-08-LANASEVE, indicó un resultado negativo para todos los machos cabríos. El reporte de la prueba de tuberculina, extendido en folio 12124-DIVISIÓN DE SALUD , indicó también un resultado negativo. Por lo tanto, todos los machos cabríos empleados en la extracción de semen resultaron negativos a las pruebas de brucelosis y tuberculosis y en consecuencia libres de esas enfermedades.

e.- Acondicionamiento de infraestructura y equipo de campo

Las instalaciones del laboratorio de conservación de semen caprino, deben estar protegidas de la luz directa del sol así como del viento y la lluvia, con

disposición de abundante agua potable, destilador de agua, y corriente eléctrica para poder operar todo el equipo necesario. El área de extracción de semen debe estar cercana al laboratorio, en este caso la recolección del semen se realizó al aire libre, en un potro o tarima de extracción provista de cepo para sujetar la hembra maniquí, de una rampa y con un costado abierto para poder colocarse y realizar la colecta de semen, Figura 43.

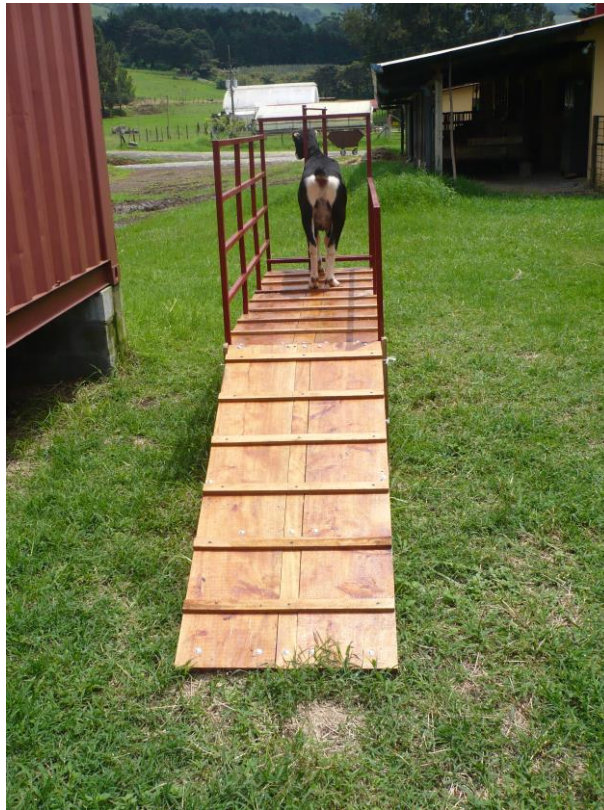


Figura 43. Potro de extracción de semen. Ochomogo, 2008.

El equipo de campo lo constituyen un cabestro para trasladar los animales, la vagina artificial armada por todas sus partes individuales: copa recolectora, embudo de goma, tubo externo de hule y “linner” o camisa interna de látex, Figura 44.



Figura 44. Vagina artificial lista. Ochomogo, 2008.

f.- Adquisición e instalación de equipos, materiales y reactivos

La adquisición del equipo, materiales y reactivos, fue una etapa prolongada por la especificidad y el costo de conseguir cada uno. Para ello se consultó y contactó a cada una de las casas comerciales que se dedican a la venta de materiales y reactivos de laboratorio, así mismo se solicitó la ayuda de la Facultad de Microbiología, la cual donó un microscopio y pipetas Sally. Se compró el cartucho de la vagina artificial, los “liners”, los embudos de goma, las tubos colectores calibrados, los diluyentes base Triladyl® y Andromed®, la cámara de Neubauer, los porta y cubreobjetos, las pipetas Pasterur y el espermodensímetro de Karras.

Los principales equipos de un laboratorio de análisis y conservación de semen se observan en las figuras 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51:



Figura 45. Baño maría. Ochomogo, 2008.



Figura 46. Refrigerador. Ochomogo, 2008.



Figura 47. Microscopio. Ochomogo, 2008.



Figura 48. Hielera de polietileno. Ochomogo, 2008.



Figura 49. Tanque de nitrógeno líquido. Ochomogo, 2008.



Figura 50. Balanza analítica. Ochomogo, 2008.



Figura 51. Material de cristalería. Ochomogo, 2008.

g.- Manejo de tanques de nitrógeno

Los depósitos de crió conservación de aluminio están aislados por un sistema multicapas al vacío. Son ligeros y resisten a condiciones de trabajo forzado, están concebidos para trabajar a una presión atmosférica máxima de servicio de 0,5 bar (7,25 lbs/pulgada cuadrada).

Es de suma importancia, saber manejarlo y manipularlo, para lo cual se presentan algunos consejos y cuidados en el empleo:

a.- Siempre transporte y almacene el depósito en posición vertical, incluso cuando están vacíos.

b.- No incline el depósito ni siquiera para trasvasar nitrógeno líquido de un tanque a otro.

c.- Para el trasvase efectivo de nitrógeno líquido utilice una bomba de transferencia o caña de trasiego con presurización externa o eléctrica. Si hay que vaciar el contenido de un tanque, hágalo al exterior sobre tierra o grava.

d.- Durante el mantenimiento, evite que el depósito se caiga o choque bruscamente contra el suelo.

e.- El tapón siempre debe permanecer en el cuello del depósito. El incumplimiento de esta regla, además de aumentar el consumo estático del depósito, podría dar lugar a la formación de una costra de hielo en el cuello.

El llenado del depósito debe realizarse cada vez que así lo demande, máxime si hay material biológico contenido, el nivel nunca debe bajar de la mitad de su altura y no se recomienda dejarlo vacío por tiempo prolongado. Cuando se llene el depósito cuya capacidad interior esté a temperatura ambiente, verter lentamente el nitrógeno líquido de forma que se evite el derrame sobre el cuello y la parte externa de tanque para evitar daños por escarchado y vaporización de gases con el ambiente. Se debe llenar el depósito al 50% aproximadamente y dejar que el nitrógeno líquido se estabilice durante unas horas antes de completar. La estabilidad térmica solo se obtendrá al cabo de 48 horas. Si lo que se pretende es la autonomía máxima, el complemento no se realizará hasta los 3 días después del primer llenado.

Cuando se haya completado el llenado del tanque no debe introducirse material biológico hasta 24 horas después de haberlo llenado con nitrógeno líquido.

Utilizar la abrazadera y el anillo de centrado suministrados con el cabezal. La medición de la cantidad de nitrógeno líquido en el tanque se debe realizar periódicamente, mas si el depósito ha permanecido en uso constante, de manera que se introduce una regleta graduada de plástico o de madera pintada de negro hasta el fondo del depósito y se mantiene durante unos segundos, luego se retira la regleta y se sacude para observar la marca de condensación que deja como señal de la humedad de aire la cual indica la altura de líquido que queda en el depósito.

Si hay restos de escarcha en el exterior del depósito, o si está completamente escarchado, significa que el vacío entre las paredes del tanque se ha deteriorado o está roto, en este caso el nitrógeno líquido se evaporará muy rápidamente, lo cual implica que si el tanque estaba cargado es necesario transferir el material biológico a otro tanque a la mayor brevedad posible.

h.- Precauciones que hay que tomar durante la manipulación del nitrógeno líquido

El nitrógeno líquido almacenado en su depósito tiene una temperatura de -196 °C y un gran poder frigorífico. Deben tomarse precauciones estrictas para manipular este fluido. Por ejemplo el contacto del nitrógeno líquido con la piel puede provocar congelación, quemaduras e irritación, hay que evitar salpicaduras durante los llenados o trasvases de nitrógeno, durante las manipulaciones con el nitrógeno líquido se debe proteger los ojos con gafas y las manos con guantes adecuados así como vestir prendas que cubran todo el cuerpo.

En caso de quemadura con nitrógeno líquido, curar como cualquier otra quemadura. En todos los casos, llamar a un médico, no frotar la parte congelada, se debe calentar progresivamente contra otra parte del cuerpo. El nitrógeno gaseoso, como resultado de la evaporación es inodoro e incoloro. Una concentración de nitrógeno gaseoso en una habitación cerrada o mal ventilada puede provocar asfixia por falta de oxígeno.

