

**EVALUACIÓN DE VIABILIDAD Y FERTILIDAD DE
ESPERMATOZOIDES CAPRINOS CONGELADOS CON
DILUYENTE SIN PROTEÍNA ANIMAL Y EL AGREGADO DE
PLASMA SEMINAL POS DESCONGELADO**

Tomás Aníbal Vera

Trabajo de tesis para ser presentado como requisito parcial para obtener al
título de **MAGÍSTER SCIENTIAE en PRODUCCIÓN ANIMAL**

Orientación en Reproducción y Sanidad Animal

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

Lugar de realización:
Estación Experimental Agropecuaria Balcarce,
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

Balcarce, Argentina

Septiembre de 2009

**EVALUACIÓN DE VIABILIDAD Y FERTILIDAD DE
ESPERMATOZOIDES CAPRINOS CONGELADOS CON
DILUYENTE SIN PROTEÍNA ANIMAL Y EL AGREGADO DE
PLASMA SEMINAL POS DESCONGELADO.**

Autor: -----

Tomás Aníbal Vera
Med. Vet.

Director de tesis: -----

Ricardo Alberio.
Med. Vet.; Dr.

Asesor:-----

Juan Aller Atucha
Med. Vet.; M. Sc.

Asesor: -----

Federico Hozbor
Med. Vet.; Dr.

Asesor:-----

Jorge Cabodevila
Med. Vet.; Dr.

**EVALUACIÓN DE VIABILIDAD Y FERTILIDAD DE
ESPERMATOZOIDES CAPRINOS CONGELADOS CON
DILUYENTE SIN PROTEÍNA ANIMAL Y EL AGREGADO DE
PLASMA SEMINAL POS DESCONGELADO.**

Tomás Aníbal Vera

Aprobada Por:

Director de Tesis: Ricardo Alberio, Med. Vet.; Dr.

Evaluador Externo: Humberto Cisale, Med. Vet.; Dr.

Egoísta sería desconocer el esfuerzo “obligado” de las personas que más amo en mi vida, las que durante este tiempo, a cada momento, pusieron la cuota necesaria de paciencia para que concluyera este trabajo y “aguantaron” mis ausencias. A ellos que son parte inseparable de mi vida, mi amor, mis sueños y el motor de mi superación.....mi eterna gratitud y amor, les dedico este trabajo:

A Raquel, Rodrigo, Emiliano, Lautaro y Reyna.

En primer lugar quiero agradecer al pueblo de mi país, quien a través del INTA, confió en mí, permitiendo la concreción de este trabajo y mi sueño.

No puedo dejar de mencionarlo a mi padre, el “Kelo” un visionario del árido, quien seguramente disfruta al igual que yo este logro, que era muy lejano y remoto cuando comenzó en cada uno de sus hijos. A mi madre (Alicia), hermanos (Juan Carlos, Ana Celia y Marcos), al resto de la numerosa familia Vera y Brizuela que apoyaron en lo pequeño y lo grande todo nuestro esfuerzo.

Al Grupo de Reproducción del INTA Balcarce por el lugar que me brindo, lo que permitió este trabajo, por todo lo que me enseñaron y apoyaron. En especial a Federico, Eduardo, Carlos, Nati, Pablo “Efecto”, Memo, Glenda, Nicolás y Germán.

Al pequeño pero “poderoso” grupo de posgrado que adobo, durante el tiempo de cursado de UVAC’s, una amistad mezclada de sueños y “apuros” a Milo, Diego, Jorgelina, Daniel, Pato, Paula, Alejandro, Jorge, Javieres, Joseba, Carol, Guadalupe, José, Leo, Fernando, Marita, Marcelo, Nico Govanini, Germán Berone , Lilita, Claudia y Adriana.

Al resto de los compañeros del “Chinchorro”, “la especialidad” y a los de las “aventuras deportivas del futbol 5 y la cerveza posterior”.

Al grupo de íntimos que condimento con su amistad lazos eternos, a los Aguilar, los Hozbor, los Sanchez, a Mariano y Johny.

Al material experimental, “mis cabras” criollas o no, y “las personas que las poseen” que endulzan y estimulan mi vida desde que recuerdo.

A Carlos, Pedro, Lisandro, los compañeros del grupo caprino (Daniel, Patricia, Rubén, Armando, Colo, Jorge, Miguel y Felipe), y resto de integrantes del INTA La Rioja por acompañarme, esperarme, aguantarme, estimularme y por sobre todas las cosas, por enseñarme y su paciencia.

A los que nos desalentaron e intentaron poner piedras en nuestro camino, un consejo “el tiempo que ocupan en hacer daño utilícenlo para construir y verán que bien se siente....y cultiven la humildad”, de todas formas gracias por su “apoyo” que finalmente logró que llegáramos a nuestra meta.

A todos quienes nos conocieron en nuestro paso por “Balcarce” y los que esperaron nuestro regreso a “Chamical”, quienes en definitiva hicieron posible soportar la “tortura del posgrado teniendo familia”....a todos los nombrados y los que faltan: GRACIAS POR ESTAR EN MI CORAZON!!!! y perdón si les rompí algo (pero es mi naturaleza-sic).

INDICE GENERAL

Título	Página
Resumen:	xiii
Abstract	xiv
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- HIPÓTESIS	3
1.2.- OBJETIVO GENERAL	3
1.3.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:	5
2.1.- ASPECTOS GENERALES DE LA ESPECIE CAPRINA	5
- Características de los caprinos	5
- La Raza Criollo. Generalidades, características morfoestructurales, productivas y reproductivas:	5
- La Raza Saanen. Generalidades, características morfoestructurales, productivas y reproductivas:	8
2.2.- CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS Y FISIOLÓGICAS DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA ESPECIE CAPRINA.	10
- Aparato reproductor femenino	10
- Ciclo estral, foliculogénesis, control hormonal y ovulación	10
- Aparato reproductor masculino:	13
- Semen:	15
- El espermatozoide. Espermatogénesis.	15
- Morfología y estructura del espermatozoide caprino.	17
- Composición de las membranas plasmáticas espermáticas.	20
- Lípidos constituyentes de la membrana del espermatozoide	21
- Proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide	22
- Dominios de la membrana plasmática del espermatozoide	23
- Maduración en el epidídimo.	25
- Plasma Seminal. Origen, composición, finalidad e importancia.	27
- Cambios en el espermatozoide durante su tránsito por el tracto reproductor femenino.	30
- Capacitación e hiperactivación espermática.	31
- Reacción acrosómica.	33
2.3.- TÉCNICAS ASISTIDAS DE REPRODUCCIÓN EN LOS CAPRINOS	36
- Inseminación Artificial	36
- por vía vaginal	36
- por vía cervical	37
- por vía laparoscópica	37
- Eficiencia reproductiva de la fertilidad <i>in vivo</i> por inseminación artificial	38
2.4.- PROCESAMIENTO DEL SEMEN	42
- Métodos de recolección del semen: vagina artificial	43
- Características Seminales del Caprino:	43
- Características generales de la criopreservación de espermatozoides	49
- Diluyentes y crioprotectores	49
2.5.- CONGELADO DE LOS ESPERMATOZOIDES.	52
- Efecto del descenso térmico sobre las estructuras celulares.	53
- Shock Térmico o Por Frío	54
- Shock Osmótico	55
- Diluyentes en la especie caprina	56
- Características de un diluyente seminal	56
- Diluyentes en base a crema de leche	56
- Diluyentes en base a yema de huevo	57
Título	Página
- Diluyentes en base a Lecitina de soja	58

- Refrigeración y equilibramiento del semen previo al Congelado	59
- Curva de descenso de la temperatura.	59
- Reacción entre constituyentes del plasma seminal caprino y constituyente de los diluyentes.	60
- Procesamiento del semen previo a la congelación de espermatozoides caprinos - Lavado seminal -	62
- Descongelado del Semen criopreservado.	63
2.6.- EVALUACIÓN “IN VITRO” DE LA CALIDAD SEMINAL O ESPERMÁTICA POS DESCONGELADO	64
- Motilidad Individual Progresiva	65
- Vigor	66
- Funcionalidad de la Membrana Plasmática (HOS test) o Test Hiposmótico	67
- Espermatozoide Vivos	67
- Anomalías Espermáticas	68
- Integridad del Acrosoma	69
- Prueba de Termorresistencia	69
- Comparación de razas	71
- Conservación en Nitrógeno Líquido. Efecto del Tiempo de Almacenamiento.	71
- Agregado de plasma seminal pos descongelado en la supervivencia espermática.	72
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	74
3.1.- MATERIAL EXPERIMENTAL Y EXPERIMENTOS PLANTEADOS	74
- Aspectos generales	74
- Lugar y Fecha de realización de los experimentos	74
- Drogas y Reactivos	75
- Semen y Plasma Seminal caprino	75
3.2.- MÉTODOS DE EVALUACIÓN, PROCESAMIENTO, REALIZACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS, DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	75
- Colecta y procesamiento del semen	75
- Métodos de valoración cuali-cuantitativa del semen fresco para congelación u obtención de plasma seminal.	75
- Volumen del eyaculado	76
- Motilidad Microscópica Masal	76
- Motilidad Progresiva Individual	76
- Vigor Espermático	77
- Procesamiento del semen y plasma seminal. Conformación de los pools de semen por raza y por tratamiento	77
- Concentración espermática del <i>pool</i> para la dilución de cada tratamiento	78
- Procesamiento, congelado y descongelado del semen y plasma seminal	79
- Eliminación del plasma seminal del semen a congelar	79
- Congelado del <i>pool</i> de semen	79
- Obtención, procesamiento y congelado del plasma seminal	80
- Descongelado del semen	81
- Descongelado del plasma seminal	81
- Métodos de valoración cuali-cuantitativa de las muestras de semen congelado-descongelado y con agregado de plasma seminal	81
- Motilidad Progresiva Individual y Vigor	82
- Coloración vital	82
- Morfología Espermática	83
- Concentración Espermática	83
Título	Página
- Prueba de Termorresistencia	83

