

CALIDAD DEL SEMEN CAPRINO POST-DESCONGELACIÓN AL UTILIZAR UN PROTOCOLO DE CONGELACIÓN CONVENCIONAL PARA LA ESPECIE PORCINA

POST-THAWING GOAT SEMEN QUALITY WHEN USING A CONVENTIONAL FREEZING PROTOCOL FOR PORCINE SPECIES

Galián S.^{1*}, Peinado B.¹, Almela L.¹, Poto A.¹

¹Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental. La Alberca. Murcia. España. *sgalianarnaldos@gmail.com

Keywords: Semen Quality; Frozen semen; Buck.

Palabras clave: Calidad seminal; Semen congelado; Macho cabrío.

ABSTRACT

The objective of this study was to adapt the seminal freezing protocol published by Thilmant in 1997 for the porcine species, to the goat species, making changes in the critical points of the cryopreservation process that can cause the greatest damage to the sperm cell. Thirteen goat ejaculates, corresponding to 8 bucks, were frozen and thawed with this method, with modifications in the seminal wash (use of iodixanol to reduce mechanical damage), in the use of Thilmant 1997 extender, in the addition of glycerol in 5 steps and in a temperature drop curve controlled by a computer system. Thawing was done at 56 ° C, for 12 seconds. The post-thaw semen quality results provided an average viability of 67,4%, an individual motility (MI) of 4,2, and 77,3% intact acrosomes in freshly thawed samples. They were subjected to a resistance test, and after 5 hours at 37°C, 38,5% of the samples still had an average viability greater than 50% and a MI of 3,5. We conclude that the Thilmant 1997 seminal freezing protocol can be adapted to the caprine species with good results in post-thaw seminal quality.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue el de adaptar el protocolo de congelación seminal publicado por Thilmant en 1997 para la especie porcina, a la especie caprina, efectuando cambios en los puntos críticos del proceso de crioconservación que pueden ocasionar los mayores daños en la célula espermática. Se congelaron y descongelaron con este método 13 eyaculados caprinos, correspondientes a 8 machos cabríos, con modificaciones en el lavado seminal (empleo de iodixanol para reducir el daño mecánico), en el uso del diluyente Thilmant 1997, en la adición del glicerol en 5 pasos y en una curva de bajada de temperatura controlada por un sistema informático. La descongelación se realizó a 56°C, durante 12 segundos. Los resultados en la calidad seminal postdescongelación proporcionaron un promedio de viabilidad de 67,4%, una motilidad individual (MI) de 4,2 y un 77,3% de acrosomas intactos en muestras recién descongeladas. Se las sometió a un test de resistencia, y tras 5 horas a 37°C, el 38,5% de las muestras todavía presentaban una viabilidad promedio superior al 50% y una MI de 3,5. Concluimos que el protocolo de congelación seminal de Thilmant 1997 puede ser adaptado a la especie caprina con buenos resultados en calidad seminal postdescongelación.

INTRODUCCIÓN

El futuro de la inseminación artificial (IA) en la especie caprina requiere de la criopreservación seminal para su completo éxito. Solo mediante la congelación de los gametos masculinos y su preservación a largo plazo serán posibles tanto el traslado entre explotaciones distanciadas geográficamente como la conservación para el futuro del germoplasma de machos valiosos genéticamente. La técnica de criopreservación empleada debe, lógicamente, proporcionar unos resultados óptimos de calidad seminal post descongelación, que permitan elevadas tasas de fertilidad al ser utilizadas en inseminaciones artificiales. La congelación de semen causa