Los depósitos deben ser almacenados en lugares lejos de los rayos del sol o alguna otra fuente de calor directa así como ventilados y debidamente identificados.

i.- Colección de semen y calidad de primeras extracciones

Las primeras extracciones se realizaron una vez preparados y entrenados los machos cabrios así como haber conseguido todo el equipo, cristalería, diluyentes y reactivos necesarios para proceder a esta etapa, donde precisa realizar una valoración de la calidad seminal de cada macho por separado, con el fin de determinar la concentración espermática para realizar los cálculos de cantidad de diluyente a preparar.

Los parámetros a analizar de cada uno de los eyaculados fueron anotados y registrados en la bitácora de extracción de semen de la Estación Experimental Alfredo Volio Mata de la Universidad de Costa Rica y son los siguientes: fecha de recolección, hora, volumen, color y consistencia, pH, movimiento masal, % de

motilidad, concentración (mill/mm³), % de espermatozoides vivos y en caso de conservación el tipo de diluyente, todo esto para cada uno los machos cabrios que participaron en el proyecto de extracción de semen.

Primero se preparó la vagina artificial uniendo sus partes una por una, de manera que una vez lista para su utilización solo quedaba agregarle el agua caliente a 48 °C, se insufla aire de forma que tuviera presión interna, se llevó al potro de extracción donde esperó una hembra en estro, sujeta en el cepo y el macho cabrió sujeta mediante un cabestro por un ayudante que lo manejó durante los saltos.

Al momento del salto el macho cabrió comenzó con un cortejo hacia la hembra en estro, que estimula la libido sexual del animal, unos 2-3 minutos de colocado en el potro de extracción, el macho saltó a la hembra, e inmediatamente se interceptó el pene para introducirlo en la vagina artificial, en ese momento se produjo un movimiento vigoroso hacia delante que indica la eyaculación, esto por efecto de una adecuada temperatura (42- 48 °C) y presión interna de la vagina artificial (la respuesta al estímulo de presión y temperatura es independiente para cada macho cabrió). El macho se baja, retrocede y permanece quieto, para empezar el cortejo y siguiente salto, realizando de esta manera un promedio de tres saltos (con un intervalo de 5 a 7 minutos entre saltos) y un total de 1,5- 3,0 ml de eyaculado por macho cabrió por día. La etapa de extracción de semen tardó de 15 a 20 minutos dependiendo del comportamiento de cada cabro.

La siguiente etapa fue cubrir la copa recolectora con la funda de la vagina artificial, para proteger los espermatozoides de la luz y temperatura ambiental, se trasladó el semen al laboratorio donde se introdujo el tubo colector en baño maría a 28-30 °C de temperatura, para realizar la evaluación de las características macro y microscópicas respectivas.

j.- Prueba de termo resistencia

En un principio, el eyaculado se conservó a 37 °C en baño maría (según reportaba la literatura). Se probó mantenerlo a esta temperatura analizando una

muestra de semen en un portaobjetos y observado al microscopio en (40x y100x aumentos) para comprobar el estado de los espermatozoides caracterizando la viabilidad, motilidad y movimiento masal del eyaculado, cada 5 – 15 – 30 min y 1 hora después como se aprecia en el Cuadro 17.

Cuadro 17		Porcentaje de motilidad y movimiento masal de espermatozoides a 37 °C en baño maría a cuatro tiempos diferentes. Ochomogo, 2008.			
Termoresistencia	5 min	15 min	30 min	1 hora	
Porcentaje de motilidad	70%	50%	30%	0%	
Movimiento masal	4	3	2	0	

A partir de esta prueba se determinó que la resistencia de los espermatozoides a la temperatura de 37 °C era insuficiente para poder conservarlos y prolongar la viabilidad de los mismos de manera que permitiera el trabajo posterior en forma eficiente o apropiada.

Para contrastar la observación anterior, se dejaron varias láminas de semen a temperatura ambiente, sobre las mesas de trabajo, durante 30 minutos, para determinarles al cabo de ese tiempo la viabilidad y moviendo masal del eyaculado. Se observó que tanto la viabilidad como el movimiento masal se conservaron en niveles óptimos a temperatura ambiente. En adelante, el semen fresco, recién cosechado, se siguió manteniendo en baño de maría ajustado a 28 – 30 °C y se inició un nuevo proceso de observación. Después de varias corridas, se verificó que 28 °C es una temperatura óptima de trabajo del semen en baño de maría. Este hallazgo se respalda en forma lógica y directa con el calor testicular, cuya temperatura es de 4 a 7 °C por debajo de la temperatura corporal (Evans y Maxwell, 1990). Para corroborar el hallazgo, se tomó la temperatura corporal de los machos cabrios de la Estación Experimental y se encontró un valor medio de 37 °C, de esta forma se comprobó que fuese adecuado conservar los espermatozoides a 28-30 °C.

En el Cuadro 18 se muestran las pruebas de termoresistencia a 28 – 30 °C realizada en los mismos intervalos de tiempo post-recolectado.

Cuadro 18 Porcentaje de motilidad masal de espermatozoides a 28 - 30 °C en baño maría en cuatro tiempos diferentes. Ochohogo, 2008.				
Termoresistencia	5 min	15 min	30 min	1 hora
Porcentaje de motilidad	70%	65%	60%	50%
Movimiento masal	4	4	3	3

De esta forma se pudo observar que el tiempo de capacitación de los espermatozoides se prolongó por más tiempo en buenas condiciones de viabilidad y motilidad y con ello realizar los cálculos de concentración y cantidad de diluyente a preparar.

k.- Determinación de valoración de semen

El formato de registro con los parámetros a valorar en cada uno de los eyaculados de los machos cabríos se muestra en el Cuadro 19.

Cuadro 19 Formato para el registro de eyaculados, promediado para todos los machos cabríos que participaron en el proyecto de extracción de semen. Ochohogo, 2008.									
Nombre del cabro									
Raza									
Fecha de nacimiento									
Número de identificación									
Fecha	Hora	Volumen (ml)	Color - Consistencia	pH	Movimiento masal	% Motilidad	Concentración (mill/mm ³)	% Vivos	Diluyente
10/09/2007	02:00 p.m.	1,5 - 3,0	Cremosa espesa - Lechosa amarillenta	7	3 a 4	70	3,0 - 5,0	70	

El volumen de eyaculado fue determinado directamente en el tubo colector graduado, generalmente estuvo entre 0,5 y 1,0 ml por eyaculado, realizando tres eyaculados por período de extracción para cada uno de los cabros. Así mismo se evaluó el color y consistencia seminal, generalmente de dos tipos: cremoso espeso o blanco grisáceo y lechoso amarillento, este es un parámetro indicador a simple vista de la calidad espermática. A cada eyaculado se le determinó el pH con la ayuda de unas tiras indicadoras que cambian de tono según el medio ácido, neutro o básico comparado con una escala de colores, este parámetro fue siempre

muy estable y de carácter neutral alrededor de pH 7,0.

El movimiento masal se clasificó según la escala que va de 0 a 5, donde 0 no presentan movimiento alguno y 5 presentan movimiento de ondas rápidas y el 90 % de los espermatozoides están vivos y activos con movimiento progresivo hacia delante, este parámetro fue ascendente de acuerdo al número de extracciones para cada macho cabrío y anduvo en valores de 3 a 4.

La motilidad es correlacionada al movimiento masal de forma que siempre que un eyaculado presentaba movimiento masal 4 el porcentaje de espermatozoides activos con movimiento progresivo o porcentaje de motilidad era de 70 a 85 %, para eyaculados de calificación 3 la motilidad era de 45 a 65%, este parámetro se determinó observando una muestra de semen a 40x aumentos en el microscopio. Generalmente, cuando se realizaron las primeras extracciones se podía observar un paño de espermatozoides muertos flotantes y debajo de estos, ondas de movimiento rápidas en forma de crestas o flujos continuos, conforme se fueron realizando más extracciones los cabros hicieron remoción de sus reservas espermáticas, con eyaculados de mejor calidad y con un mínimo de espermatozoides muertos.