- Prueba de Endósmosis o Hipoosmótica	84
- Agregado de plasma seminal a muestras de semen congelado-descongelado	84
3.3. EXPERIMENTOS:	85
- Experimento 1: Valoración cuali-cuantitativa de las muestras de semen congelado-descongelado.	85
- Experimento 2: Prueba de fertilidad “ <i>in vivo</i> ”, comparación de tratamientos de congelación.	86
- Inducción y Sincronización de celos e Inseminación Artificial	86
- Diagnóstico de gestación	87
- Experimento 3: Valoración cuali-cuantitativa de las muestras de semen congelado-descongelado con y sin agregado de plasma seminal en razas Criollo y Saanen.	87
3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	87
- Experimento 1: Valoración cuali-cuantitativa de las muestras de semen congelado-descongelado.	88
- Experimento 2: Prueba de fertilidad “ <i>in vivo</i> ”	89
- Experimento 3: Valoración cuali-cuantitativa de las muestras de semen congelado-descongelado, con y sin agregado de plasma seminal.	90
3.5. ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA EN CADA EXPERIMENTO.	91
4. RESULTADOS	94
4.1.- MATERIAL PROCESADO Y UTILIZADO	94
4.2.- EXPERIMENTO 1: COMPARACIÓN DE DILUYENTES DE CONGELACIÓN, TIEMPO DE ALMACENAMIENTO y RAZA	95
- Evaluaciones realizadas a Tiempo 0	95
- Motilidad Individual Progresiva (MIP)	95
- Vigor	96
- Prueba de Endosmósis o Hipoosmótica	97
- Espermatozoides vivos (%)	98
- Espermatozoides Normales (%)	98
- Acrosómas dañados (%)	99
- Evaluaciones realizadas a Tiempo 2	100
- Motilidad Individual Progresiva	100
- Vigor	101
4.3. EXPERIMENTO 2: PRUEBA DE FERTILIDAD “IN VIVO”, COMPARACIÓN DE DILUYENTES DE CONGELACIÓN.	101
4.4.- EXPERIMENTO 3: EVALUACIÓN DEL AGREGADO DE PLASMA SEMINAL POSDESCONGELADO, SU EFECTO SOBRE LAS RAZAS Y LOS DILUYENTES DE CONGELACIÓN	102
- Evaluaciones realizadas a tiempo 0	102
- Motilidad Individual Progresiva	103
- Vigor	103
- Prueba de Endosmósis o Hipoosmótica	104
- Espermatozoides vivos (%)	104
- Espermatozoides Normales (%)	105
- Acrosomas dañados (%)	106
- Evaluaciones realizadas a Tiempo 2	107
- Motilidad Individual Progresiva	107
- Vigor	108
5.- DISCUSIÓN	110
Experimento 1	110
Título	Página
Efecto de los tratamientos sobre la motilidad individual progresiva evaluada	111

al descongelado (Tiempo 0).	
Efecto del Tiempo de Almacenamiento en nitrógeno líquido sobre la motilidad individual progresiva evaluada al descongelado (Tiempo 0)	114
Efecto de los tratamientos y del tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido sobre el vigor evaluado al descongelado (Tiempo 0)	115
Efecto de los tratamientos y el Tiempo de Incubación a 37° C sobre la Motilidad Individual Progresiva y el vigor evaluados después de dos horas de cultivo	116
Efecto de los tratamientos sobre la funcionalidad de la membrana plasmática evaluada al descongelado (Tiempo 0)	118
Efecto de los diluyentes sobre el porcentaje de espermatozoides vivos evaluado al descongelado (Tiempo 0)	119
Efecto de los tratamientos y el Tiempo de Conservación en nitrógeno líquido sobre las anomalías espermáticas evaluadas al descongelado (Tiempo 0).	122
Efecto de los tratamientos sobre la Integridad del Acrosoma evaluado al descongelado (Tiempo 0)	123
Efecto del tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido sobre la funcionalidad de la membrana plasmática (test hipoosmótico), el porcentaje de espermatozoides vivos y la integridad del acrosoma (evaluaciones realizadas al momento de la descongelación)	125
Experimento 2	126
Experimento 3	130
Efecto del agregado Posdescongelado de Plasma Seminal y del efecto Raza sobre los parámetros seminales evaluados	130
Efecto del agregado de Plasma Seminal Posdescongelado y la Raza sobre la Motilidad Individual Progresiva y el vigor evaluados después de dos horas de cultivo a 37° C.	134
6. CONCLUSIONES	138
6.1.- RECOMENDACIONES A PARTIR DE LOS RESULTADOS	138
Experimento 1	138
Experimento 2	139
Experimento 3	140
7.- BIBLIOGRAFIA.	141
8.-APENDICE	164
Apéndice I: Soluciones	164
1.1. Preparación de la solución de citrato de sodio 2,92%	164
1.2. Preparación de la coloración supravital	164
1.3. Solución Fisiológica Formolada 1%	165
1.4. Preparación de la solución de Tris-Lavado	165
1.5. Preparación de los diluyentes seminales.	166
1.6. Preparación de la solución de Endósmosis o Hipoosmótica y solución de Hos stop	167
Apéndice II: Lecitina de Soja, de yema de huevo y fosfolipasas	169
- Lecitina de huevo y Lecitina de soja:	169
- Fosfolipasas:	171

INDICE DE TABLAS

Número	Título	Página
Tabla 1:	Pesos al nacimiento de cabritos criollos según época de nacimiento, tipo de parto y sexo.	7
Tabla 2:	Fertilidad después de una inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado.	40-41
Tabla 3:	Características de un eyaculado (concentración espermática, volumen, espermatozoides vivos y motiles) obtenido por medio de vagina artificial, valor de circunferencia escrotal y la fertilidad.	46-48
Tabla 4:	Pastillas elaboradas durante las sesiones de congelado.	94
Tabla 5:	Cantidad de pastillas utilizadas en cada experimento.	95
Tabla 6:	Motilidad Individual progresiva (MIP) de los Tratamientos y los meses de Almacenamiento a Tiempo 0 (media \pm e.e. en %)	96
Tabla 7:	Funcionalidad de la membrana plasmática de los Tratamientos y Tiempos de almacenamiento a Tiempo 0 (media \pm e.e. en %)	98
Tabla 8:	Espermatozoides vivos de los Tratamientos y Tiempo de Almacenamiento a Tiempo 0 (media \pm e.e. en %)	98
Tabla 9:	% de Espermatozoides con acrosomas dañados en los Tratamientos y Tiempo de Almacenamiento a Tiempo 0 (media \pm e.e. en %)	100
Tabla 10:	Efecto de los tratamientos y Tiempo de Almacenamiento sobre la Motilidad Individual Progresiva a Tiempo 2 (media \pm e.e. en %)	101
Tabla 11:	Efecto de los tratamientos y el tiempo de almacenamiento sobre el Vigor a Tiempo 2 (media \pm e.e. en %)	101
Tabla 12:	Efecto de los Tratamiento sobre la fertilidad "in vivo" (media \pm e.e. en %)	102
Tabla 13:	Efecto del plasma seminal, la raza y los tratamientos sobre la MIP a Tiempo 0 (media \pm e.e. en %)	103
Tabla 14:	Vigor observado en el plasma seminal, las razas y los tratamientos a Tiempo 0 (media \pm e.e. en %)	104
Tabla 15:	Efecto del agregado de plasma seminal, la raza, los tratamientos sobre la funcionalidad de la membrana plasmática a Tiempo 0 (media \pm e.e. en %)	104
Tabla 16:	Efecto del agregado de Plasma seminal, la Raza y los Tratamientos sobre el Vigor a Tiempo 2 (media \pm e.e. en %)	109
Tabla XVII:	Componentes de la solución de citrato de sodio 2,92%	164
Tabla XVIII:	Componentes de la coloración supravital de eosina-nigrosina (2%)	165
Tabla XIX:	Componentes de la solución Formolada 1%	165
Tabla XX:	Componentes de la Solución de Lavado de los espermatozoides (100 ml.)	166
Tabla XXI:	Componentes del diluyente para congelación Tris 2 % de yema de huevo (100 ml.)	167
Tabla XXII:	Componentes del diluyente para congelación Tris 12 % de yema de huevo (100 ml.)	167
Tabla XXIII:	Componentes del diluyente para congelación Bioxcell® (100 ml.)	167
Tabla XXIV:	Componentes de la solución de Endósmosis o Hipoosmótica	168
Tabla XXV:	Componentes de la solución de Hos Formol 3%	168

Número	Título	Página
Tabla XXVI:	Composición relativa (%) de Fosfolípidos encontrados en las lecitinas de la yema de huevo y la soja	169
Tabla XXVII:	Composición relativa de ácidos grasos en los fosfolípidos de la yema de huevo y de la soja	171

INDICE DE FIGURAS

Número	Título	Página
Figura 1	Aparato Reproductor del macho caprino	13
Figura 2	Esquema de la Espermiogénesis	16
Figura 3	Morfología y estructura del espermatozoide caprino	17
Figura 4	Cabeza del Espermatozoide y estructuras que se distinguen en ella	18
Figura 5	Cola del espermatozoide y Partes que la componen	19
Figura 6	Composición de la membrana celular	20
Figura 7	El espermatozoide y sus dominios. Representación esquemática	25
Figura 8	Modelo hipotético de los mecanismos de regulación de la capacitación espermática	32
Figura 9	Tres estadios de la reacción acrosómica.	34
Figura 10	Participación de canales de Ca^{2+} durante la reacción acrosómica en el espermatozoide de los mamíferos	35
Figura 11	Esquema de la metodología utilizada para el experimento 1 y 3.	92
Figura 12	Esquema de la metodología utilizada para el experimento 2.	93
Figura 13	Efecto de la interacción de los Tratamientos y el Tiempo de Almacenamiento sobre el vigor a T0 de espermatozoides caprinos congelados/descongelados (medias \pm e.e.).	97
Figura 14	Efecto de los tratamientos y Tiempo de Almacenamiento sobre los espermatozoides congelados/descongelados de caprinos sin alteraciones de conformación (media \pm e.e.)	99
Figura 15	Efecto de la interacción de los Tratamientos y las Razas sobre el porcentaje de espermatozoides vivos luego del descongelado a tiempo 0 (media \pm e.e.).	105
Figura 16	Efecto del agregado de Plasma Seminal y la Raza sobre el porcentaje de Espermatozoides normales luego del descongelado a Tiempo 0 (media \pm e.e.)	106
Figura 17	Efecto de la interacción agregado pos descongelado de Plasma Seminal y de la Raza sobre el porcentaje de espermatozoides con acrosomas dañados a Tiempo 0 (media \pm e.e.)	107
Figura 18	Efecto del agregado de Plasma Seminal y la Raza sobre Motilidad Individual Progresiva de Espermatozoides congelados/descongelados de caprinos a Tiempo 2 horas (media \pm e.e.)	108
Figura XIX	Estructura básica de los glicofosfolípidos	170
Figura XX	Acción de las fosfolipasas sobre la estructura de los Fosfolípidos	172

RESUMEN:

El plasma seminal (**PS**) de caprinos interactúa con componentes de la yema de huevo (**YH**) produciendo daños al espermatozoide (**Spz**). El congelado-descongelado altera los Spz afectando la fertilidad (**F**) del semen (**S**). La calidad (**C**) del semen congelado se deteriora en los 6 meses posteriores a su congelación en nitrógeno líquido. En otras especies, la resuspensión pos descongelado de Spz en PS mejoró su C. Los objetivos del presente trabajo fueron: Comparar el comportamiento de la C espermática *in vitro* (**iv**) de semen caprino (**SC**) congelado (**Cong**) en un diluyente sin proteína de origen animal y dos con diferente contenido de YH; Evaluar si existe deterioro de la calidad *iv* del SC durante 6 meses de conservación en N₂ líquido (**N₂L**); Comparar la F *in vivo* (**ivv**) del S Cong en los tres diluyentes evaluados en la raza Saanen; Determinar si la adición de PS caprino a espermatozoides congelados/descongelados mejora la calidad espermática; Evaluar si la “raza” afecta la calidad espermática del semen congelado/descongelado. Realizándose 3 experimentos donde se evaluaron: **1°**: Los efectos de los Tratamientos (**T**) de Cong y el tiempo de almacenamiento en N₂L (**T1**: dilución en Tris-Acido Cítrico-Fruktosa (**TCF**)+YH 2%; **T2**: lavado de los Spz y luego dilución en **TCF+YH** 12% y **T3**: dilución en medio comercial a base de lecitina de soja (**LS**): “Bioxcell”®-IMV); **2°**: La F *ivv* de los T de Cong en la raza Saanen y **3°**: El efecto de la raza y del agregado de PS pos descongelado. Los experimentos 1 y 3, se analizaron mediante ANOVA ($p < 0,05$) utilizando un DBCA, usando el PROC MIXED y en el 2 se analizó a través del PROC GENMOD (SAS V 8.0). Concluyendo que el SC Cong en diluyente con LS no presenta mayor C espermática *iv* ni mayor F *ivv* que el S Cong en diluyentes conteniendo YH. En los 6 meses de almacenamiento en N₂L evaluados, el SC pierde algunas características que hacen a su C. La adición pos descongelado de PS homólogo en la raza Criollo luego de 2 horas de incubación mejora la motilidad y el vigor de los Spz. La raza no afecta la C espermática del semen congelado/descongelado.