daños ultraestructurales, bioquímicos y funcionales en los espermatozoides, resultando en una disminución de la viabilidad, motilidad (Leboeuf *et al.*, 2000) y capacidad fecundante de los mismos, que conlleva a una subsecuente tasa de fertilidad (31,2%, Ferrari *et al.*, 1998; 40-45%, Gibbons, 2002; 18%, Vera *et al.*, 2004) inferior si la comparamos con los resultados que proporciona el uso de semen fresco (60-80%, Lorenzo *et al.*, 1997; 65-75% Greyling & Van der Nest, 2000). Estos daños se ocasionan en las células espermáticas a lo largo de todo el proceso de manejo de las mismas para su criopreservación, siendo claves unos determinados puntos críticos del proceso. Uno de estos puntos críticos es el daño que el plasma seminal causa a los espermatozoides cuando se utilizan en el proceso de congelación diluyentes con una base de yema de huevo o de leche descremada. El problema reside en la secreción de un enzima, presente en el plasma seminal, secretada por las glándulas bulbouretrales, que hidroliza la lecitina de la yema de huevo a ácidos grasos y lisolecitina (Iritani & Nishikawa, 1963), tóxicos para los espermatozoides. En el caso de la leche descremada una fracción de una proteína llamada SBUIII, producida también por las glándulas bulbouretrales, es capaz de hidrolizar componentes de la leche produciendo productos tóxicos para los espermatozoides (Nunes *et al.*, 1982) por hidrólisis de los triglicéridos de la leche (Pellicer-Rubio & Combarnous, 1998). Para evitar estos daños, el semen es centrifugado con el fin de eliminar el plasma seminal. Pero el proceso de centrifugación es en sí mismo otro punto crítico que puede dañar a los espermatozoides, debido a la compactación que sufren estos contra las paredes del tubo de centrifuga (Waite, 2007).

Además del lavado seminal son puntos críticos importantes en el proceso de criopreservación la adición del crioprotector interno, cuya concentración va a determinar la velocidad de paso del agua a través de las membranas celulares (Ávila-Portillo *et al.*, 2006), la velocidad de bajada de la temperatura, la cual puede causar daños en la estructura celular por formación de cristales de hielo (Purdy, 2006), la composición del diluyente utilizado a lo largo de todo el proceso que va a proporcionar energía y protectores a las células espermáticas (Vera, 2009), y no menos importante la forma de descongelación de la pajuela, mediante la cual se va a restaurar el metabolismo celular (Tabarez-Rojas, 2015).

En otras especies, como la porcina, el proceso de congelación seminal se lleva a cabo con un protocolo determinado y una bajada de temperaturas controlada mediante un programa informático, (Thilmant, 1997) resultando adecuadas tasas de viabilidad y motilidad espermática.

El objetivo de este trabajo ha sido adaptar el protocolo de congelación seminal porcina publicado por Thilmant en 1997 a la especie caprina, con especial énfasis en los puntos críticos del proceso, para comprobar si es un método válido para la criopreservación del semen caprino.

Los puntos críticos considerados fueron:

- Punto crítico lavado seminal. Para intentar amortiguar los daños mecánicos que ocurren en los espermatozoides durante el proceso de centrifugación, se añadió 1 ml de Iodixanol en el fondo del tubo de centrifuga. El Iodixanol es un coloide de alto peso molecular, muy denso, que actúa a modo de “colchón” impidiendo que las células espermáticas choquen con las paredes del tubo de centrifuga, protegiéndolas de esta manera de daños que puedan ocasionarse por compactación (Waite, 2007; Galián *et al.*, 2020).
- Punto crítico composición del diluyente. El diluyente Thilmant (composición en tabla I) contiene como fuente de energía fructosa en lugar de glucosa, que proporciona un aporte energético más rápido tras la descongelación. También contiene cisteína, un aminoácido azufrado estimulante de la estabilización proteica, y dodecil sulfato sódico (SDS), como modulador de la tensión superficial. Como tampón contiene bicarbonato sódico, que mantiene el pH cercano a 7, aunque débilmente ácido.
- Punto crítico adición del crioprotector. Se añade la segunda mitad del diluyente conteniendo el crioprotector, glicerol, a una concentración del 8% (concentración final será del 4%) en 5 pasos, separados 5 minutos entre ellos. El protocolo Thilmant establece la adición en 3 pasos, lo que conlleva el cambio de la presión osmótica de 450-470 mOsm/kg del semen con diluyente sin glicerol a presiones osmóticas progresivamente mayores tras cada adición (650 mOsm/kg, 900 mOsm/kg, 1500 mOsm/kg). Agregando 2 pasos en la adición, conseguimos que este aumento de presión osmótica sea todavía más gradual, y por tanto la salida de agua del interior celular ocurra de forma más lenta, ocasionando un menor daño en las membranas debido al paso de agua a través de ellas.