El parámetro porcentaje de espermatozoides vivos y anomalías de los espermatozoides se determinó mediante la prueba de tinción eosina/nigrosina y azul de bromofenol. El colorante eosina/nigrosina que se preparó, se muestra en Cuadro 3 (eosina/nigrosina/citrato), se disolvió cada uno de los componentes con agua destilada o bidestilada y en baño de agua caliente, se filtró y dejó reposar en un recipiente con tapa para poder almacenarse al aire libre. El colorante azul de bromofenol estaba preparado y fue usado directamente, sin previa preparación.

Se realizó la prueba de dos colorantes para evaluar la calidad de tinción de los espermatozoides y así poder diagnosticar en una muestra de semen el porcentaje de espermatozoides vivos y la morfología espermática. Esa prueba se realizó tomando al azar una cantidad aproximada de 100 espermatozoides, de una muestra de semen observada a 40x y 100x en el microscopio.

Para realizar la prueba de conteo de espermatozoides vivos, se preparó el colorante y este se mantuvo en baño maría a 30 °C. Se colocó en el borde de un

portaobjetos esmerilado 1 o 2 gotas de colorante y una gota de semen del tubo colector, ambos a la misma temperatura y se mezclaron las gotas de colorante y semen, luego la mezcla se extendió sobre el portaobjetos con la ayuda de otro porta con extremo inclinado, este actuó como extensor, formándose una delgada película sobre el portaobjetos que se dejó secar a temperatura ambiente durante una hora.

Esta placa preparada sirve para realizar el conteo de espermatozoides vivos con aumento de 40x y para observar la morfología de los espermatozoides a 100x.

Previo a la observación de los espermatozoides en el microscopio, se le agrega a la placa unas gotas de aceite de inmersión. Se examinó al microscopio en 40x la placa y se observaron al menos 100 espermatozoides de diferentes campos, el conteo se realizó diferenciando los espermatozoides rosados o muertos de los claros o transparentes que califican como vivos. La misma prueba fue realizada para determinar anomalías espermáticas, solo que a 100x y clasificando los espermatozoides en los diferentes tipos de anomalías. Para ambas pruebas se procedió de igual forma con el colorante azul de bromofenol.

En el Cuadro 20 se muestra a manera de ejemplo la concentración de espermatozoides vivos y las morfoanomalías encontradas en el cabro Rafita – 0508.

Cuadro 20		
Porcentaje de espermatozoides vivos y morfoanomalías del cabro Rafita - 0508 utilizando los colorantes eosina/nigrosina y azul de bromofenol. Ochoмого, 2008.		
	% Espermatozoides vivos	% Morfoanomalías
Eosina/nigrosina	72	9
Azul de Bromofenol	68	12

Se puede observar que la calidad de su esperma ronda los límites de lo permitido, para ser considerado apto en un programa de extracción de semen, ya que en relación al porcentaje de espermatozoides vivos este no puede contener más de un 20 – 30 % de espermatozoides muertos (coloreados rojos) y no más de un 15 – 20 % de espermatozoides anormales. Estos parámetros fueron tomados

a todos los cabros después de cada extracción de semen. La literatura menciona que esos valores disminuyen normalmente con el número de colectas a un mismo cabro en una serie de pruebas.

En el Cuadro 21 se puede observar la lista de cabros utilizados para las pruebas de extracción de semen, en este se determinó diferencias cualitativas y cuantitativas en relación a la composición del esperma de cada uno, estos datos fueron promediados para cada uno de los valores a calificar en cada uno de los machos cabríos que se les realizó extracción de semen. La composición del esperma en cuanto a volumen, color y consistencia, así como concentración es característica de cada macho cabrío en particular con diferencias en la calidad espermática relacionadas a la raza y edad de cada uno.

Cuadro 21 Valoración de esperma promediado para cada uno de los cabros que participaron en el programa de extracción de semen. Ochoyomo, 2008.							
Nombre y raza	Volumen de eyaculado (ml)	Color y consistencia	pH	Movimineto masal	Motilidad %	Concentración (mill/mm3)	Vivos %
Trueno - Saanen	2,5	cremoso grisáceo	7	4	85	4,85	75
Kurt - LaMancha	2	cremoso espeso	7	4	75	4,25	70
Tyrone - LaMancha	2	cremoso blancusco	7	4	70	3,75	70
Toledo - LaMancha	3	lechoso amarillento	7	4	85	3,35	75
Rafael - LaMancha	2,5	cremoso espeso	7	4	75	3,35	75
Penny - LaMancha	2,5	cremoso amarillento	7	3	65	1,375	50
Antone - LaMancha	2	cremoso amarillento	7	4	70	1,85	65
Jayco - Saanen	1	cremoso grisáceo	7	4	75	4,85	70
Rémulo - Saanen	2	cremoso espeso	7	4	80	4,85	75
Enriques - Toggenburg	2	lechoso amarillento	7	4	80	3,75	75

Es importante destacar dentro de la clasificación de morfoanomalías que sufrieron los espermatozoides. Los tipos más comunes fueron espermatozoides con cola retorcida, rotura de pieza intermedia, sin cola o decapitados y rotura del cuello.

I.- Determinación de la concentración de semen

La determinación de la concentración de espermatozoides en el eyaculado, se realizó con una cámara de Neubauer. Esta cámara funciona como un contador de células individuales, presenta dos campos o retículas de conteo, situadas una inferior y la otra en la parte superior de la cámara. El área o campo reticular cuenta

con 25 cuadrados grandes en un modelo de 5 por 5 cuadrados grandes, estos se observan a 10x en el microscopio, cada uno de estos cuadrados grandes esta dividido en 16 cuadrados pequeños para un modelo de 4 por 4 cuadrados pequeños. Cada área reticular tiene una superficie de 1 mm^2 y una altura de $0,1 \text{ mm}$ por lo tanto el volumen de cada área reticular es de $0,1 \text{ mm}^3$. En cada campo o área reticular solo se cuentan los espermatozoides presentes en 5 de estos cuadrados, de forma diagonal de izquierda a derecha. De manera que en cada uno de estos cuadrados grandes se cuentan los espermatozoides presentes en los 16 cuadrados pequeños, esto se visualizan a 40x. Cada cuadrado grande tiene una superficie de $1/25 \text{ mm}^2$, para un volumen de $0,004 \text{ mm}^3$.

Según los cálculos de la densidad de espermatozoides por mm^3 de eyaculado hay:

10 cuadrados grandes.

$0,004 \text{ mm}^3$ de volumen para cada cuadrado grande.

$1/200 = 0,005$ que es el grado de dilución del semen.

Para un factor de multiplicación de $= 1 / (10 * 0,004 * 0,005) = 5000$

Se tiene que la densidad o concentración de espermatozoides por mm^3 es igual al número de espermatozoides (promedio de los 10 cuadrados grandes) por 5000 que es el factor de multiplicación. La lectura de la cantidad se da en millones de espermatozoides por milímetro cúbico o en miles de millones de espermatozoides por mililitro.

Para determinar la concentración de espermatozoides se procedió de la siguiente manera:

Se situó la cámara de Neubauer en una superficie limpia y plana. Se colocó sobre el par de áreas reticulares el cubre de cristal grueso de la cámara de Neubauer. Se preparó una disolución salina al 1 %. Se llenó la pipeta Sally, extrayendo una muestra de semen hasta la marca de $0,5 \text{ ml}$, luego se aspira la solución salina al 1% hasta la marca 101. Se debe evitar en todo momento que se formen burbujas de aire.

Una vez cargada la pipeta Sally, se sujetó los extremos de la pipeta con los

dedos índice y pulgar, se agitó para mezclar el semen con la solución.