Palabras Clave: Macho Caprino, Semen Congelado, lecitina de soja, evaluación *in vitro* e *in vivo*, Plasma seminal.

ABSTRACT

The seminal plasma (**SP**) of goats interacts with components of the egg yolk (**EY**) producing damages to the sperm (**Spz**). The frozen-thawed alters the Spz affecting the fertility (**F**) of the semen (**S**). In the first six months of conservation in liquid N₂ (LN₂) report of exists deterioration of viability (**V**) of frozen (**Frz**) semen. In other species, the resuspension pos thawed of Spz in SP improved his V. The aims of the present work was: To compare the in vitro (**iv**) behavior of the spermatic V of goats semen (**GS**) Frz in a extender without protein of animal and two with EY's different content; To evaluate if there exists deterioration of the *iv* quality of Frz GS in the six months of conservation in LN₂; To compare the *F in vivo* (*ivv*) of extenders of GS Frz in Saanen goats; To determine if the addition pos thawing of SP of the Saanen and Criollo goats it improves the motility and spermatic survival of the evaluated extenders; To evaluate if the "breed" affects *iv* spermatic survival. Three experiments being realized where they were evaluated: 1°: The effects of the Treatments (T) of Frz and the time of storage in LN₂ (T1: dilution in Tris- Citric acid-Fructosa (TCF) +EY 2 %; T2: wash of the Spz and then dilution in TCF+YH 12 % and T3: dilution in commercial extender based on soybean lecithin (SL - "Bioxcell" ®-IMV); 2°: The *F in vivo* of the T de Frz in the breed Saanen and 3°: The effect of the breed and the pos thawed addition of SP. The experiments 1 and 3, were analyzed by means of ANOVA (p <0.05) using a DBCA and the PROC MIXED and in experiment 2 it was analyzed across the PROC GENMOD (SAS V 8.0). Concluding that the Frz GS in extender with SL no presents neither *iv* spermatic V nor major *ivv* F that the S Frz in extenders containing EY's. In 6 months of storage in LN₂ evaluated, the S loses V. The addition pos thawed of equivalent PS in the breed Criollo improves the motility and the vigor of the Spz. The breed does not affect the *iv* spermatic survival.

Key Words: Buck, frozen semen, Soybean Lecithin, *in vitro* and *in vivo* evaluation, Seminal Plasma.

1.- INTRODUCCIÓN

La ganadería caprina en nuestro país desarrolla sus actividades para la producción de carne y pelo en sistemas extensivos o semi intensivos de cría en zonas áridas y semi áridas, donde los regímenes pluviométricos no superan los 500 mm/año. En cambio la explotación lechera es una actividad desarrollada en sistemas de explotación intensivos, desenvolviéndose principalmente en los oasis dentro de las zonas de cría o en áreas geográficas (Zona sub-húmeda y húmeda) que permiten la implantación de pasturas y cereales para cubrir las exigencias nutricionales de esta actividad.

Ambas actividades productivas en las últimas décadas han mostrado una notable expansión. Producto del interés despertado son los numerosos programas nacionales y provinciales de apoyo a ambas actividades y la existencia de una ley nacional de promoción y apoyo a las actividades caprinas. Otro reflejo, son las importaciones de animales en pie, semen y embriones de razas tanto para leche como para carne y pelo realizadas a fines de la década pasada; además de la presencia, cada vez mas común, de productos elaborados con subproductos caprinos en supermercados y centros comerciales.

La inseminación artificial (IA) es la herramienta ideal para la difusión de biotipos adecuados a nuestra realidad productiva, para el control de la reproducción y para implementar programas de mejora genética en cada una de las actividades productivas de esta especie.

El caprino es una especie de actividad reproductiva estacional, afectada por numerosos factores como la raza, la edad, la época de nacimiento, la temperatura ambiente, la presencia de machos o hembras, el estado nutricional y el fotoperíodo (Tron, 1986; Roca, 1991; Restall, 1992; Walkden Brown *et. al.*, 1993; Álvarez Ramírez *et. al.*, 1999; Rivera, 2003). Debido a ello, la inducción y sincronización de los celos asociada con la IA permite concentrar los nacimientos en un limitado periodo, lo que facilita cubrir los requerimientos nutricionales y permite manifestar actividad sexual en contra estación reproductiva, etc.

En nuestro país, estas tecnologías han tenido hasta el presente una escasa difusión. Pero no es de descartar que en un futuro cercano, de la mano del desarrollo

alcanzado por el sistema productivo y los programas de selección local, la IA alcance la difusión de otras regiones del mundo. Una de las limitantes de la difusión de esta técnica reproductiva lo ha constituido la dificultad que existe en lo referente a la crioconservación del semen de caprino.

En esta especie, el mayor problema encontrado está vinculado con la relación negativa existente entre el plasma seminal y algunos de los constituyentes de los medios de preservación, particularmente la leche descremada y la yema de huevo. Esta interacción se traduce en una disminución de la motilidad y viabilidad del semen criopreservado hechos que, por consiguiente, afectan negativamente la fertilidad final del semen así conservado.

La conservación de espermatozoides en nitrógeno líquido tiene por finalidad la interrupción artificial de los procesos que conducen a su muerte. Numerosos trabajos en caprinos reportan una pérdida paulatina de las características que este semen presentaba entre el momento del congelado en nitrógeno líquido y los 6 meses posteriores. La pérdida de motilidad individual progresiva es la característica más reportada, tanto en muestras congeladas con o sin plasma seminal.

La bibliografía consultada reporta diferencias de comportamiento entre razas a la congelación en presencia o ausencia de plasma seminal (Sin lavado: Raza Canaria: Cabrera *et al.*, 2005; raza Jamunapari: Chauhan *et al.*, 1990; Raza Boer: Tuli *et al.*, 1994; Raza Saanen: Azerêdo *et al.*, 2001; y razas con lavado: No especifican Raza: Corteel, 1975; Raza Angora: Ritar *et al.*, 1982 y 1991; Raza Verata: Pintado *et al.*, 1991; Raza Saanen: La Falci *et al.*, 2002, Raza Florida: Dorado *et al.*, 2007). No se han hallado reportes previos que comparen de forma el comportamiento de dos o mas razas bajo un mismo protocolo de congelación ni el efecto del agredo de plasma seminal homologo.

Por otro lado, es conocido que la resuspensión posdescongelado de espermatozoides en plasma seminal (observado en ovinos y otras especies) mejora la motilidad, disminuye los espermatozoides con reacción acrosómica y aumenta la capacidad de atravesar el mucus cervical. En ovinos, esta recuperación se vio reflejada en una mejora de la preñez lograda por inseminación artificial cervical (Maxwell *et al.*, 1999 b).

En base a lo expuesto se plantean las siguientes hipótesis y objetivos:

1.1.- HIPÓTESIS

a.- El semen caprino congelado en diluyente sin proteína animal presenta mayor calidad espermática “*in vitro*” y mayor fertilidad “*in vivo*”, que el semen congelado en diluyentes con yema de huevo,

b.- En el semen caprino conservado en nitrógeno líquido durante los primeros seis meses de almacenamiento se afectan los parámetros cualitativos,

c.- La adición de plasma seminal caprino a espermatozoides congelados/descongelados mejora la calidad espermática,

d.- La raza no tiene efecto sobre la calidad espermática del semen congelado/descongelado.

1.2.- OBJETIVO GENERAL

Mejorar la eficiencia productiva de la ganadería caprina facilitando el uso de la IA y la mejora genética.

1.3.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a.- Comparar el comportamiento “*in vitro*” de la calidad espermática del semen caprino congelado en un diluyente sin proteína de origen animal y dos con diferente contenido de yema de huevo,

b.- Comparar la fertilidad “*in vivo*” del semen congelado en los tres diluyentes evaluados en la raza Saanen,

c.- Evaluar si existe deterioro de la calidad “*in vitro*” del semen caprino durante seis meses de conservación en nitrógeno líquido,

d.- Determinar si la adición de plasma seminal caprino a espermatozoides congelados/descongelados mejora la calidad espermática,

e.- Evaluar si la “raza” afecta la calidad del semen congelado-descongelado.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

2.1.- ASPECTOS GENERALES DE LA ESPECIE CAPRINA

La especie caprina, es quizás una de las especies animales que primero domesticó el hombre, relación que dio comienzo hace aproximadamente 10.000 años. Existen indicios de la domesticación de animales (ovejas, cabras y cerdos) y del cultivo de algunos cereales (trigo, cebada y centeno en las pasturas de altura de las montañas de Zagros, al sudeste de Turquía y norte de Siria, y las bajas planicies áridas de Irán e Iraq (Zeder y Hesse, 2000). Son éstos, algunos de los lugares donde la humanidad inició esta titánica tarea.

La cabra, al igual que otros animales (por ejemplo: el caballo y la vaca) no es oriunda de América y fue introducida de la mano del conquistador español, mas precisamente en el segundo viaje de Cristóbal Colon en el siglo XVI. Resabios de estos animales, quedan aún en recónditos lugares de América. Se especula con que nuestras cabras “Criollas” son descendientes de estos animales. Una característica que le es particular es su gran rusticidad; es capaz de brindar carne, leche, cuero y pelo en las condiciones ambientales mas extremas, cualidades que sólo posee a fauna silvestre y que le han hecho ganar el mote de “desertificadoras”.

De la mano del hombre, a través de la selección, se han producido razas muy especializadas de altos rendimientos, como las Razas Saanen, Nubian, Alpina, Toggenbur, Boer, Angora o Cachemira. Todas ellas presentes en nuestro país.

- Características de los caprinos

- La Raza Criollo. Generalidades, características morfoestructurales, productivas y reproductivas:

Difícil es establecer el origen racial de las cabras criollas, ya que el concepto de raza no existía en la época de la conquista española del continente Americano. Sin embargo, las cabras introducidas en este territorio, dependiendo de la expedición,

descienden de cabras provenientes del territorio continental de España y Portugal, inclusive de África y de las Islas Canarias (Capote *et al.*, 2004).

En el actual territorio Argentino, las primeras 20 cabras ingresaron en 1536 de la mano de Pedro de Mendoza en la primera fundación de Buenos Aires, poco se sabe del destino corrido por el ganado equino, bovino, ovino y caprino que conformó esta primera expedición, pero difícilmente hayan sobrevivido a las hostilidades encontradas por los primeros habitantes españoles de parte de los antiguos dueños de nuestro país (Revidatti, 2008). No fue sino hasta 1542, cuando Nuflo de Chavez ingresa 200 cabras provenientes de Santa Cruz de la Sierra (Bolivia) a Asunción (Paraguay) (Revidatti, 2008). Posteriormente en 1549, el fundador de Córdoba, Jerónimo Luis de Cabrera introdujo cabras en esta provincia y ese mismo año, Nuñez del Prado hizo lo mismo en Tucumán (Revidatti, 2008). Mas aquí en el tiempo, Rivadavia durante su gestión como Ministro de Gobierno y Relaciones Exteriores, en 1826 introduce de Turquía un plantel de cabras Cachemiras y otro de Angora (Revidatti, 2008). Luego, en distintos momentos del siglo XX, se introducen animales de las razas Saanen, Anglo Nubian, Toggenburg y Boer.

Sea uno u otro su origen, lo cierto es que este mosaico racial contribuyó de manera innegable a las características mas notables de esta raza, su gran rusticidad y excelencia productiva. Se especializa en producir carne, pero no deja de contribuir con leche, pelo, cuero, guano, etc. Tal es su contribución, que las mas variadas actividades humanas hacen uso de sus productos, lo que incluye alimentación, vestimenta, fertilizante ecológico y hasta parte de fábulas y leyendas de nuestra cultura.