Tabla I. Composición del diluyente Thilmant (Thilmant, 1997). Thilmant A. (*Table I: Composition of the Thilmant extender (Thilmant, 1997). Thilmant A).*

Fructosa	20 g.
Bicarbonato sódico (Na HCO ₃ -)	0,352 g.
Cisteína (L-Cysteine C ₃ H ₇ NO ₂ S)	0,035 g.
Yema de huevo	80 ml.
Agua destilada	272 ml.
Equex STM (Orvus es paste)	3,976 g.
Antibióticos (para un volumen de 150 ml.)	
Estreptomina	98,55 mg.
Penicilina	98,55 mg.
Lincomicina	22,5 mg.
Espectinomicina	45 mg.
Composición Thilmant B: Thilmant A + 8% de glicerol	

- Punto crítico curva térmica, bajada de temperatura. Una vez el semen empajuelado alcanzó los 5°C se introdujo en el criopreservador asociado a un programa informático, el cual lleva programado la velocidad de bajada de temperatura. Así el semen baja de 5°C a -4,5°C en 11 minutos, manteniéndose a -4,5°C durante 1 minuto más. Finalmente va disminuyendo desde los -4,5°C a una velocidad de -30°C/min hasta alcanzar los -140°C, temperatura a la cual se sumergirán las pajuelas en nitrógeno líquido, donde permanecerán almacenadas a -196°C hasta su uso.
- Punto crítico descongelación de las pajuelas. Cada pajuela fue descongelada por inmersión en un baño con agua a 56°C durante 12 segundos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron, mediante vagina artificial, 20 eyaculados de 8 machos cabríos de raza Murciano Granadina de entre 6 y 9 meses de edad, utilizándose una hembra inmovilizada como señuelo. Todos los machos se alojaban en corrales individuales de 10 m², con una superficie cubierta y un patio exterior de ejercicio. Su alimentación consistió en un 800 g por animal y día de un concentrado de piensos comerciales a base de cereales y proteínas vegetales y 2 Kg por animal y día de paja de cereales y alfalfa (Medicago sativa). Estas cantidades se depositaban en los comederos una vez al día y el animal disponía de ellos a discreción. En total la dieta de cada macho cabrío se compuso de aproximadamente 2800 Kcal/día y unos 250 g de proteína digestible por día. Cada macho dispuso siempre de agua *ad libitum*.

Cada eyaculado se recogió en un tubo atemperado a 37°C, y se midió el volumen de semen sin diluir. Estos 20 eyaculados fueron diluidos 1/10 con diluyente Krebs-Ringer-Fosfato (KRP) con glucosa (Corteel & Baril, 1974). Se les evaluó en fresco la motilidad individual (MI, calidad de movimiento individual, evaluada subjetivamente de 0 a 5, donde 0 se corresponde con todos los espermatozoides inmóviles y 5 con movimiento espermático progresivo muy rápido, (Cabodevila & Catena, 2012), el porcentaje de espermatozoides móviles (% MOV, asignando subjetivamente el tanto por ciento de espermatozoides que se mueven en la microgota con respecto del total). Los eyaculados que obtuvieron al menos una puntuación de 3,5 en MI y un 60 de % MOV fueron aptos para ser congelados. Se congelaron 13 de estos 20 eyaculados (3 pertenecían al macho 1, 2 eyaculados del macho 2, 2 eyaculados del macho 3, 2 eyaculados del macho 4, y los restantes 4 eyaculados pertenecían cada uno a 1 macho diferente).