Una vez agitado y homogenizado, se descartaron las primeras 3 gotas, para conseguir muestras de semen perfectamente diluidas, procedentes del bulbo de la pipeta. Para llenar la cámara de Neubauer, se acercó la pipeta a los canales presentes en el borde de la cámara y permitió descargar una gota de la muestra por debajo del cubre, evitando sobrecargar la cámara. Luego de llenada la cámara de Neubauer, esta se dejó en reposo por 5 minutos, para permitir que los espermatozoides sedimenten, antes de colocar la cámara al microscopio. La cámara se colocó en el microscopio con el lente de 40x y se observaron los dos campos de conteo. Se centra el lente del campo superior y se enfocó a 100x para realizar el conteo. Los espermatozoides en cada uno de los cuadrados pequeños se cuentan y se suma el total de espermatozoides contados en cada uno de los 5 cuadrados grandes, en ambos campos de conteo, y el total de espermatozoides contados se multiplica por 5000 para obtener la concentración del eyaculado. Por ejemplo en una muestra realizada se determinó la concentración de espermatozoides de la siguiente manera:

Para un eyaculado extraído, con un volumen de 3,0 ml, se sacó una muestra de semen, se llenó la pipeta Sally y se colocó en la cámara de Neubauer. Realizado el conteo, se sumaron 438 espermatozoides en el primer campo de conteo y 427 en el segundo campo, para un total de 865 espermatozoides, esta suma por 5000 dio una concentración de 4,325 mill/mm³ (4325 millones/ml). Es importante resaltar que este método de conteo de espermatozoides en la cámara de Neubauer tiene una desviación estándar de ± 3 % de espermatozoides sobre el total contado.

Otro método utilizado en el laboratorio para determinar la concentración de espermatozoides de una muestra de semen es mediante el empleo del espermodensímetro de Karras. Este instrumento se utiliza para determinar la densidad del eyaculado, a través de la observación volumétrica.

El espermodensímetro de Karras se empleó de la siguiente manera. Primero se llenó la cámara del densímetro con 10 ml de una solución salina (NaCl)

con una concentración de 0,9 o 1,0%. La medida de la solución de NaCl agregada fue hecha usando una pipeta graduada. Luego se tomó; con una pipeta que trae el espermodensímetro, una muestra de 0,1 ml de semen puro a ser examinado y se agregó a la solución de NaCl en el espermodensímetro. El extremo superior del densímetro se cubrió con el dedo pulgar y con el dedo meñique el extremo inferior, apretado entre ambos dedos, el densímetro se volteó dos y tres veces cuidadosamente sobre los extremos para suspender las células espermáticas uniformemente dentro de la solución salina. El espermodensímetro tiene una escala graduada de 10 ml, donde se puede observar el enturbiamiento producido por la espermio suspensión de la muestra en distintas escalas.

Cuando el eyaculado es muy espeso, es posible leer donde se marca diferencia de turbidez de la solución, y se lee en la escala la concentración con respecto al factor de dilución empleado (0,1/10). En eyaculados menos concentrados, se agregó cada vez 0,1 ml de semen a la solución hasta que la turbidez fuese diferenciada en el densímetro. Una vez que haya encontrado la mezcla adecuada (una o más gotas) que marcan la turbidez buscada, anote los resultados de la medición (0,2/10; 0,3/10) y luego compárelos en la tabla de interpretación.

La lectura de los valores en el densímetro, se realiza poniendo una hoja blanca detrás de la cámara para facilitar la lectura, se tapa el densímetro y se gira dos o tres veces. Coloque en posición correcta la escala con la parte interna del densímetro hacia la mano, se aconseja hacer la lectura a la luz del día, teniendo una ventana a su respaldo. Para la lectura coloque el densímetro con el brazo estirado en posición longitudinal al nivel de los ojos, luego determine el número de la escala (60, 70, 80, etc.) que todavía puede reconocerse como un número, si la lectura se hace correctamente, los próximos números marcados más altos se deben reconocer solo como una sombra turbia, considerando que los próximos números de la marca más baja debe ser claramente legibles. Entonces se determina, si el valor de la marca más alta del próximo número está en la escala (65, 75, 85, etc.) todavía es legible o no. Si lo es, entonces este es el valor de lectura que debe tomarse. Si no, tome el número entero (60, 70, 80) más cercano.

Posteriormente, el valor de lectura en el densímetro se compara con el valor de dilución utilizado, según el valor marcado por el densímetro en relación al factor de dilución utilizado, el número que resulta como indicador de la densidad del semen se da en millones de células espermáticas por mililitro. La limpieza del espermodensímetro se realiza enjuagando con agua y secando a temperatura ambiente, aunque no es necesario secarlo completamente para empezar una nueva medida.

Este método de determinación es el más rápido y adecuado de utilizar en el campo, aunque tiene una desviación estándar de ± 5 % de espermatozoides sobre el total, es de fácil transporte y limpieza. Este método es menos exacto que el anterior.

m.- Uso de diluyentes para conservar semen fresco y congelado

Para la etapa de dilución y conservación del semen fresco y congelado, se utilizaron 6 diluyentes, de los cuales 2 son comerciales y 4 preparados en el laboratorio. Los diluyentes que usan leche descremada, el agua de coco, tris/fructosa/yema de huevo y citrato/glucosa/yema de huevo, son específicos para conservar semen fresco refrigerado y para utilizar inmediatamente. Los diluyentes comerciales Triladyl® y Andromed® son específicos para conservar el semen refrigerado y congelado. Una particularidad de los diluyentes tris/fructosa/yema de huevo, citrato/glucosa/yema de huevo y Triladyl® es que se usa 2,0 – 2,5 % de yema de huevo fresca (solo para el caso de los caprinos). Se utilizó agua bidestidada y dextrosa en lugar de fructosa o glucosa, además que cada uno de los reactivos en polvo como el Tris (hidroximetil) aminometano, ácido cítrico y citrato (2H₂O) fueron pesados en cantidades exactas a requerir en una balanza analítica para la previa preparación del diluyente.

n.- Procesos de dilución

Para el proceso de dilución se tiene en cuenta que hay que preparar la

cantidad necesaria de diluyente según las condiciones de volumen, concentración y cantidad de espermatozoides por pajilla según corresponda el método de conservación y el tipo de inseminación a realizar. Dentro de este proyecto, se optó por las siguiente concentración de espermatozoides por dosis seminales: en semen fresco se empleó una concentración de 100 millones de espermatozoides/pajilla (0,5 – 0,25 ml), en semen refrigerado 150 millones de espermatozoides/ pajilla (0,5 – 0,25 ml) y en semen congelado 180 millones de espermatozoides/pajilla (0,5 – 0,25 ml). Estas dosis seminales se escogieron para garantizar una alta fertilidad en inseminación cervical.

El proceso de dilución se realizó una vez que se tenía la concentración del eyaculado, realizada por el método de Neubauer o Karras. Se trabajo de acuerdo a la fórmula del Centro de Inseminación Artificial (CIA) del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) para definir la cantidad de diluyente a utilizar.

Para ilustrar lo anterior, a modo de ejemplo, en la extracción realizada a Trueno – 0634, de la raza Saanen se determinó una cantidad de 1,5 ml de eyaculado, con una concentración de 3,350 mill/mm³ con un movimiento masal de 4 y 70% de espermatozoides vivos, para congelar en pajillas de 0,5 ml con 180 millones de espermatozoides por pajilla, se procedió de la siguiente manera:

$$\frac{1,5 * 3,350 * 0,5 * 1000}{180} - (1,5) = 13,9 - (1,5) = 12,4 \text{ ml de diluyente}$$

En este caso, se preparó diluyente Andromed®, del cual requiere 12,4 ml para diluir 1,5 ml de semen puro. En el caso del diluyente a utilizar no hay variantes con respecto a la composición y el tipo de diluyente a requerir para esta formula, de esta forma pudo haber sido cualquiera de los otros diluyentes. Lo importante es el procedimiento a seguir en el proceso de dilución una vez que se conoce la cantidad precisa de diluyente a preparar.

El diluyente, cualquiera que sea debe almacenarse en baño maría a 30 °C luego de preparado y permanecer a la misma temperatura con el semen hasta su valoración respectiva. Para ello, se debe tener una bureta graduada y realizarle un par de lavados volumétricos con el mismo diluyente para equilibrar la

concentración. Se llena la cantidad requerida de diluyente en una bureta de 50 ml, se titula el semen gota a gota, agitando y homogenizando el tubo colector que contiene el semen de forma lenta y constante, agregando en todo momento el diluyente al semen y no de forma inversa.