Este es un animal de tamaño mediano a grande, con una altura a la alzada que es variada en y entre sexos, encontrándose animales machos de 70 a 86 cm de alzada (Rossanigo *et al.*, 1995; de Gea, 2000; Lanari *et al.*, 2000; Bedotti *et al.*, 2003; Lanari *et al.*, 2004 y 2005) y hembras de 65 a 80 cm (Rossanigo *et al.*, 1995; de Gea, 2000; Lanari *et al.*, 2000; Bedotti *et al.*, 2003; Lanari *et al.*, 2004 y 2005). Su peso vivo oscila entre los 56 a 95 kg en machos y 38 a 64 kg en las hembras (Rossanigo *et al.*, 1995; de Gea, 2000; Lanari *et al.*, 2000; Bedotti *et al.*, 2003; Lanari *et al.*, 2004 y 2005). El color predominante del manto es el blanco ya que los productores lo prefieren pues permite distinguir los animales de la vegetación a la distancia en el monte o en las

serranías, pero son comunes otros colores de manto como ser: negros, zainos, bayos, siendo también común observar capas compuestas (Rossanigo *et al.*, 1995; de Gea, 2000; Lanari *et al.*, 2000; Bedotti *et al.*, 2003; Lanari *et al.*, 2004 y 2005). Dependiendo de donde nos encontremos geográficamente en nuestro país, predomina el pelo corto o sino se presentan animales con pelos largos en todo el cuerpo o en partes de él, principalmente las partes bajas del cuerpo.

Estos pelos pueden ser largos y lacios o inclusive débilmente ondulados (Rossanigo *et al.*, 1995; de Gea, 2000; Lanari *et al.*, 2000; Bedotti *et al.*, 2003; Lanari *et al.*, 2004 y 2005). Las pezuñas y los cuernos son de color amarillo o negro, dependiendo del color del manto, el tipo de cuerno predominante es el arqueado o arqueado-espiralado (Rossanigo *et al.*, 1995; de Gea, 2000; Lanari *et al.*, 2000; Bedotti *et al.*, 2003; Lanari *et al.*, 2004 y 2005). Es normal la presencia de barbilla, siendo en la hembra inconstante. El desarrollo que presentan tanto los cuernos como la barbilla es diferente entre los sexos, siendo en los machos más desarrollados. Las orejas son de tamaño mediano y se mantiene en posición horizontal o levemente caída (Rossanigo *et al.*, 1995; de Gea, 2000; Lanari *et al.*, 2000; Bedotti *et al.*, 2003; Lanari *et al.*, 2004 y 2005). Las ubres presentan una forma globosa con pezones cortos y bien definidos, normalmente no sobresalen de la estructura de protección que le forman los muslos. También es común observar ubres con forma piriforme u oval (Rossanigo *et al.*, 1995; de Gea, 2000; Lanari *et al.*, 2000 y 2004;).

La producción principal son los cabritos mamones o lechales, cuyo peso al nacimiento se encuentra influenciado por la época de nacimiento (de Gea, G. 2005; Chagra Dib *et al.*, 2005), el tipo de parto (Dayenoff *et al.*, 1993; Chagra Dib *et al.*, 2005) y el sexo (Dayenoff *et al.*, 1993; de Gea, 2005) (Tabla 1).

Tabla 1: Pesos al nacimiento de cabritos criollos según época de nacimiento, tipo de parto y sexo.

Autor	Tipo de parto			Época de Nacimiento				Sexo	
	Simple	Doble	Triple	Oto.	Inv.	Prim.	Ver.	Macho	Hembra
Dayenoff <i>et al.</i> , 1993	2,9±0,6a	2,6±0,5b	ND	ND	ND	ND	ND	2,9±0,5 a	2,6±0,6b
Chagra Dib <i>et al.</i> , 2005	2,9a	2,7b	2,1c	2,7ab	2,5c	2,6c	2,9a	NS	NS

Letras distintas en una misma fila denota diferencia estadística ($p < 0,05$)

Referencias: **ND:** No disponible en la publicación; **NS:** No significativo; **Oto.:** Otoño; **Inv.:** Invierno; **Prim.:** Primavera; **Ver.:** Verano;

Estos cabritos se crían bajo un sistema de lactancia natural restringida, vendiéndose entre los 30 y 180 días de vida (Rossanigo *et al.*, 1995; de Gea, 2000; Lanari *et al.*, 2000; Bedotti *et al.*, 2003; Lanari *et al.*, 2005;) con peso de res de 4,5 a 9 kg (Rossanigo *et al.*, 1995 y 1996; Chagra Dib *et al.*, 1998; Leguiza *et al.*, 2001 a y b; De Gea, 2005; Bonvilliani *et al.*, 2004; Domingo *et al.*, 2005;). La producción de leche es muy variable, con valores de producción diaria que varían de los 0,314 a 1,530 kg (Rossanigo *et al.*, 1995; Frigerio *et al.*, 2000; Rabasa *et al.*, 2002; Chagra Dib *et al.*, 2005) que no sobrepasa los 150 días de ordeño (Rossanigo *et al.*, 1995; Rabasa *et al.*, 2002). Siendo notable la caída que sufre la producción láctea a partir de los 60 días de lactancia, este es un comportamiento típico en razas con escaso o nula selección por aptitud lechera. El porcentaje de grasa se encuentra en valores de 3,0 a 4,8% (Frigerio *et al.*, 2000; Roldan *et al.*, 2002; Valdivia C. L., 2003).

El rasgo reproductivo más sobresaliente es la prolificidad, encontrándose valores que van de 1 a 2,28 (Rossanigo *et al.*, 1995; de Gea, 2000; Bedotti *et al.*, 2003; Vera *et al.*, 2003), con porcentajes de parición del 62 al 94% en servicio natural (Rossanigo *et al.*, 1995; de Gea, 2000; Bedotti *et al.*, 2003; Vera *et al.*, 2003). Las ganancias diarias de peso varían de los 53 a 199 g, estos valores se ven influenciados principalmente por la época, tipo de parto y alimentación que recibieron las madres (Rossanigo *et al.*, 1995; Frigerio *et al.*, 2000; Lanari *et al.*, 2004 y 2005; Chagra Dib *et al.*, 2005).

- La raza Saanen. Generalidades, características morfoestructurales, productivas y reproductivas:

Es una de las razas lecheras mas importantes del mundo, proveniente de los valles suizos de Saanen y Simenthal, el nombre local es Gessenay y se debe a la coloración blanca de su manto. Es la raza caprina lechera más difundida del mundo, avalada por sus registros de pedigrí y de producción. Es una animal de tamaño entre mediano y grande, alcanzando una alzada de hasta 90 cm. y una longitud corporal de aproximadamente un metro. El peso adulto oscila entre los 70 y 100 Kg, para hembra y macho respectivamente. El peso de los cabritos al nacer ronda los 3 Kg.

La coloración del manto es blanco o cremoso, siendo el pelo corto, escaso y sedoso. Las pezuñas y los cuernos son de color amarillo, normalmente ambos sexos presentan barbilla, siendo la del macho más larga y frondosa. La cornamenta es en el macho muy desarrollada y presenta una forma de sable o cimitarra, en la hembra la forma se mantiene pero el desarrollo es mucho menor. Las orejas, pequeñas, cortas, erectas y en forma de punta de lanza, le dan una característica particular, casi identificatoria. Las ubres son de tamaño mediano a grande, con pezones grandes y rectos. Se la reconoce como la "Holstein de las cabras", gracias a las bondades en la producción de leche, siendo normal, encontrar registros de producción cercanos a los 2000 litros en lactancias de 240 días. Encontrándose valores normales de producción en los 800 a 1200 litros, la calidad de la leche es buena, con promedios de grasa algo bajos (3,5-4%).

En nuestro país existen valores de producción en cabras cruce con criollo (F1) en lactancias de 253 días promedio de $233,11 \pm 55,42$ Kg de leche (Rabasa *et al.*, 2002). El porcentaje de grasa observado en estos animales fue de $3,74 \pm 0,41$ (Roldan *et al.*, 2002). Aunque Paz (2002), en animales cruce indefinida criollo x Saanen, informó lactancias de 175 a 250 días, con producciones totales que variaron entre los 179 a 568 Kg, con promedios diarios de producción que oscilaron entre los 1,02 a 2,24 Kg diarios.

Esta raza está presente en nuestro país desde hace mucho tiempo. Existen registros de animales importados por el Ministerio de Agricultura de la Nación en 1922 y 1923 donde se introdujeron animales provenientes de Suiza, los cuales fueron distribuidos en las provincias de Entre Ríos, Santiago del Estero, Catamarca, Mendoza, San Luis y La Rioja (Agraz García, A., 1981). Posteriormente, dos nuevas importaciones se produjeron en 1940 y 1950, con animales provenientes, una vez más de Suiza (Maubecin, R., 1973). La última introducción masiva ocurrió durante la década de 1990 de animales en pie, semen y embriones.

2.2.- CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS Y FISIOLÓGICAS DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA ESPECIE CAPRINA.

- Aparato reproductor femenino

El ovario, órgano principal del aparato reproductor, es bilateral, de forma ovalada y pequeño tamaño (0,5 a 3 g). Su función es producir ovocitos y secretar hormonas, tales como estrógenos, progesterona, oxitocina, inhibina y activina (Evans *et al.*, 1990).

Del resto de las estructuras, el cuello uterino presenta una disposición especial y por lo tanto merece nuestra atención. Es una estructura de tamaño variable (4-7 cm) que separa el útero de la vagina. Anatómicamente es una estructura que presenta una fuerte pared de tejido muscular liso, tejido conjuntivo y glándulas mucosas. Es atravesado completamente por un canal central. Hacia la luz del canal protruyen y se intercalan 3 a 7 anillos tapizados de mucosa y submucosa, cuya función es obliterar el canal cervical (Evans *et al.*, 1990; Morrello *et al.*, 2004). Estos pliegues o anillos tienen la particularidad de presentarse como digitaciones intercaladas, por lo cual, sumado al pequeño calibre del canal cervical, se transforman en una barrera infranqueable desde el exterior (Evans *et al.*, 1990; Morrello *et al.*, 2004). Es durante el estro y particularmente para la IA, donde se presenta como uno de los principales escollos para lograr aceptables índices de preñez, ya que impide la deposición del semen en el cuerpo del útero, causando que este se deba depositar en fondo de vagina o en el 1° o 2° anillo cervical (Evans *et al.*, 1990; Morrello *et al.*, 2004).

- Ciclo estral, foliculogénesis, control hormonal y ovulación

El ciclo estral es gobernado por el eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal-uterino. Sustancias orgánicas denominadas hormonas son las encargadas de la comunicación que coordina celosamente los cuatro órganos del eje. Las más importantes son: Hormona Liberadora de Hormonas Hipofisarias (GnRH) secretada por el hipotálamo, Hormona Luteinizante (LH) y Hormona Folículo Estimulante (FSH) producidas y liberadas por la Hipófisis, estradiol (E2), inhibina y progesterona (P4) cuyo origen es el

ovario y la Prostaglandina F2 α (PGF2 α) secretada por el útero (Tron, 1986; Figeirêdo Freitas; Rubianes, 2004).

En la bibliografía clásica, el ciclo estral de la cabra posee una duración de 19 a 21 días (Kolb, 1987). Trabajos recientes de dinámica folicular ovárica realizados por ultrasonografía concuerdan con este rango de duración (19-22 días) (Ginther; Kot, 1994; Menchaca; Rubianes, 2002; Rubianes; Menchaca, 2003; Cueto, 2006). Durante el desarrollo del ciclo, en los ovarios, evolucionan distintos eventos morfo-funcionales que determinan dos grandes períodos o fases (Luteal y Folicular), dominadas por la presencia de estructuras ováricas características que dan origen al nombre de cada una de ellas (Tron, 1986; Shelton, M., 1978; Figeirêdo Freitas; Rubianes, 2004).