A partir de este momento se siguió la metodología Thilmant para porcino con diversas modificaciones.

Metodología Thilmant, 1997. Semen congelado porcino.

- Semen entero fracción rica. Temperatura 30° C. Primera dilución BTS 1:1. En caso de semen caprino, la modificación consistió en la dilución 1/10 KRP con glucosa (Corteel & Baril, 1974).
- Caída de la temperatura hasta 15° C en 60 minutos. En nuestro trabajo se atemperó el semen a temperatura ambiente (unos 24°C) en aproximadamente 15 minutos.

- Centrifugación lavado seminal. Eliminación plasma seminal. Se realizó una centrifugación durante 20 minutos a 800 g utilizando 1 ml de Iodixanol en el fondo del tubo como amortiguador (Punto crítico). Una vez centrifugado, se retira tanto el sobrenadante, aspirando con pipeta Pasteur de plástico, con cuidado de no retirar el semen, como el Iodixanol, aspirando con pipeta pasteur de vidrio asociada a una jeringa, la cual se introduce hasta el fondo del tubo de vidrio. Se aspira con la jeringa todo el Iodixanol, con cuidado de no arrastrar el semen dejando solo la fracción espermática.
- Dilución con diluyente sin glicerol hasta la mitad del volumen final. Sin modificación con respecto al protocolo original (Punto crítico).
- Bajada de temperatura hasta 5 grados en 120 minutos. Sin modificación con respecto al protocolo original.
- Adición de la segunda mitad del diluyente hasta volumen final, dividido en tres veces, 1/3 cada 5 minutos. En semen caprino, se realizó la adición del diluyente con el glicerol en 5 pasos en lugar de 3, separados 5 minutos entre ellos (Punto crítico).
- Envasado en pajuelas de 0,5 ml conteniendo 750 millones de espermatozoides por pajuela. Para la especie caprina la cantidad fue de 200 millones de espermatozoides por pajuela.
- Mantenimiento de equilibración a 5 ° C, 90 minutos. Sin modificación con respecto al protocolo original.
- Curva térmica controlada por programa informático: desde 5 a -4,5°C, caída 1° C/min. Se mantiene 1 min a -4,5°C. Descenso a -30°C hasta alcanzar los -140°C. Sin modificación con respecto al protocolo original (Punto crítico).
- Temperatura final de -196° C. por inmersión de las pajuelas en nitrógeno líquido.

La descongelación se realizó sumergiendo cada pajuela en un baño con agua a 56°C durante 12 segundos. Se secó con papel y se depositó su contenido en un tubo conteniendo medio KRP a 37°C. Se mantuvo a esa temperatura durante todo el tiempo que duró su análisis. De cada pajuela descongelada se determinó la MI, el % MOV (de la misma manera que se realizó con el semen fresco). Se realizó una tinción de eosina-nigrosina (Colas & Guerin, 1980), mezclando 30 µl de muestra y 30 µl de tinción que nos permitió conocer a 400 aumentos el porcentaje de espermatozoides viables (presentan color blanco, no teñidos) que aparecía tras contar 200 células espermáticas en distintos campos. Con esta misma preparación medimos el porcentaje de morfoanomalías (Colas & Guerin, 1980) de cada muestra. La evaluación de los acrosomas se realizó diluyendo 100 µl de muestra descongelada en 400 µl de solución de acrosomas (Pursel & Johnson, 1974), observándose a 1000 aumentos en el microscopio de contraste de fases y contándose 100 espermatozoides, determinando si el acrosoma aparecía intacto o dañado. Estas evaluaciones se realizaron a las muestras recién descongeladas (hora 0) y cada hora durante 5 horas, para evaluar la resistencia de las muestras descongeladas en el tiempo. Además, se analizó mediante el sistema CASA (Computerized Assisted Sperm Analysis; ISAS®, PROISER SL., Valencia) los eyaculados correspondientes al macho que proporcionaba mayor calidad seminal mediante observación subjetiva. Cada muestra se diluyó 1:3 en tampón KRP, y una gota de esta dilución se colocó en un portaobjetos calentado a 37°C y se analizó en un microscopio de contraste de fases Leica® DM1000 a 100 aumentos. Se evaluaron los 3 eyaculados del macho 1, haciendo la media de 6 campos evaluados por cada muestra (Salmani *et al.*, 2014). Se estudiaron los parámetros de velocidad curvilínea (VLC), velocidad lineal (VSL), velocidad media (VAP), índice linealidad (LIN), índice rectitud (STR), índice oscilación (WOB), desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia batida de cola (BCF), obteniéndose los promedios en muestras recién descongeladas (H0).