Cuando se titula el semen contenido en un tubo colector y este no es de suficiente capacidad volumétrica, se debe realizar un trasvase del semen diluido a un erlenmeyer de 50 ml para continuar la titulación, se debe tener en cuenta que la dilución del semen se realiza a temperatura ambiente y es en este momento que se produce el descenso constante de la temperatura espermática hasta su conservación en frío o utilización inmediata, por lo tanto es importante trabajar de forma rápida y precisa hasta la siguiente etapa de llenado y sellado de pajillas que también se realiza a temperatura ambiente.

Una vez concluido el proceso de dilución se tomó una muestra para observar al microscopio el comportamiento de los espermatozoides post diluido. Es importante observar la motilidad y el movimiento masal de los espermatozoides, así como el grado de concentración que presentan los mismos en la dilución y determinar que haya al menos un 70 % de espermatozoides con movimiento progresivo.

ñ.- Procesos de envasado y etiquetado de pajillas

Esta etapa se realizó luego de la dilución del semen a temperatura ambiente, cuidando en todo momento el semen diluido en el elenmeyer, alejándolo del contacto directo de la luz y el viento frío, trabajando de forma limpia y ordenada con el equipo a requerir.

El etiquetado de pajillas se realizó con anterioridad a la jornada de dilución, teniendo en cuenta cuantas pajillas se requieren para ser embasadas durante el proceso y la cantidad de pajillas a embasar son de acuerdo a la cantidad de semen diluido, que se divide en el volumen de la pajilla, por ejemplo: 13,9 ml / 0,5 ml es igual a 27,8 pajillas a requerir.

El etiquetado de las pajillas, luego de varios intentos y pruebas, se

recomendó hacerlo imprimiendo los datos en papel en una impresora laser y con cinta plástica adhesiva, pegada en el extremo de la pajilla que viene sellado de fábrica. La respectiva identificación tiene: Nombre del cabro – Raza - número registro.

El semen diluido fresco se puede envasar en viales de 1,8 ml como se utilizó para conservar el semen refrigerado así como en pajillas de 0,25 y 0,5 ml. El embasado en pajillas se realizó mediante una pipeta graduada de 0,5 ml, descargando el contenido en cada una de las pajillas a requerir una por una y puestas con el extremo abierto hacia arriba, para que otra persona realice el sellado, golpeando el extremo abierto de la pajilla en una bandeja conteniendo el alcohol polivinílico granulado fino, de forma que quedó un sello de un centímetro aproximadamente, luego se puso el extremo sellado al contacto con agua a 30 °C en un beaker para que gelifique el alcohol y queden listas las pajillas para el siguiente proceso.

o.- Procesos de conservación (semen fresco y congelado)

El siguiente proceso que reciben las pajillas de semen selladas y listas, es el enfriamiento en refrigerador a 5 °C por 3 horas y aclimatización en vapores de nitrógeno líquido a -120°C por 20 minutos, antes de ser depositadas en los tanques de nitrógeno líquido a -196°C. El caso de la climatización en vapores de nitrógeno líquido, del semen diluido contenido en las pajillas de 0,5 ml se realizó en una hielera de poliestireno con una marca a 9 cm de la base, donde se colocaron dos varillas de acero inoxidable, introducidas en las paredes de la hielera, para colocar sobre estas, dos rampas de metal con capacidad para 50 pajillas cada una. Previo a la colocación de las rampas de metal, se vertió nitrógeno líquido en la hielera hasta la marca colocada a 5 cm sobre el fondo de la hielera. Luego se colocaron las rampas de enfriamiento, teniendo las pajillas contacto únicamente con los vapores de nitrógeno, durante 20 minutos. Aunque algunos diluyentes requieran menos de 20 minutos de exposición a los vapores de nitrógeno, este paso es de suma importancia para llegar al punto de equilibrio

crítico de congelamiento que sufren los espermatozoides, los cuales experimental el estado de letargo metabólico y se inactivan, llegando al punto de cristalización extracelular.

Concluido el periodo descrito anteriormente, se sacaron las pajillas rápidamente y se colocaron en los respectivos “globelets” o envases plásticos (con capacidad para 5 pajillas cada uno), los cuales se colocan en forma inmediata en los “canisters” o canastas de los tanques e introducen en el tanque de conservación.

De esta forma se concluyó con el congelamiento a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ del semen caprino diluido, conservando su viabilidad indefinidamente.

p.- Pruebas post conservado o duración del semen fresco

Las pruebas realizadas al semen conservado en fresco, refrigerado y congelado, muestran la respuesta de los diluyentes a los distintos procesos de conservación, así como el comportamiento de los espermatozoides en cada uno de ellos.

El Cuadro 22 muestra el comportamiento espermático en los diluyentes naturales leche descremada y agua de pipa, para semen conservado en fresco durante de 3 horas a temperatura ambiente $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ post diluido.

Cuadro 22	Porcentaje de motilidad, movimiento masal y espermatozoides vivos diluidos en leche descremada y agua de coco conservados durante tres horas a temperatura ambiente. Ochoyogo, 2008.								
	1 hora			2 horas			3 horas		
	% Mot	M.M	E.V	% Mot	M.M	E.V	% Mot	M.M	E.V
Leche descremada	45	3	50	35	2	40	20	1	30
Agua de coco	50	3	60	40	3	45	30	2	35

Se puede observar un mejor comportamiento de los espermatozoides en el agua de coco a 25°C , a pesar de que la leche descremada ha sido tradicionalmente considerada mejor diluyente del semen fresco en general, ésta no probó serlo en las pruebas realizadas en el laboratorio de conservación de semen caprino.

En esta misma prueba, se conservó una parte del semen diluido en leche descremada y agua de coco por tres horas a 5 °C, mostrando un deterioro acelerado en su viabilidad. Se comprobó de esta forma que ambos diluyentes son útiles para diluir semen fresco y realizar la inseminación inmediatamente después de preparado.

Otra prueba fue observar al microscopio (40x) la respuesta de los espermatozoides, en cuanto a movimiento masal, porcentaje de motilidad, así como estimar el porcentaje de espermatozoides vivos con tinción eosina/nigrosina, tras ser descongelados 48 horas después de haberse conservado en cuatro tipos de diluyentes: Triladyl®, Andromed®, tris/glucosa/ácido cítrico/yema de huevo y citrato/fructosa/yema de huevo. Como se puede apreciar en el Cuadro 23.

Cuadro 23			
Porcentaje de motilidad, movimiento masal y espermatozoides vivos diluidos en Triladyl®, Andromed®, Tris/glucosa/ácido cítrico/yema huevo y Citrato/fructosa/yema huevo, tras ser descongelados luego de 48 horas. Ochocho, 2008.			
Diluyente	% Mot	M.M	E.V
Triladyl®	80	4	70
Andromed®	70	3	60
Tris	60	3	50
Citrato	50	3	40

Tras ser descongeladas las pajillas exponiéndolas por 10 minutos en un baño de agua a 30 °C, se montaron las muestras en portaobjetos y se observaron al microscopio, encontrando diferencias importantes entre Triladyl® y citrato, pero no así entre Triladyl® y Andromed® o Tris. Además se muestra un descenso de la viabilidad espermática con los diluyentes preparados Tris y Citrato, pues para el caso de congelamiento estos no tienen glicerol como componente indispensable en la protección interna de la membrana plasmática de los espermatozoides, evitando así la cristalización de su núcleo. Se determinó que Triladyl® fue el diluyente que mejor resultados dio, mostrando mejor calidad de movimiento con flujo rápido y continuo de espermatozoides.

Otra prueba realizada fue determinar la resistencia de los espermatozoides en el eyaculado fresco, observados durante 6 horas. Se analizó la motilidad de los espermatozoides a temperatura ambiente (23 – 25 °C), como se aprecia en el Cuadro 24.