La fase luteal transcurre durante el 80% del ciclo (15 a 17 días) (Ginther; Kot, 1994; Menchaca; Rubianes, 2002; Rubianes; Menchaca, 2003; Cueto, 2006;), extendiéndose desde la ovulación hasta la luteólisis, donde la estructura predominante es el cuerpo lúteo (CL) y la hormona que impera durante esta fase es la progesterona (Figeirêdo Freitas; Rubianes, 2004).

La fase folicular dura el 20% del ciclo (2 a 4 días) (Ginther; Kot, 1994; Menchaca; Rubianes, 2002; Rubianes; Menchaca, 2003; Cueto, 2006;), comienza con la luteólisis y comprende eventos que finalizan en la ovulación. Si bien, buena parte del crecimiento de los folículos ocurre durante la fase luteal, una vez finalizada esta fase, sucede un crecimiento rápido de los folículos antrales (Tron, 1986; Ginther; Kot, 1994; Menchaca; Rubianes, 2002; Rubianes; Menchaca, 2003; Figeirêdo Freitas; Rubianes, 2004; Cueto, 2006).

La rápida desaparición funcional del cuerpo lúteo produce una caída vertiginosa de progesterona y el inicio de una nueva fase folicular, la descarga preovulatoria de LH y de FSH producida por la hipófisis, favorece la producción de estradiol, con la consiguiente manifestación de celo y consecuente ovulación. El estradiol incrementa su concentración desde el día 16 al día 2 pos ovulación (pico) para luego disminuir a niveles basales para el día 5, manteniéndose así hasta un nuevo incremento que coincide con la lúteolisis (Tron, 1986; de Castro *et al.*, 1999; Rubianes, Menchaca, 2003; Figeirêdo Freitas y Rubianes, 2004). Los folículos terciarios, ovulatorios o dominantes son quienes aprovecharán esta descarga preovulatoria de gonadotrofinas,

para ultimar el crecimiento y concluir finalmente con la ovulación (Tron, 1986; Figeirêdo Freitas; Rubianes, 2004).

El celo dura alrededor de 36 horas, produciéndose la ovulación entre las 30-36 h de iniciado el mismo o alrededor de las 20 h de producido el pico preovulatorio de hormona luteinizante (Tron, 1986; Figeirêdo Freitas; Rubianes, 2004). Este evento se considerada el día 0 del ciclo. Una vez producida la ovulación, el folículo terciario se luteiniza rápidamente, cesa en la producción de estradiol y comienza paulatinamente a producir progesterona, alcanzando el pico alrededor del día 7 y manteniéndose constante hasta el día 16 o 17 del ciclo (de Castro, *et al.*, 1999; Rubianes; Menchaca, 2003). En este momento, si el útero no recibió un ovocito fecundado y no se produce la implantación, se desencadena el mecanismo de destrucción del cuerpo lúteo (luteólisis), producido por la PGF2 α de origen uterino.

La ciclicidad se desarrolla durante la época reproductiva, interrumpiéndose por la concepción y/o factores tales como: raza, edad, época de nacimiento, temperatura ambiente, presencia de machos o hembras, estado nutricional y fotoperíodo (Tron, 1986; Roca *et al.*, 1991; Restall, 1992; Walkden Brown *et al.*, 1993; Álvarez Ramírez *et al.*, 1999; Rivera *et al.*, 2003).

Como mencionáramos más arriba, la ultrasonografía transrectal permitió la evaluación "*in vivo*" del ovario y sus estructuras como así también permitió avanzar en el conocimiento de la dinámica folicular durante el ciclo estral. Los primeros trabajos de 1988, se llevaron a cabo en bovinos (Savio *et al.*, 1988; Sirios *et al.*, 1988) Estos estudios permitieron confirmar, lo que hasta este momento era sólo una teoría, la existencia de varias ondas de crecimiento folicular que se desarrollan durante un mismo ciclo estral, y que dan como resultado según la especie animal, el o los folículo/s ovulatorio/s.

En caprinos, se ha descrito que ocurren de 2 a 5 ondas de crecimiento folicular en un ciclo estral con una duración de 19 a 22 días (Ginther; Kot, 1994; de Castro *et al.*, 1999; Schwarz; Wierzchos, 2000; Menchaca; Rubianes, 2002; Rubianes; Menchaca, 2003), siendo el patrón predominante 4 ondas de crecimiento folicular (Ginther; Kot, 1994; T. de Castro, 1999; Schwarz; Wierzchos, 2000; Menchaca; Rubianes 2002; Rubianes; Menchaca, 2003). Respecto de la raza, en cabras cruza Saneen x Anglo

Nubian se describieron 3 ó 4 ondas por ciclo (Rubianes, 2000; Menchaca; Rubianes, 2002), en cabras Saanen se observó la ocurrencia de 4 o más ondas de crecimiento folicular en ciclos estrales de 23 días de duración (Ginther *et al.*, 1994) y en nuestro país, en caprinos Criollos se describió la existencia de 2 a 4 ondas por ciclo (Vázquez *et al.*, 2004), lo que, al parecer mostraría la existencia de un patrón muy coincidente entre distintas razas de esta especie.

- Aparato reproductor masculino:

El aparato reproductor del macho caprino como muestra la figura 1, no es esencialmente diferente del que se describe en otros rumiantes, salvo por las dimensiones y particularidades debido al tamaño de esta especie. Elementalmente su conformación anatómica la integran: testículos, epidídimos, conductos deferentes, ámpulas, vesículas seminales, próstata, glándulas bulbouretrales, uretra, pene y apéndice vermiforme o proceso uretral (Evans; Maxwell, 1990; Delgadillo, 2004).

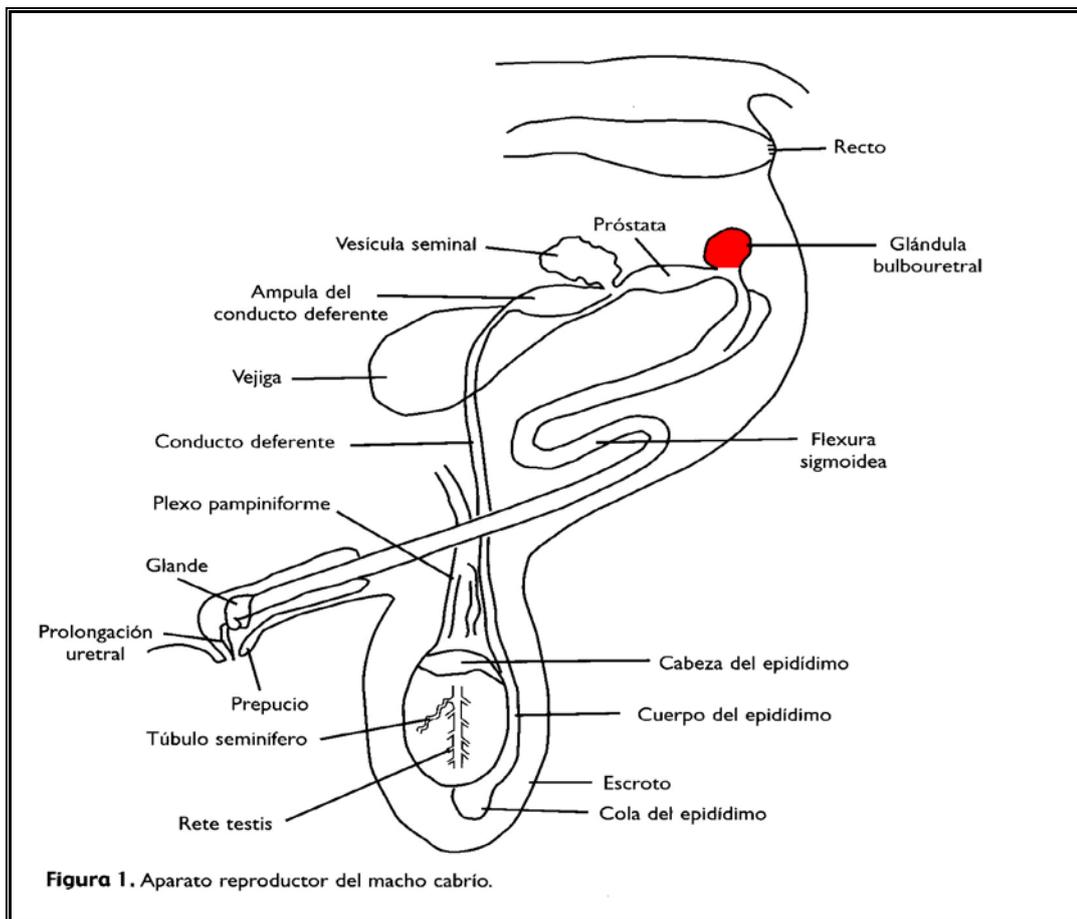


Figura 1: Aparato Reproductor del macho caprino: Esta ilustración muestra esquemáticamente los diferentes órganos del aparato reproductor del macho caprino. Resaltada se encuentra la glándula bulbouretral (Tomado de Aisen, 2004).

Los testículos tienen por función primordial producir espermatozoides y hormonas, principalmente testosterona, dihidrotestosterona e inhibina. Funciones interrelacionadas, ya que la producción de espermatozoides depende de la producción de estas hormonas. Se encuentran alojados en la bolsa escrotal, quien además de protegerlos, permite que los testículos tengan una temperatura entre 4 y 7° C menor que la temperatura interna corporal (Evans; Maxwell, 1990; Delgadillo, 2004).

Del resto de las estructuras anatómicas, las glándulas bulbouretrales, son particularmente importantes. Estas glándulas de forma redondeada y compacta, se alojan por sobre la salida de la uretra y cerca del final de la cavidad pélvica; durante la excitación y el eyaculado, drenan su secreción (Evans; Maxwell, 1990; Delgadillo, 2004), particularmente importante en el caprino, pues alojan enzimas que reaccionan con constituyentes de los diluyentes seminales malogrando la crioconservación de los espermatozoides a temperaturas bajo 0° C (Roy, 1957; Pellicier-Rubio *et al.*, 1997 y 1998; Sias *et al.*, 2005).

- Semen:

Durante la excitación sexual, el pene se pone en erección, se relaja el músculo retractor del pene, se drenan líquidos previo a producirse el coito, que provienen de las glándulas anexas (principalmente de las glándulas bulbouretrales), con la función de limpiar la uretra (Pellicier-Rubio *et al.*, 1997 y 1998; Sias *et al.*, 2005). A través de secreciones y contracciones de las paredes de los conductos deferentes, los espermatozoides, llegan de la cola del epidídimo hasta la ampolla de los conductos deferentes. Momentos antes de eyaculación llegan a la uretra posterior, donde se mezclan con las secreciones de todas las glándulas anexas, adquiriendo de esta manera los espermatozoides motilidad. Esta mezcla de espermatozoide y secreciones, constituyen el semen, que así es eyaculado por las contracciones de la uretra (Evans; Maxwell, 1990; Delgadillo, 2004).

- El espermatozoide. Espermatogénesis.