Los valores promedio obtenidos de cada parámetro fueron sometidos a análisis estadístico para determinar si eran significativamente diferentes entre las distintas horas de evaluación. Se les analizó con el programa Statgraphics® Centurion mediante la prueba F en la tabla ANOVA que determina si hay diferencias significativas entre las medias, y con la prueba de Rangos múltiples, que nos indica qué medias son significativamente diferentes de otras. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, con un nivel del 95% de confianza ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Los promedios de MI y % de MOV para el semen en fresco fueron de $4,2 \pm 0,07$ y $72,8 \pm 2,4$ respectivamente (promedio \pm error estándar). Los promedios de las evaluaciones realizadas tras la descongelación se muestran en la tabla II. El semen recién descongelado mostró un porcentaje promedio de viabilidad con tinción eosina-nigrosina de 67,4%, una MI promedio de 4,2, que indica un movimiento progresivo rápido, y un 77,3% de acrosomas intactos. Se sometió a las muestras descongeladas a un test de resistencia y tras 2 horas a 37°C el promedio de viabilidad fue de 61,4% la MI de 3,6 y no varió el % de acrosomas intactos. Todos los eyaculados obtenidos mostraron espermatozoides móviles tras las primeras 2 horas post-descongelación. Tras 5 horas, 5 eyaculados de los 13 todavía mostraban espermatozoides viables y móviles, con unos promedios de 55,6% de viabilidad, 3,5 de MI y 70,9% de acrosomas intactos. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en los promedios de % de acrosomas intactos ni morfoanomalías entre las distintas horas de evaluación de las muestras. El promedio del parámetro MI no es significativamente diferente en las tres primeras horas tras la descongelación (sí lo es en la H2, pero la diferencia es mínima). En cuanto al % de MOV y % de vivos mediante TV, tampoco son estadísticamente diferentes durante las 3 primeras horas tras la descongelación. Los % de morfoanomalías oscilan entre 24,8 y 36,0 y no difieren significativamente entre las distintas horas de la evaluación.

Tabla II. Promedios obtenidos mediante evaluación microscópica subjetiva para cada uno de los parámetros evaluados, en cada una de las horas post-descongelación. Promedio \pm error estándar (*Averages obtained by subjective microscopic evaluation for each of the evaluated parameters, in each of the post-thaw hours. Average \pm standard error*).

Tiempo post-descongelación	MI	% MOV	Tinción vital (% vivos)	Acrosomas (% intactos)	% Morfoanomalías	Nº eyaculados
H0	$4,2^a \pm 0,09$	$66,9^a \pm 2,08$	$67,4^a \pm 2,6$	$77,3^a \pm 2,5$	$24,8^a \pm 3,5$	13
H1	$4,0^{a,b} \pm 0,06$	$62,7^a \pm 2,2$	$63,1^{a,b} \pm 3,8$	$77,3^a \pm 2,5$	$24,8^a \pm 2,3$	13
H2	$3,9^b \pm 0,08$	$60,8^a \pm 2,5$	$61,4^{a,b} \pm 2,7$	$77,4^a \pm 2,7$	$30,9^a \pm 4,2$	13
H3	$4,0^{a,b} \pm 0,09$	$58,3^a \pm 2,4$	$58,1^{a,b} \pm 3,2$	$67,8^a \pm 4,1$	$33,6^a \pm 5,8$	12
H4	$3,8^{b,c} \pm 0,2$	$43,1^b \pm 7,2$	$55,0^b \pm 5,3$	$74,4^a \pm 3,8$	$31,0^a \pm 8,5$	8
H5	$3,5^c \pm 0,2$	$45,0^b \pm 8,06$	$55,6^{a,b} \pm 7,1$	$70,9^a \pm 2,6$	$36,0^a \pm 7,3$	5

Letras distintas en la misma columna, indican diferencias significativas entre las distintas horas de evaluación.