Cuadro 24		Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos, motilidad y movimiento masal, durante 6 horas de capacitación del semen caprino fresco. Ochomogo, 2008.			
		0 h	2 h	4 h	6 h
% Motilidad		85	70	50	40
Movimiento masal		4	4	3	2
% Espermatozoides vivos		70	60	40	30

La motilidad, la cual se describe como el porcentaje de espermatozoides móviles en una muestra del eyaculado, es siempre superior al porcentaje de espermatozoides vivos, siendo esta diferencia debida al carácter subjetivo de la determinación de la población espermática móvil, menos exacta que el recuento de 100 espermatozoides y su posterior valoración microscópica. El movimiento masal, es la calidad de movimiento que tienen los espermatozoides móviles, caracterizada por un flujo de ondas de movimiento constantes, en esta prueba siendo la temperatura de conservación del semen a 30 °C y la ambiental 23 - 25 °C, semejantes, los espermatozoides permanecieron estables las primeras horas, aunque desciende considerablemente el grado de actividad espermática luego de 6 horas.

Se realizó una prueba de conservación de semen a 5 ° C en los diluyentes preparados en el laboratorio, los cuales fueron Citrato/glucosa/yema de huevo y Tris/fructosa/yema de huevo, así como los preparados comercialmente Triladyl® y Andromed®. Se examinó el semen diluido cada tres días, durante el tiempo que permanecieran activo los espermatozoides y se evaluó la motilidad espermática como referencia del grado de actividad de los espermatozoides conservados según aparece en el Cuadro 25.

Cuadro 25		Evolución de la motilidad espermática durante 28 días en refrigeración a 5 °C utilizando Andromed [®] , Triladyl [®] , Tris/glucosa/yema de huevo y Citrato/fructosa/yema de huevo. Ochoyogo, 2008.							
		3 días	6 días	9 días	12 días	15 días	18 días	21 días	28 días
Triladyl [®]		85	85	80	70	65	55	50	30
Andromed [®]		85	85	80	75	70	60	65	40
Tris/glucosa/yema huevo		75	70	60	50	30	0	0	0
Citrato/fructosa/yema huevo		80	80	70	65	40	20	0	0

Las muestras de semen fresco diluido se conservaron en viales de 1,8 ml, en refrigeración a 5 °C. Al evaluar estas muestras, se sacaron y se acondicionaron en baño de agua a 30 °C por 10 minutos, tiempo en que se observó una adecuada capacitación de la mayoría de los espermatozoides en las diferentes pruebas efectuadas. La observación del porcentaje de motilidad espermática, tras la conservación del semen caprino refrigerado a 5 °C, con cada uno de los diferentes diluyentes usados, experimentó un descenso al aumentar al número de días de conservación refrigerado y ese comportamiento fue semejante en los cuatro diluyentes empleados. Al inicio de esta experiencia, el movimiento de los espermatozoides recién diluidos fue bastante rápido y rectilíneo, con un valor de movimiento masal de 4 y una concentración aproximada de 150 millones de espermatozoides por 0,5 ml. Se mantuvo casi sin variaciones durante los primeros 6 días de conservados, para el día 15 se observaron diferencias importantes en los tratamientos Tris y Citrato donde se notó un movimiento más lento, con trayectoria curvilínea de la mayoría los espermatozoides, como si perdieran actividad metabólica tras pasar el tiempo de conservación. A partir de los 18 a 21 días, la baja motilidad de los espermatozoides era notable para la mayoría de tratamientos excepto para el diluyente Andromed[®] que resultó ser el que mejor capacitación ofreció a los espermatozoides, probablemente por que no contiene yema de huevo en su composición, que al ser un producto biológico sufre desnaturalización de sus proteínas como resultado de los procesos oxidativos del medio.

El tipo de movimiento espermático luego de agregado el diluyente y descongelado las dosis seminales, cambió de un movimiento fluido acelerado a un

movimiento rectilíneo progresivo o “hiperactivado”, como resultado del proceso de dilución del semen y el cambio de comportamiento espermático respectivo, además se observó muchos espermatozoides con movimiento curvilíneo de tipo vibratorio en un solo lugar, luego de este movimiento algunos se incorporaron hacia un movimiento progresivo hacia delante.

q.- Inseminación con semen congelado

La etapa final del proyecto de congelamiento de semen caprino, culminó con la inseminación cervical (pajillas de 0,5 ml de semen congelado en nitrógeno líquido a -196 °C) a un grupo de 7 cabras (6 Toggenburg y 1 Saanen). El diluyente utilizado fue Triladyl®, ya que fue el que mejor resultados mostró en la capacitación del esperma caprino congelado.

La inseminación se llevó a cabo, luego de haberlas sincronizado mediante una esponja intravaginal con 45 mg de acetato de fluorogestona o FGA la cual se les introdujo con ayuda de un espéculo el día 1 a partir del cual empezó a transcurrir el tiempo de sincronización. Para el día 9 se les inyectó Folligón 250 – 500 UI intramuscular, 48 horas después se retiró las esponjas y para el día 12 se detectaron los celos. El día 13 en la mañana se quitaron las esponjas, en la tarde se observaron los principales síntomas de celo, con abultamiento de la vulva, color rosada y un continuo movimiento de la cola, así mismo las cabras se comportaron muy inquietas.

La técnica de inseminación aplicada fue la cervical con deposición del semen en la entrada del cérvix. Se utilizó un potro de inseminación donde se colocaron las cabras una por una. Se limpió la zona de la vulva con papel toalla estéril, se le introdujo el espéculo suavemente con la ayuda de un lubricante no espermaticida, hasta llegar a la entrada del cérvix, en ese momento se observó en la periferia del cérvix un fluido espeso color blancuzco “lechoso”, característico del estado óptimo para inseminar las cabras, luego se iluminó con ayuda de un bombillo pequeño que se sujetó en la parte interna del espéculo y se introdujo la

pistola de inseminación con la pajillas de 0,5 ml montada, esta pajilla de semen fue previamente descongelada a 30 °C en un termo, durante 10 minutos. La inseminación se realizó a cada una de las cabras de forma sucesiva, esterilizando los instrumentos de forma adecuada utilizando agua y jabón para el espéculo y se frotó con alcohol de 70° la pistola de inseminación, que se pasó por una llama caliente para terminar de esterilizarla, ésta técnica es llamada “flameado”. De esta forma finalizó la etapa de inseminación artificial cervical, probando de forma experimental la viabilidad espermática de las pajillas conservadas en los tanques de nitrógeno líquido.

De las cabras inseminadas 5 de las 7 repitieron celo 21 días después, quedando dos cabras Toggenburg preñadas, éstas fueron inseminadas con esperma de Enriquez un cabro de la raza Toggenburg, el semen del mismo se diluyó y congelo en Triladyl®, dando como resultado un 28 % de fertilidad lo cual redonda los límites en inseminación cervical con semen congelado. Este porcentaje es bajo comparado con los obtenidos en inseminación con semen refrigerado y semen fresco aplicando la misma técnica de inseminación cervical.

Los factores de esta baja fertilidad con semen congelado se deben a variables como la condición mínima de motilidad que posee el esperma contenido en las pajillas el cual se considera que pierde un 20 % de los espermatozoides totales en la etapa de descongelamiento, lo que provoca trabajar con un 50 % como máximo de fertilidad espermática, otra variable es la condición corporal de las cabras al momento de ser inseminadas, el tipo de sincronización realizado y la respuesta de las cabras a la misma, el momento óptimo de inseminación, fuentes de error incluidas durante el proceso de extracción, dilución , conservación e inseminación, inocuidad de equipos reactivos y materiales así como la respuesta animal durante el proceso. A pesar de todas estas variables se determinó que el material conservado en el laboratorio de conservación de semen caprino es considerado viable y apto para ser utilizado en inseminación artificial.