El espermatozoide es la gameta masculina; es producida por los túbulos seminíferos del testículo. Luego de la pubertad, cuando se adquiere la madurez sexual, se produce la liberación de los primeros espermatozoides, móviles y fértiles. Este proceso se denomina espermatogénesis, se inicia con la división mitótica de las células del epitelio germinal, las espermatogonias, las que luego de varias divisiones dan origen al espermatocito primario. Las primeras poseen un número diploide de cromosomas ($2n = 60$ cromosomas en el caprino), luego de sufrir dos divisiones meióticas reducen a la mitad su carga cromosómica. En la primera división, se duplica el material genético, obteniéndose 2 espermatocitos secundarios ($2n$). Éstos tienen una vida corta, ya que se produce la 2ª división meiótica que produce como resultado 4 espermátidas, con la mitad de la dotación cromosómica (n) o células haploides (Hafez, 1989; Evans; Maxwell, 1990).

Estas espermátidas no se parecen en nada a un espermatozoide. Seguidamente sufren una serie de cambios morfológicos o de metamorfosis, donde a partir de una célula redondeada se obtiene otra con la típica forma que reconocemos al espermatozoide. Esta etapa se llama espermiogénesis (Hafez, 1989; Evans; Maxwell, 1990). Este ciclo de producción de un espermatozoide libre en la luz del tubo seminífero a partir de una espermatogonia troncal, varía en su duración con las especies, siendo el tiempo para el carnero de 40 días y en el macho caprino de 20 días (Evans; Maxwell, 1990). El tiempo que toma completar el ciclo del epitelio seminífero es de 10 días para el carnero (Hafez, 1989) y según la especie lleva 4 ó 5 ciclos para que la espermatogonia troncal finalice la metamorfosis de la espermiogénesis (Hafez, 1989). Luego el espermatozoide debe pasar a través del epidídimo para llegar finalmente a la cola del epidídimo y estar preparado para ser eyaculado. El tiempo que le toma realizar este tránsito es de aproximadamente 10 a 14 días (Hafez, 1989; Evans; Maxwell, 1990).

Por otro lado, el inicio de la división en las espermatogonia troncal ocurre a intervalos regulares de tiempo y de manera alternada a lo largo de los 2000 metros de túbulos seminíferos, de esta forma el macho se asegura el incesante aporte de espermatozoide para la actividad reproductiva. La calidad y el número de espermatozoide producidos y disponibles para la actividad reproductiva, se ven

afectados por muchos factores como son la eficiencia de la espermatogénesis, la maduración en el epidídimo, la estación del año (Roca *et al.*, 1992), el fotoperíodo (Delgadillo *et al.*, 1992), la edad (Corteel, 1981), la nutrición (Martín *et al.*, 1995), la temperatura (Tron, 1986; Evans; Maxwell, 1990), la frecuencia de eyaculados (Ritar *et al.*, 1992)) y la raza (Tron, 1986).

Un esquema simplificado de la espermiogénesis (Figura 2) muestra los cambios que sufre la espermátida para transformarse en un espermatozoide que finalmente es liberado a la luz del túbulo seminífero.

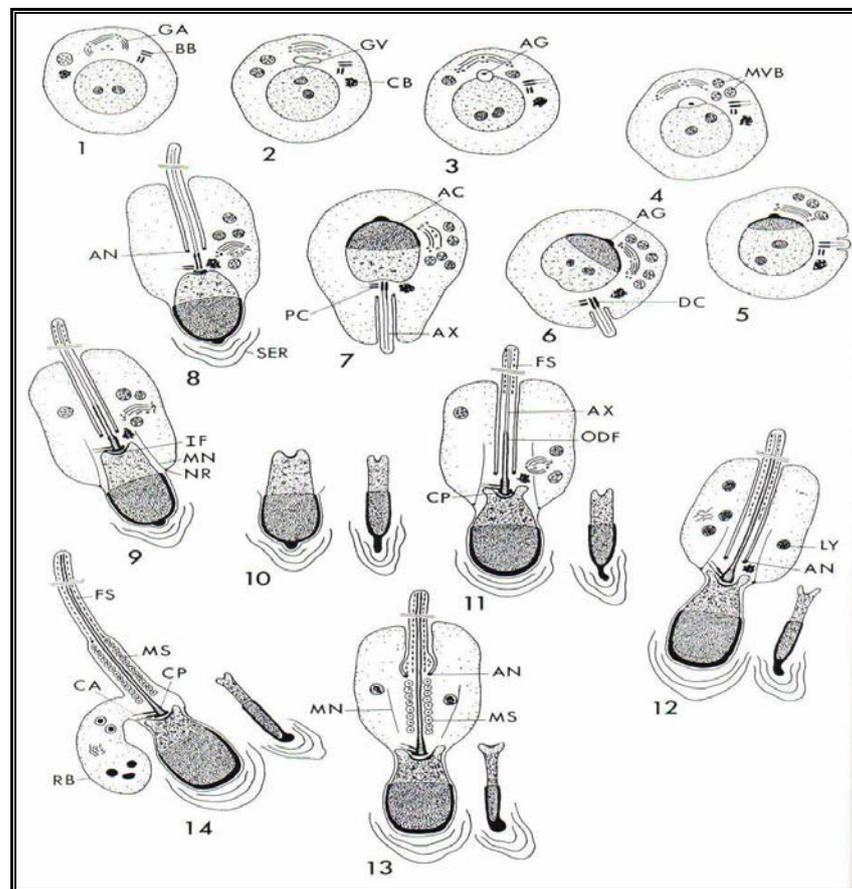


Figura 2: Esquema de la Espermiogénesis: Ilustraciones que esquematizan los 14 pasos que finalizan en la diferenciación de la cabeza y la cola del espermatozoide. Referencias: Aparato de Golgi (GA); Cuerpo Basal (BB); Vesícula de Golgi (GV); Cuerpo Cromático (CB); Granulo Acrosomal (AG); Cuerpo Multivesicular (MVB); Annulus (AN); Reticulo endoplásmico de Sertoli (SER); Centríolo proximal (PC); Axonema (AX); Capuchón Acrosómico (AC);Centríolo Distal (DC); Fosa de implantación (IF); Manchette (Tubo Caudal) (MN); Anillo Nuclear (NR); Vaina Fibrosa (FS); Otras Fibras Densas (ODF);Capitulum o pieza de conexión (CP); Lisosoma (LY); Centríolo Adjunto (CA); Vaina de Mitocondrias (MS); Cuerpo residual (RB). (Tomado de Barth; Oko, 1989.)

- Morfología y estructura del espermatozoide caprino.

El espermatozoide es una célula extracorpórea, haploide, altamente especializada, de aproximadamente 60 μ de longitud (Evans; Maxwell, 1990). Como muestra la figura 3, se distinguen en su estructura dos regiones bien diferenciadas: la cabeza y la cola (Evans; Maxwell, 1990; Aisen, 2004), que se encuentran recubiertas por una membrana plasmática. La composición química de esta membrana plasmática varía según la región del espermatozoide, confiriéndole diferentes propiedades funcionales. Abordaremos este ítem con mayor detalle más adelante.

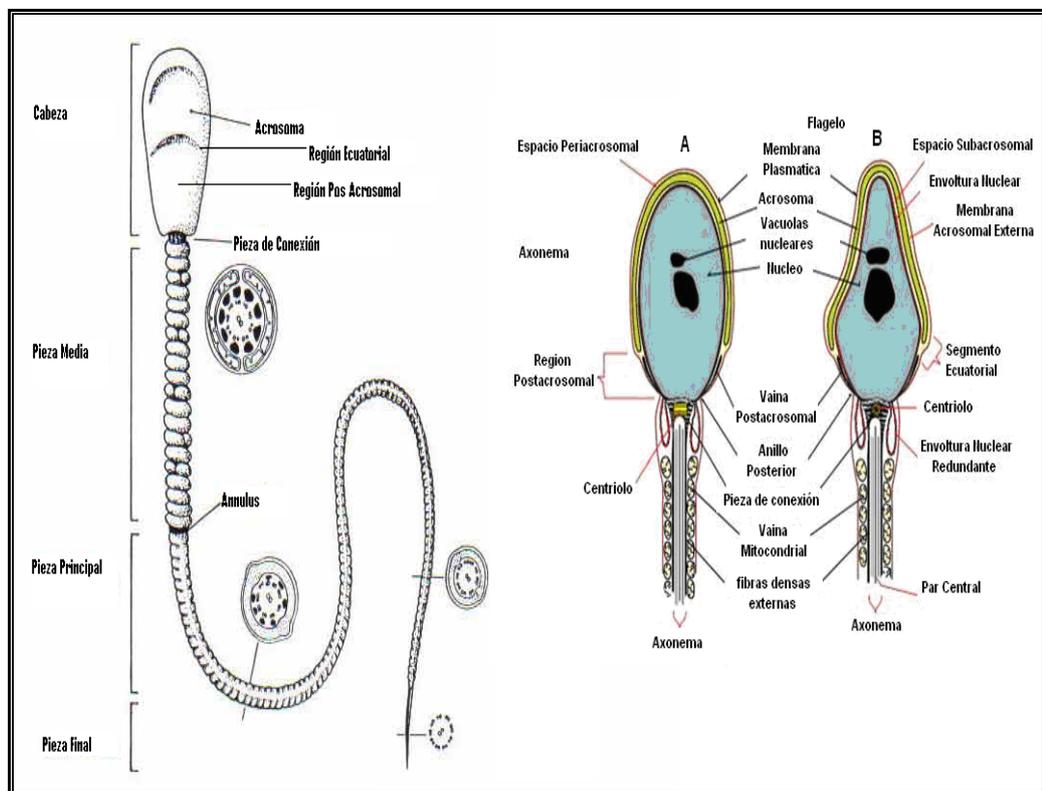


Figura 3: Morfología y estructura del espermatozoide caprino: La figura de la izquierda muestra un esquema general del espermatozoide (Tomado de Barth; Oko, 1989.), mientras que las figuras A y B muestran mayor detalles de la cabeza y la pieza intermedia.

La cabeza (Figura 3 y 4) posee una forma aplanada y ovoide que recuerda a una espátula. Sus medidas son 8-10 μ de longitud por 4 μ de ancho y 1 μ de alto (Evans; Maxwell, 1990). Se encuentra ocupada casi en su totalidad por el núcleo, que contiene el material genético que se encuentra altamente condensado. Una muy pequeña porción es ocupada por el citosol. La región anterior de la cabeza se encuentra cubierta por un casquete especial llamado capuchón acrosómico, que posee las

enzimas necesarias para penetrar las barreras ovocitarias. La región ocupada por el capuchón acrosómico es bien diferenciada y visible, el límite posterior se denomina región ecuatorial y la porción de la cabeza libre de capuchón es llamada región posacrosomal (Evans; Maxwell, 1990; Aisen, 2004).