Tabla III. Promedios obtenidos mediante evaluación por sistema CASA de los eyaculados del macho con mejor calidad seminal. N= 3 (*Table III: Averages obtained by evaluation by the CASA system of the ejaculates of the buck with better seminal quality. N= 3*).

Tiempo post descongelación	% MOV	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
H0	82,09	126,49	102,37	108,93	0,80	0,91	0,86	2,70	10,55
30 min.	80,8	114,52	89,65	95,96	0,76	0,89	0,83	2,76	9,99
H1	80,5	102,28	83,24	87,18	0,78	0,91	0,84	2,49	9,41
H2	71,8	118,52	103,27	108,30	0,83	0,90	0,89	2,29	8,28
H3	68,85	138,77	123,50	129,40	0,85	0,90	0,91	2,30	8,90
H4	65,9	107,88	100,17	102,61	0,88	0,93	0,93	1,74	7,76
H5	43,8	133,27	129,49	128,34	0,93	0,96	0,95	1,85	8,65

VLC: velocidad curvilínea. VSL: velocidad lineal. VAP: velocidad media. LIN: índice linealidad. STR: índice rectitud. WOB: índice oscilación.

ALH: desplazamiento lateral de la cabeza y BCF: frecuencia batida de cola.

Pudimos comparar los promedios de MI y % de MOV con los del semen fresco. El promedio de MI de las muestras en fresco no fue significativamente diferente al obtenido en las H0, H1 y H3 (con H2 las diferencias son mínimas). El promedio de % de MOV del semen fresco fue similar al de la H0. Sí muestra diferencias

significativas a partir de H1, aunque hasta H2 el promedio de espermatozoides vivos siguió siendo superior al 60%.

La evaluación mediante sistema CASA de los eyaculados correspondientes al mejor macho, arrojó valores muy favorables, con un porcentaje de un 82% de espermatozoides móviles recién descongelados y elevadas velocidades e índices de linealidad y rectitud (tabla III).

DISCUSIÓN

En la especie caprina, los valores de viabilidad y motilidad de espermatozoides descongelados no son demasiado elevados, oscilando entre un 30-40% de móviles totales (Tabarez-Rojas, 2015), similares a los resultados que obtuvieron Niño (2008) y Hernández (2014). Solo de manera aislada hay ejemplares que alcanzan valores de viabilidad superiores al 50% (Dorado *et al.*, 2009; Konayali *et al.*, 2013). Estos bajos valores de viabilidad post-descongelación indican que la técnica de criopreservación seminal en caprinos necesita depurarse para ser utilizada de forma rutinaria en IA. Nuestros resultados adaptando el protocolo de congelación seminal porcina publicado por Thilmant en 1997 a la especie caprina han arrojado muy buenos valores de calidad seminal tras la descongelación, con un promedio de viabilidad espermática de 67,4%, y un 66,9% de spz. móviles en semen recién descongelado. El test de resistencia muestra que tras 5 horas mantenido a 37°C algunos de los eyaculados aún superan el 50% de espermatozoides viables, y transcurridas dos horas tras la descongelación, los 13 eyaculados analizados mantienen una viabilidad y motilidad promedio superior al 60%, con una calidad de MI mayor a 3, por lo que pueden ser utilizados para IA pasadas dos horas de su descongelación. Las diferencias estadísticas obtenidas entre los promedios de los diferentes tiempos de evaluación también avalan este tiempo óptimo de 2 horas, pues los promedios no difieren significativamente con respecto a los obtenidos inmediatamente tras la descongelación.