6.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1.- CONCLUSIONES

- 6.1.1- Se debe tomar la temperatura corporal de los machos cabríos cualquiera que sea la zona y las condiciones climáticas del centro de extracción de semen y tener presente que el eyaculado extraído debe conservarse de 4 – 7 °C por debajo de la temperatura corporal, en un baño María a 28 – 30 °C generalmente.
- 6.1.2- Los diluyentes base, las fundas de goma (linner y embudo), se deben mantener en refrigeración constante a 5 °C, durante el tiempo de almacenamiento en el laboratorio de conservación de semen.
- 6.1.3- Cuando se realice un trasvase o el agregado de diluyente a una bureta, se debe realizar el lavado volumétrico respectivo, para asegurar el equilibrio de las concentraciones en las paredes de la cristalería.
- 6.1.4- Se debe tomar en consideración el trabajar con un mínimo 70 % de motilidad espermática cuando se desee conservar semen caprino, sobretodo cuando va a ser congelado a -196 °C, ya que en la descongelación de las dosis seminales se pierden un 20 % de espermatozoides durante el choque térmico a 30 °C, lo cual implica trabajar con un 50 % de viabilidad de las pajillas para inseminación.
- 6.1.5- La titulación del semen se debe realizar de forma lenta y con agitación constante, agregando el diluyente al semen, nunca de forma inversa, a temperatura ambiente y en un lugar cerrado dentro del laboratorio donde se evite el contacto directo de la luz y el viento frío.
- 6.1.6- Se debe tener presente que en el análisis espermático de los machos cabríos miembros de un programa de extracción de semen, para ser considerados sementales reproductores aptos, estos no deben tener más de un 30 % de espermatozoides muertos y 20 % de espermatozoides

anormales, en las pruebas realizadas con los colorantes eosina/nigrosina o azul de bromofenol. Se considera mejor colorante eosina/nigrosina, preparado en el laboratorio para identificar espermatozoides muertos y morfologías.

6.1.7.- Los diluyentes base Triladyl® y Andromed® fueron los que mejor resultado dieron en la conservación de semen caprino, Triladyl® para congelamiento en nitrógeno líquido a -196 °C y Andromed® para conservación en refrigeración a 5 °C.

6.1.8.- Se encontró que la capacitación de los espermatozoides a 5 °C diluidos en Andromed® tienen una duración de 21 días, ya que en su composición no lleva yema de huevo, que a esta temperatura tiende a desnaturalizar las proteínas con el tiempo y por ende no se prolonga la capacidad crioprotectora en el exterior de la membrana espermática, reduciendo de esta manera el metabolismo de los espermatozoides.

6.1.9.- El tiempo promedio para reactivar las pajillas de semen luego de conservadas a 5°C o -196 °C es de 5 – 10 minutos inmersas en el baño maría a 30 °C, temperatura a la cual se estabiliza el metabolismo de la mayoría de los espermatozoides.

6.1.10.- Utilizar un 2 – 2,5% de yema de huevo, con no más de tres días de postura.

6.1.11.- Utilizar una concentración de 180 millones de espermatozoides por pajilla cuando se desee congelar semen, 150 millones de espermatozoides por pajilla para conservar semen refrigerado a 5°C y 100 millones de espermatozoides por pajillas para diluir semen fresco.

6.1.12.- Aclimatar las pajillas de semen a 5°C durante 3 horas, luego colocar en vapores de nitrógeno líquido a -196°C durante 20 minutos, previo a ser introducidas en los tanques de nitrógeno.

- 6.1.13.- Agregar yema de huevo, glicerol y antibióticos al diluyente base el día de la dilución del semen.
- 6.1.14.- Evaluar un 10% del total de las pajillas congeladas en cada jornada de conservación.
- 6.1.15.- Utilizar la fórmula de la cantidad de diluyente a requerir para diluir el semen eyaculado.
- 6.1.16.- Emplear pipetas graduadas de 0,25 y 0,50 ml para llenar las pajillas con el semen diluido.
- 6.1.17.-Se lograron los objetivos del proyecto, así como equipar y establecer un laboratorio de conservación de semen caprino en la Estación Experimental “Alfredo Volio Mata”.

6.2.- RECOMENDACIONES

- 6.2.1.- Se recomienda sellar adecuadamente el extremo abierto de la pajilla con alcohol polivinílico en polvo, de forma que quede un sello de 1 cm bien compactado contra una superficie plana, luego dejar que gelifique unos minutos en el agua a 30 °C para completar el proceso
- 6.2.2.- Dar adecuado mantenimiento y control del nivel de nitrógeno líquido a los tanques de semen, que no bajen de la mitad sobretodo cuando tiene material genético en conservación. Revisarlo cada 15 días.
- 6.2.3.- Para crear un Centro de Inseminación Artificial en caprinos se recomienda construir edificaciones apropiadas para el mantenimiento y manejo de machos cabríos adultos, separado de las actuales instalaciones dedicadas al alojamiento y manejo de las cabras productoras de leche y en crecimiento.
- 6.2.4.- Se considera de suma importancia desarrollar un programa de evaluación de machos cabríos mediante un programa de mejoramiento genético permanente.
- 6.2.5.- Se recomienda que con base en el diagrama operacional mostrado en la Figura 53, el Centro de Inseminación Caprino desarrolle un manual de procedimientos estándares.
- 6.2.6.- Las cámaras de Neubauer y Karras se enjuagan con agua destilada luego de usadas, nunca las lave con jabón, para evitar el peligro de que queden residuos y afecten los espermatozoides al usarlas nuevamente, séquelas al aire libre.
- 6.2.7.- Utilizar una hembra “*maniquí*” en *estro* que sea receptiva, para estimular sexualmente al macho y facilite la extracción del semen, esta se debe sujetar al cepo del potro de extracción momentos antes de llevar el macho cabrío.

- 6.2.8.- Utilizar el espermodensímetro de Karras para determinar la concentración de espermatozoides en campo.
- 6.2.9.- Filtrar y medir el pH de los diluyentes y colorantes a requerir, así mismo determinar el pH de semen eyaculado y verificar la neutralidad.
- 6.2.10.- Los componentes de la vagina artificial como el embudo de goma y el tubo o camisa interna (linner) se enjuagan con abundante agua y se ponen a remojar con agua caliente por una hora, luego se secan con aire caliente y se almacenan en refrigerador a 5°C.
- 6.2.11.- Cabestrear y palpar los animales dos semanas antes de comenzar las jornadas de extracción.
- 6.2.12.- Identificar las pajillas de semen con el nombre del animal, la raza y el número de identificación correspondiente.