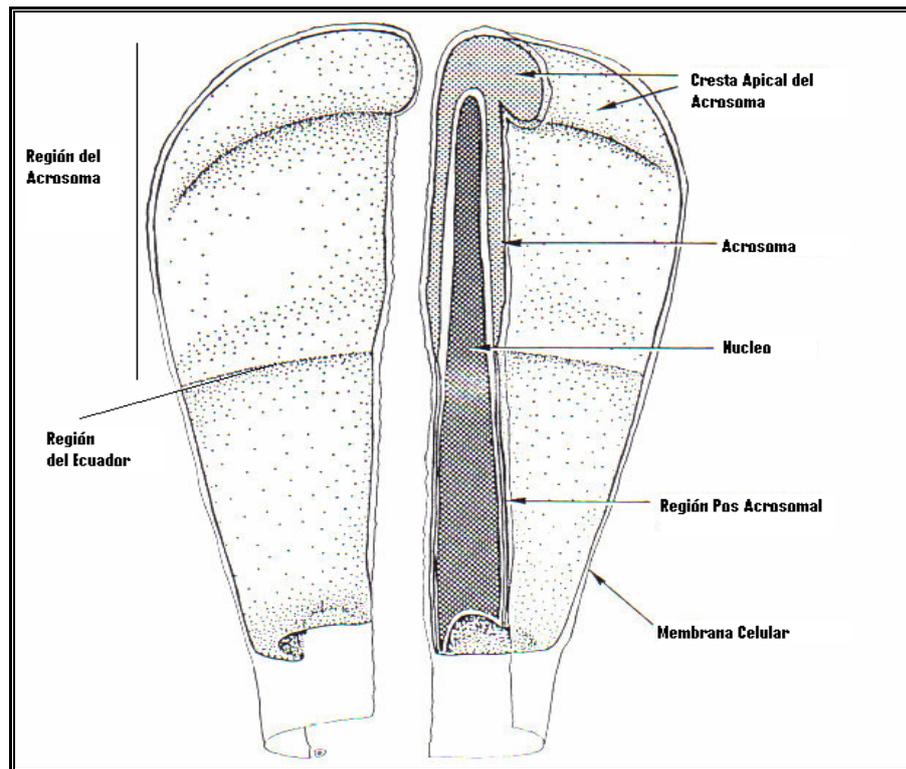


Figura 4: Cabeza del Espermatozoide y estructuras que se distinguen en ella. (Tomado de Barth; Oko, 1989).

La región de unión de la cabeza y la cola se denomina cuello, su importancia radica en que allí nacen el axónema, complejo de microtúbulos (9 pares periféricos y 2 pares centrales) que recorren la totalidad de la cola. Esta región es muy sensible, porque en respuesta a cualquier situación agresiva se desprende con mucha facilidad, separándose la cabeza y la cola (Evans; Maxwell, 1990; Aisen, 2004). En esta última es posible diferenciar tres regiones: la pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal (Figura 5).

La pieza intermedia está recubierta por un ajustado anillo helicoidal de mitocondrias, fuente de la energía necesaria para la motilidad del flagelo. Esta porción se extiende desde el cuello en el centríolo proximal hasta el anillo o centríolo distal, en un trayecto de unas 10 a 15 μ (Evans; Maxwell, 1990; Aisen, 2004). En cambio, la

pieza principal (30 μ) y distal (3 μ), no contienen mitocondrias, sólo son recorridas por el axónema, este conjunto de microtúbulos es el encargado de contraerse frente a los impulsos eléctricos, produciendo la contracción de las fibras, que da lugar al característico movimiento de látigo de la cola y posibilitando el desplazamiento del espermatozoide (Evans; Maxwell, 1990; Aisen, 2004). La calidad y velocidad de este movimiento de la cola hará posible que el espermatozoide cumpla con su función en la reproducción transportando el material genético del macho para introducirlo en la gameta femenina.

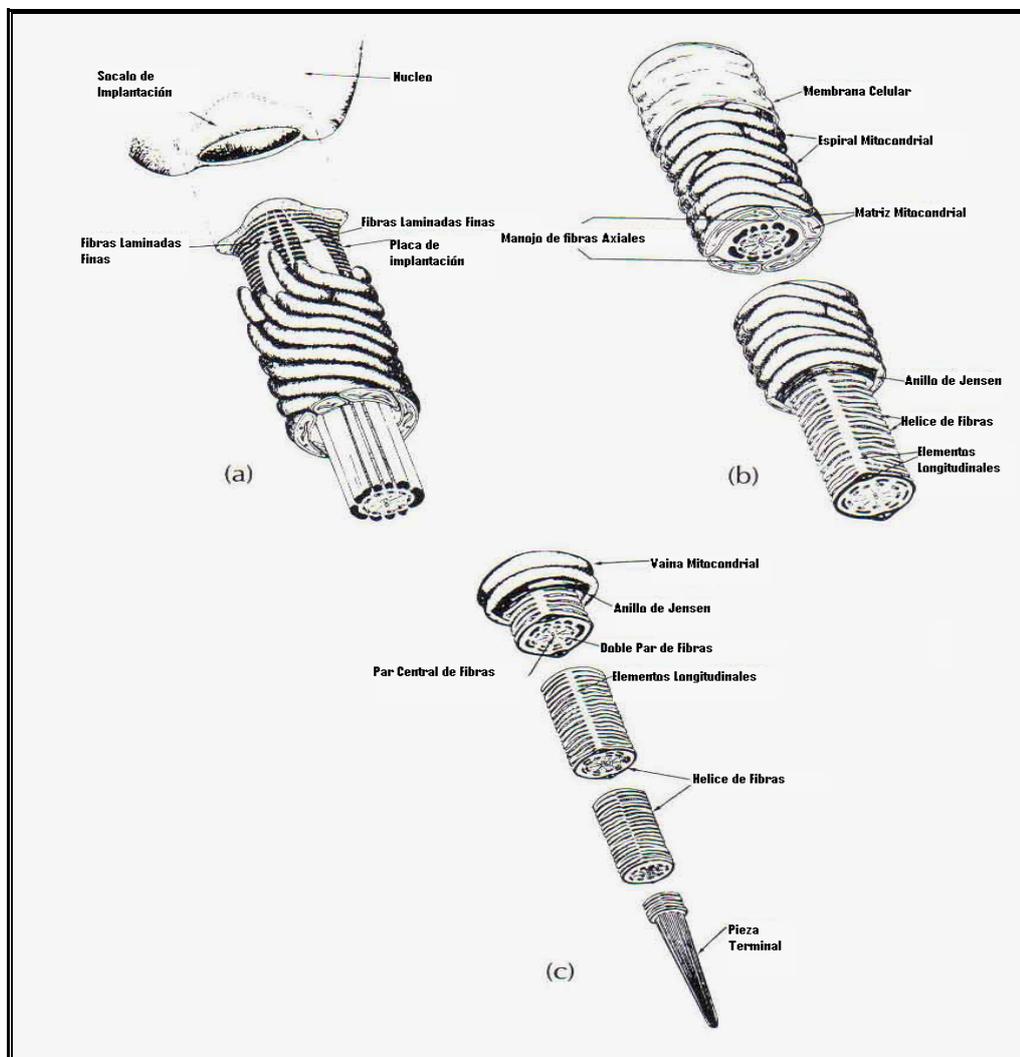


Figura 5: Cola del espermatozoide y Partes que la componen (Tomado de Barth; Oko, 1989). Referencias: a) Región del Cuello; b) Pieza Intermedia y c) Pieza Principal y Terminal.

- Composición de las membranas plasmáticas espermáticas.

Debido a la limitada capacidad biosintética y la gran especialización del espermatozoide, la membrana plasmática posee características propias. Constituida por lípidos y proteínas, responde al modelo de mosaico fluido propuesto por Singer; Nicholson (1972). El espermatozoide presenta, a diferencia de otras células, variedad estructural y funcional en su membrana plasmática. Cada una de ellas muy especializadas y asociadas con el compartimiento celular que se encuentra inmediatamente debajo (Olson; Winfrey, 1991), cuyo rol es responder adecuadamente a la cascada de eventos de la fertilización, que finaliza con la fusión de las membranas del espermatozoide y el ovocito (Yanagimachi, 1994 a y b; Flesch; Gadella, 2000) . Es la membrana plasmática del espermatozoide no sólo un límite con el medio que lo rodea, sino una estructura dinámica, que se caracteriza por una heterogeneidad lateral y una distribución polar de lípidos y proteínas que la componen.

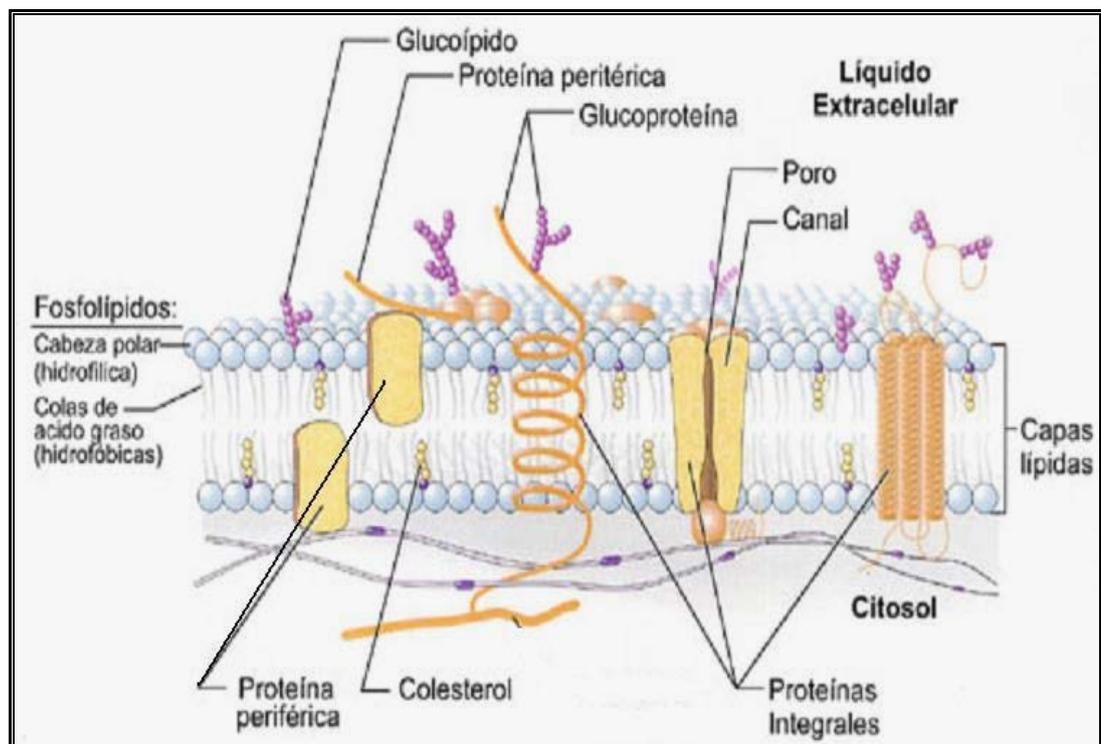


Figura 6: Composición de la membrana celular. Según modelo de mosaico fluido propuesto por Singer; Nicholson (1972)

- Lípidos constituyentes de la membrana del espermatozoide

Es importante tener presente que el espermatozoide maduro carece de la maquinaria biosintética (retículo endoplásmico y aparato de Golgi) para la metabolización de los lípidos (lisosomas y peroxisomas), es durante la espermiogénesis, donde la espermátida pierde estos y otros componentes celulares en el cuerpo residual (Flesch; Gadella, 2000). Por lo tanto, la membrana plasmática es una estructura estable y metabólicamente inerte, ya que el espermatozoide no puede sintetizar nuevamente proteínas, fosfolípidos, colesterol u otros componentes de importancia para la misma (Flesch; Gadella, 2000).

Como generalidad se puede decir que, la membrana plasmática del espermatozoide contiene lípidos unidos a ésteres y grupos de ácidos grasos altamente insaturados (Wolf *et al.*, 1990). Sin considerar las variaciones entre especies la composición general y aproximada, es: 70% fosfolípidos, 25% lípidos neutros y 5% glicolípidos (Mann; Lutwak-Mann, 1981).

Los fosfolípidos se encuentran constituidos por fosfoglicerolípidos y esfingomielina, éstos se encuentran en proporciones muy similares a las descritas en las células somáticas, y por ejemplo, en el hombre el espermatozoide contiene 50 % de glicéridos de fosfocolina, 30% de glicéridos de fosfoetanolamina, 12,5% de esfingomielina, 3 % de fosfatidilserina, 3% de cardiolipina y 2% de fosfatidilinositol (Mann; Lutwak-Mann, 1981).