Atendiendo a los valores que nos proporcionó la evaluación mediante el sistema CASA, éstos son superiores a los encontrados en la bibliografía. Así, Tabarez-Rojas (2015) encontró en machos cabríos de 1 año de edad un promedio de espermatozoides móviles totales (MT) de 39,6% tras utilizar en la congelación un diluyente con un 15% de yema de huevo fresco. Hernández (2014) obtuvo como mejor resultado un 30,4% MT. Según el diluyente utilizado se reportan resultados muy dispares en la motilidad espermática postdescongelación evaluada con el sistema CASA. Roof *et al.* (2012) obtuvieron valores de 49,4 % y 19,6% de espermatozoides móviles con dos diluyentes distintos. Konayali *et al.* (2013) evaluaron el diluyente tris con dos concentraciones de yema de huevo y otro de leche descremada obteniendo promedios de motilidad espermática de 58,2%, 70,1% y 69,7%. Estas diferencias son un ejemplo de la importancia del diluyente en los resultados de motilidad post descongelación. Nuestros promedios de motilidad espermática evaluados con el sistema computarizado son preliminares, puesto que pertenecen a un solo macho con muy buena calidad seminal, de ahí sus buenos valores. Son necesarios estudios en un mayor número de machos y eyaculados por este método.

El siguiente paso será probar la fertilidad de estos espermatozoides descongelados en ensayos de IA con hembras caprinas de la raza, para determinar si los buenos resultados obtenidos *in vitro* se traducen en unas tasas de preñez que los hagan adecuados para establecer este protocolo de crioconservación espermática como un método válido para la especie caprina.

CONCLUSIONES

La metodología de criopreservación espermática publicada por Thilmant, (1997) para la especie porcina proporciona una buena calidad seminal postdescongelación en la especie caprina, tras realizar adaptaciones en los puntos críticos del proceso, de manera preliminar en los estudios realizados *in vitro*.