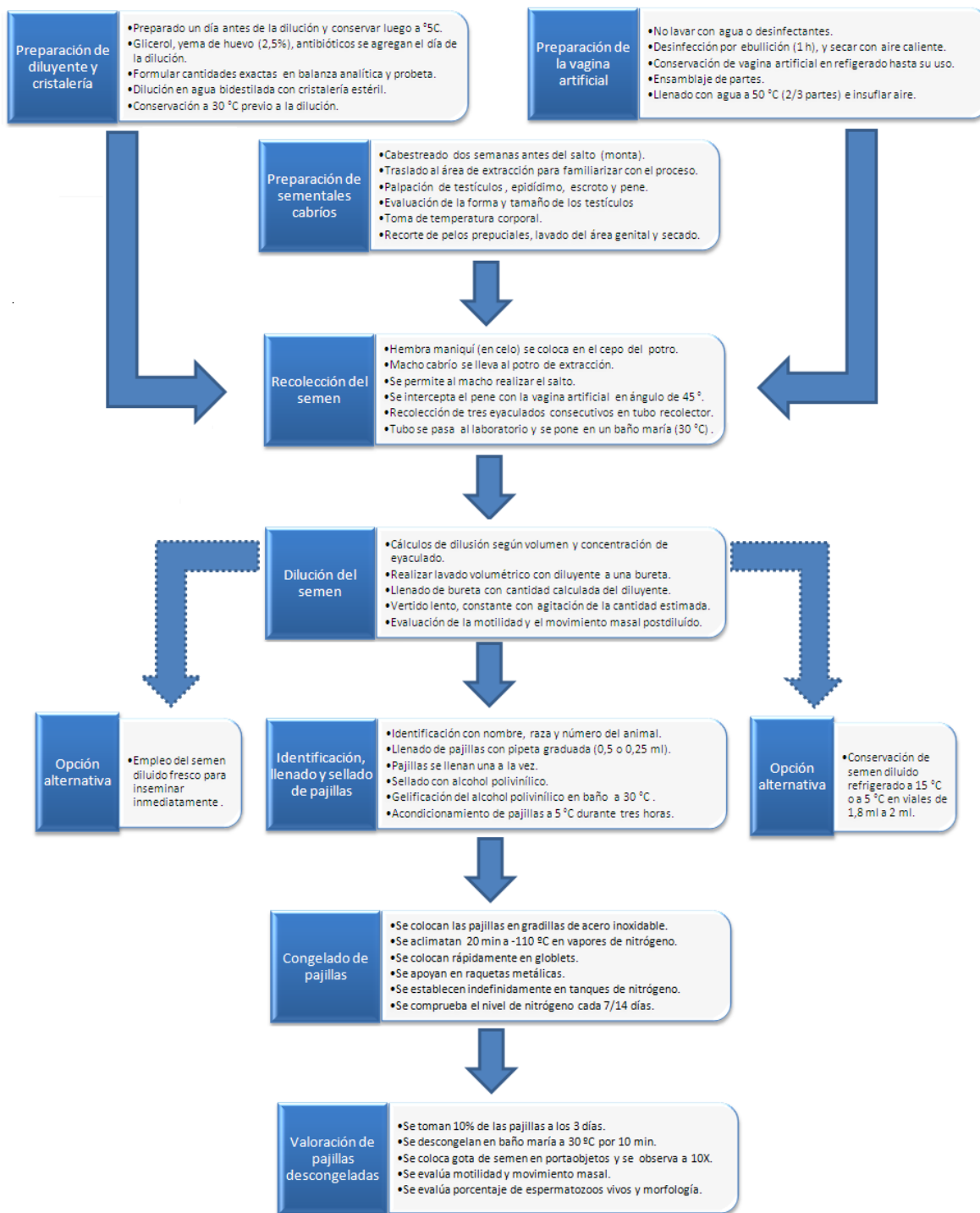


Figura 52. Diagrama operacional.

7.- BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- ANDERSON R.A., REDDY J.M., OSWALD C. Y ZANEVELD L.J.D. 1979
Enzymatic determination of fructosa in seminal plasma by initial rate
analysis. Clin. Chem.,25: 1780-1782.
- BORQUE C., VÁZQUEZ I. Y SIMARRO M. 1989. Determinación
espectrofotométrica de fructosa, ácido cítrico y proteínas totales en
eyaculados de pequeños rumiantes. Forum Internacional sobre
Reproducción animal. Murcia, España: 141-146.
- BOSCHINI, C. 2006. Reproducción e inseminación artificial en cabras lecheras. 1°
edición: 2005, Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa
Rica. 104 p.
- CHAND D., LOHCHUBA B.S. U ARORA K.L.1985. Biochemical constituents of
semen in Nali and Lohi breeds of rams. Indian Vet. J; 62:964-968.
- CORTEEL J.M. 1981. Collection, processing and artificial insemination of goat
semen. En: Goat Production. Ed. Academic Press Inc. London: 171-191.
- CORTEZ, S. 1998. Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de
semen caprino. Tesis de doctorado Universidad Computense de Madrid.
Madrid, España. 225p.
- DEVENDRA, C; McLEROY, G. 1986. Producción de cabras y ovejas en los
trópicos. Primera edición. Editorial El Manual Moderno. Mexico, D. F. 295p
- DURÁN, F; DURÁN, J. 2007. Manual de explotación y reproducción en caprinos.
Grupo latino Editores Ltda. Bogotá, Colombia. 688p.

- EVANS, G; MAXWELL, W. 1990. Conservación de semen durante corto tiempo. Inseminación artificial en ovejas y cabras. Editorial Acribia, Zaragoza, España. pp: 119 – 122.
- GIBBONS, A; GONZALEZ, R; CUETO, M. 2003. Catálogo de tecnologías para pequeños productores agropecuarios. Consultado el 01/03/07 Disponible: http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/programas/desarrollo_rural/proinder/catalogo/catalogo/tecno/45.htm
- GIBBONS, A; CUETO, M; WOLF, M. 2007. Inseminación artificial en la especie caprina Consultado el: 23/02/07. Disponible en <http://www.inta.gov.ar/bariloche/info/documentos/animal/reproduc/Ct235%20Manual%20IA%20caprina.pdf>.
- GONZALES G.F. Y VILLENA A. 1997. Influence of low corrected seminal fructose levels on sperm chromatin stability in semen from men attending an infertility service. Fertil. Steril; 67 (4): 763-768.
- GUSS, S. 1977. Management and disease of dairy goats. Dairy Goat Journal Publishing Corporation. Scottsdale, Arizona. 223p.
- HAFEZ, E.S.E. 1996. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6^o edición, Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México, D.F. 542 p.
- IRITANI A. Y NISHIKAWA Y. 1962. Studies on the egg-yolk coagulating factor (enzyme) in goat semen. III. Coagulation action to the fractionated yolk. Vet. Zootec; 17: 322-325.
- IRITANI A. Y NISHIKAWA Y. 1964. Studies on the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen. IV. On the chemical properties of the ejaculated semen, and the secretion of accessory sexual organs in the goat. Jap. J. An. Reprod; 10 (2): 44-51.

- LAING, J; BRINLEY, W; WAGNER, W. 1986. Fertilidad e infertilidad en la práctica veterinaria. Primera edición. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España. 296p.
- MANN, T. AND LUTWAK-MANN, C. 1981. Male Reproductive Function and Semen. New York, Springer-.Verlag.
- MANN J. 1981. Spermatological investigations in African Dwarf goats (*Capra hircus*) kept in germany. *Anim. Res. Develop*; 14: 86-100.
- MANN J. 1975. Biochemistry of semen. In Handbook of physiology. Section 7. Vol V. De. D.W. Hamilton and R.O. Greep, Washington D.C; American Physiological Society: 461-471.
- MARECO, G. 2004. Inseminación intrauterina transcervical de las cabras. Consultado el 23/02/07. disponible en: http://www.svimexico.com.mx/insem_cabras.htm
- MATTHEWS, J. 2002. Enfermedades de la cabra. 1º edición, Editorial ACRIBIA S.A. Zaragoza, España. 397 p.
- MENDOZA G; WHITE I.G. Y CHOW P. 1989. Studies on chemical components of Angora goat seminal plasma. *Theriogenology*, 32 (3): 455-466.
- PELLICER M^A T. 1996. Conservación del semen caprino. Interacción entre la secreción bulbouretral y el diluyente leche: Identificación y mecanismo de acción de los componentes en el deterioro espermático. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Univerisidad de Murcia. 200p.
- POMEROL J.M. Y ARRONDO J.L. (1994) "Práctica andrológica". Ed Científicas y Técnicas, S.A.:20-198.
- RITAR A.J. Y SALAMON S. 1982. Effects of seminal plasma and its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen – thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci*:35: 305-312

- ROBERTS, S. 1984. Obstetricia veterinaria y patológica de la reproducción. (teriogenología) Primera edición. Editorial Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires Argentina. 999p.
- ROCA J. 1989. Parámetros reproductivos del macho cabrío de raza Murcian-Grandina. Estudio experimental. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia: 191p.
- ROCA J; MARTINEZ E. Y VÁZQUE J.M. 1993. Seasonal variation in fructose and citric acid in seminal plasma of Murciano-Grandina goats. Small Ruminant Research, 10: 219-226.
- SORENSEN, Jr. 1982. Reproducción animal. Principios y prácticas. Primera Edición. McGraw-Hill. México, D.F. 539p.
- VELEZ, M. 1993. Producción de cabras y ovejas en el trópico. 1º edición
Publicación editada y producida por la Sección de Comunicación del Programa de Desarrollo Rural. Tegucigalpa, Honduras. 174 p.
- VIVANCO, M. 1998. Inseminación artificial en ovinos. Memorias del seminario Internacional: Aplicación de Técnicas biotecnológicas en la reproducción de ovinos y caprinos. Chapingo, México. pp: 135-194.