Al menos *in vitro*, después de la descongelación las células permanecen con muy buena actividad durante más de dos horas, tiempo suficiente para que sean colocadas en el tracto genital mediante inseminación artificial. Deben realizarse ensayos *in vivo* de IA con el semen caprino congelado por este método para comprobar su tasa de fertilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Ávila-Portillo LM., Madero JI., López C., León MF., Acosta L, Gómez C., Delgado LG., Gómez C., Lozano JM. Y Reguero MT. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*, 57: 291-300.
- Cabodevila J, Catena M. 2012. Evaluation of freezing bovine semen. (Evaluación de semen bovino congelado). www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/evaluacion-semen-bovino-congeleado-t29765.htm
- Colas, G. y Guérin, Y. 1980. Seasonal variations in semen quality in the Ile-de-France ram. I. Study of cell morphology and mass motility. (Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile-de-France. I. Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale). *Rep. Nutr. Dévelop.* 20(6), 1789-1799.
- Corteel, J. M., y Baril, G. 1974. Viabilité des spermatozoïdes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal: effet du glucose. In *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* (Vol. 14, No. 4B, pp. 741-745). EDP Sciences.
- Dorado, J., Hidalgo, M., Muñoz, A. y Rodríguez, I. 2009. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Animal Reproduction Science* 112 : 150–157
- Ferrari, S., Leinz, F. y Bernanbe, VH. 1998. Inseminação Artificial em cabras com sêmen congelado: Resultados preliminares. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 35(5): 223-224.
- Galián, S., Peinado, B., Poto, A., Almela, L. 2020. Effect of Seminal Centrifugation with Iodixanol on the Sperm Quality of Goat Semen. *J Anim Sci Res* 4(1): [dx.doi.org/10.16966/2576-6457.135](https://doi.org/10.16966/2576-6457.135). ISSN 2576-6457.
- Gibbons, A. 2002. Inseminación artificial con semen congelado en cabras de raza Angora. *Taurus*, 16: 24-32.
- Greyling, JPC., y Van der Nest, M. 2000. Synchronization of oestrus in goats: dose effect of progestagen. *Small Ruminant Research*, 36(2), 201-207.
- Hernández, L. 2014. Evaluación de La Motilidad Espermática de Semen Caprino Criopreservado Bajo Diferentes Medios Diluyentes a través del Sistema Casa (Doctoral dissertation, Tesis), Universidad Nacional Abierta y a distancia (UNAD), Escuela de Ciencias Agrícolas Pecuarias y del Medio Ambiente, Especialización en Mejoramiento Genético, Cucutá-Colombia, pp-pp, 1-56,[09 de agosto del 2018]. <https://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php>.
- Iritani, A., y Nishikawa, Y. 1963. Studies on the egg-coagulating enzyme in goat semen: IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. *Jpn J Anim Reprod*, 8(4), 113-117.
- Konayaly, C., Tomas, C., Blanch, E., Gomez, E., Graham, j. y Moce, E. 2013. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology* En: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.06.001>
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 62: 113-141.
- Lorenzo, M., Fresno, M., Darmain, N., Molina, A., y Ramos, R. 1997. Estudio del comportamiento reproductivo y calidad seminal de los machos y de la fertilidad mediante inseminación artificial en la Agrupación caprina Canaria. XXII Jornadas Científicas SEOC. Avances en Alimentación y Mejora Animal, 37. (4-5). Puerto de la Cruz, Tenerife (España), 6-8 Oct., Actas de resúmenes: 307-318.
- Niño, T. 2008. Congelación y conservación del semen en la especie caprina mediante la utilización de ultracongeladores de-152°C: Tasa de fertilidad tras inseminación con semen congelado por diferentes protocolos de crioconservación. https://bibacceda01.ulpgc.es/bitstream/10553/6639/1/0231633_00031_0004.pdf
- Nunes, J., Corteel, JM., Combarnous, Y. y Baril, G. 1982. Role du plasma séminal dans la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. *Reproduction, Nutrition and Development*, 22:611-620.
- Pellicer-Rubio, MT. y Combarnous, Y. 1998. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by bulbourethral lipase BUSgp60. *Journal of reproduction and fertility*. 122: 95-105.
- Purdy PH. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small ruminant research*. 63: 215-225.
- Pursel, VG. Y Johnson, LA. 1974. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology* 1: 638-641.
- Roof, D., Bowley, S., Price, L. y Matsas, D. 2012. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology* 77, 412–420.
- Salmani H, Towhidi A, Zhandi M, Bahreini M & Sharafi M. 2014. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*, 68(2): 276–280. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.02.008.
- Tabarez Rojas, A. 2015. Optimización del protocolo de crioconservación de semen caprino de la raza autóctona en peligro de extinción Blanca de Rasquera. Universitat Autònoma de Barcelona. <https://ddd.uab.cat/record/12879>

- Thilmant, P 1997. Freezing of boar sperm in 0.5ml straw. Results in the field (Congelation du sperme de verrat en poillete de 0.5ml. Resultats sur le terrain). Ann. Med. Vet. 141; 457-462.
- Vera, TA., Chagra Dib, EP., Leguiza, HD., Brizuela, R. y Valdivia, CL. 2004. Incidencia del tipo de servicio sobre parámetros reproductivos de cabras criollas en Los Llanos de La Rioja. *Revista Argentina de Producción Animal*, 24(1): 273-274.
- Vera, TA. 2009. Evaluación de viabilidad y fertilidad de espermatozoides caprinos congelados con diluyente sin proteína animal y el agregado de plasma seminal pos descongelado (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata).
- https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/7795/INTA_CIPAF_IPAFNOA_Vera_TA_Evaluacion_de_viabilidad_y_fertilidad_de_espermatozoides_caprinos.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Waite, J. A. 2007. Cushioned centrifugation of stallion semen: factors impacting equine sperm recovery rate and quality. (Doctoral dissertation, Texas A&M University).