También encontramos en la membrana plasmática lípidos neutros, siendo esta la fracción más variable entre las especies y dentro de cada especie, entre machos y eyaculados de un mismo macho. En esta fracción se encuentra principalmente colesterol y en menor proporción desmosterol, sulfato de colesterol y ésteres de colesterol (Mann; Lutwak-Mann, 1981). El contenido de colesterol es muy variable en la membrana plasmática del espermatozoide, constituyendo en el hombre alrededor de 40 mol % y en el cerdo 22 mol % del total de lípidos. Además, el contenido de colesterol y fosfolípidos disminuye durante la maduración epididimaria (Eddy and O'Brien, 1994), la capacitación (Scout *et al.*, 1967) y la reacción acrosómica (Yanagimachi, 1994 a y b) en la membrana del espermatozoide, lo que influye en la fluidez, estabilidad y capacidad de fusionarse. Esta relación colesterol:fosfolípidos

sería la responsable de brindar más resistencia a la membrana plasmática del espermatozoide, encontrándose que la misma es muy variable entre las especies (Hombre: 0,99; Conejo: 0,88; Toro: 0,45; Carnero y Chivo: 0,30) y a su vez, el semen de hombre y conejo son más resistentes al congelado si se los compara con semen de carnero y chivo (Aisen, 2004), lo que daría argumento a esta aseveración.

Entre los constituyentes de la membrana plasmática del espermatozoide encontramos glicolípidos, el más importante de ellos es el seminolípido, que es exclusivo del espermatozoide (Vos *et al.*, 1994) y que es desulfatado luego de producirse la eyaculación por arilsulfatasas, originadas por las glándulas sexuales accesorias (Flesch; Gadella, 2000).

Los fosfolípidos tienen afinidad por una u otra cara de la bicapa, poseyendo patrones claros de distribución, lo que le otorga a la membrana una distribución asimétrica. Los fosfolípidos de colina (fosfatidilcolina y esfingomielina) se distribuyen en la cara externa de la bicapa en el carnero (Hinkovska *et al.*, 1986) y en el macho caprino (Rana *et al.*, 1993), en cambio fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol se distribuyen por igual entre las dos capas de la membrana del espermatozoide. Una enzima, la aminofosfolípido translocasa, es quien se ocupa de mantener la asimetría transmembrana y es la encargada de translocar fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina de la cara externa a la interna o viceversa de la membrana (Muller *et al.*, 1994 y 1999), pudiendo esto ser importante en la fluidez y estructura de los dominios.

- Proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide

Las proteínas de membrana se clasifican en dos clases: Integrales y Periféricas (Singer; Nicholson, 1972). Poseen la facilidad de difundir libremente por la bicapa o bien permanecer ancladas por interacciones entabladas con otras proteínas o con lípidos. Sus funciones más importantes son el transporte y la traducción de señales. Las proteínas integrales poseen una porción hidrofóbica, que se ubica hacia la porción central de la bicapa lipídica, y otra porción hidrofílica, que se expone a la porción citoplasmática o hacia el medio extracelular. En cambio, las proteínas periféricas están

asociadas a la superficie externa o interna de la bicapa. Interaccionando con proteínas integrales específicas, donde forman un esqueleto de membrana (Marchesi, 1985).

Las funciones que desempeñan las proteínas de membrana son muy variadas, destacándose su actividad como: transportadores de membrana, canales para el intercambio de iones, y actuando como enzimas (fosfoquinasa y proteínofosfatasas). También juegan un rol fundamental en los mecanismos relacionados con la capacitación y reacción acrosómica, la unión a las células del epitelio del aparato reproductor femenino, unión a las células del cummulus o la zona pelúcida y por último, intervenir en la unión con la membrana plasmática del ovocito y su fusión. Muchas de estas interacciones han demostrado relativa o absoluta especificidad de especie y célula.

Importante es resaltar que la composición proteica de la membrana plasmática del espermatozoide está sujeta a permanentes modificaciones, por lo que su composición varía a lo largo de los distintos estadios que sufre el espermatozoide en su vida o según donde éste se localiza. Así, podemos mencionar el cambio que sufren las proteínas del espermatozoide tras la eyaculación, al adquirir la membrana celular proteínas del plasma seminal, proteínas que fueron elaboradas y secretadas por las glándulas anexas; muchas de ellas se modifican o se eliminan durante el tránsito por el tracto reproductor femenino, es el caso de algunos factores decapacitantes (Carballada; Esponda, 1998).

- Dominios de la membrana plasmática del espermatozoide

La membrana plasmática del espermatozoide es como ya mencionáramos, muy heterogénea, existiendo asociación entre esta estructura y la función que cumple en relación con el compartimiento celular que se encuentra por debajo de ella (Olson; Winfrey, 1991). Esta organización funcional, estructural y bioquímicamente distinta se traduce en dominios de membrana (Olson; Winfrey, 1991). Esta especialización regional, sería la responsable de permitir que los distintos compartimientos del espermatozoide interactúen de forma independiente con el medio exterior, y se desarrollen las etapas necesarias que finalizan en la fecundación del ovocito (Wolf *et al.*, 1995). Aunque los mecanismos responsables de establecer los dominios de

membrana no están determinados, se ha comprobado que ocurren grandes cambios en la membrana plasmática durante distintos momentos, como ser, la remodelación que sufre la espermátida durante la espermiogénesis (Eddy *et al.*, 1994), también se observan efectos en los dominios luego que ocurre la maduración del espermatozoide en el epidídimo (Eddy *et al.*, 1994), durante la capacitación (Yanagimachi, 1994; Curry; Watson, 1995; Ladha, 1998) y la reacción acrosómica (Yanagimachi, 1994; Ladha, 1998), resaltando la importancia de estos dominios y su estrecha relación con la vida y función del espermatozoide .

La superficie del espermatozoide se divide en cinco dominios o regiones de membrana, que se corresponden con estructuras distinguibles en él (Figura 7). Tres de ellas se ubican en la cabeza del espermatozoide, la mayor es la región o dominio acrosomal que se corresponde con el acrosoma, luego encontramos la región o dominio ecuatorial, que se corresponde con el segmento ecuatorial y por ultimo, encontramos la región o dominio postacrosomal, que se corresponde con la región de igual nombre (Eddy *et al.*, 1994). En el flagelo se distinguen los dos dominios restantes, que tienen su correspondencia con las dos regiones distinguibles del mismo. Son la región o dominio de la pieza intermedia y región o dominio de la pieza principal (Eddy *et al.*, 1994).

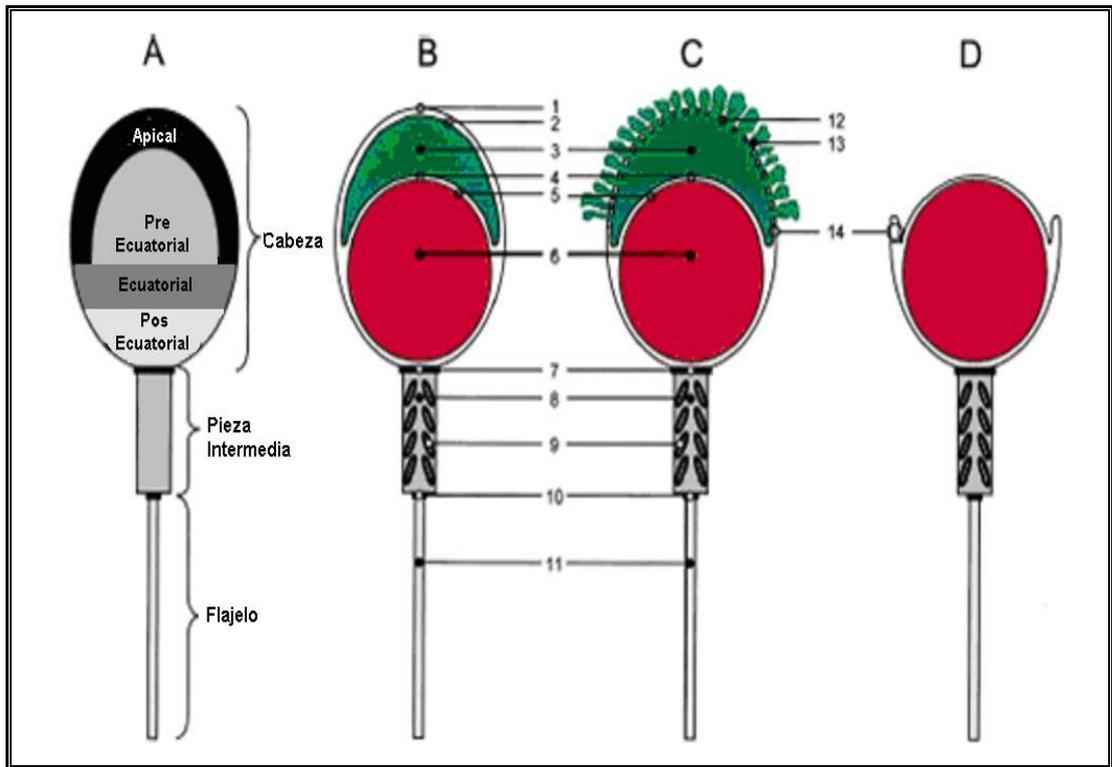


Figura 7: El espermatozoide y dominios de la membrana plasmática. Representación esquemática: A: Divisiones en la cabeza: apical, pre-ecuatorial, ecuatorial y pos-ecuatorial. B, C y D: Representan cortes transversales de la célula. 1: Membrana Plasmática. 2: Membrana Acrosomal externa. 3: contenido del acrosoma. 4: Membrana Acrosomal interna. 5: envoltura nuclear. 6: núcleo. 7: anillo posterior. 8: pieza intermedia. 9: mitocondrias. 10: anillo anular. 11: flajelo. 12: vesícula tras la fusión de la Membrana Plasmática con la Membrana Acrosomal externa. 13: secreción acrosomal. 14: estructura formada de la fusión de la Membrana Plasmática y la Membrana Acrosomal interna. (Tomado de Flesch; Gadella, 2000).

- Maduración en el epidídimo.

El espermatozoide debe sufrir indefectiblemente cambios para poder finalmente fusionarse con el óvulo, cambios que se realizan sin grandes manifestaciones morfológicas aparentes. Estos procesos son tres. El primero de ellos es conocido como “maduración” y acontece en el epidídimo, los otros dos procesos son la “capacitación” y la “reacción acrosómica”, los cuales se desarrollan durante su tránsito a través del tracto reproductor femenino.

El epidídimo no sólo es un lugar de transporte desde el testículo hasta el conducto deferente o un lugar de almacenamiento de espermatozoides, sino que es el sitio donde ocurren transformaciones trascendentales que terminan de madurar al espermatozoide, permitiéndole adquirir finalmente la capacidad fecundante.

Cuando los espermatozoide abandonan el testículo a través de la rete testis y los conductos eferentes, llegan al epidídimo. Este es un conducto convoluto de unos 60 metros de longitud. Se distinguen en el epidídimo tres regiones: cabeza, cuerpo y cola. El tránsito de los espermatozoide por el epidídimo dura entre 10 y 14 días, siendo el tránsito por la cabeza y el cuerpo de 2 a 4 días (Amann, 1972) y el tránsito por la cola de 6 a 10 días, pudiendo éste acelerarse en un 10 a 20 % al aumentar la frecuencia de los eyaculados, por reducción del tiempo de permanencia de los espermatozoides en cada región (Hafez, 1989). El transporte a través del epidídimo, depende de dos mecanismos, por un lado de las contracciones de las paredes del conducto y por otro, de la presión que ejerce el contenido. La musculatura lisa de las paredes del conducto del epidídimo, aumenta poco a poco en su constitución histológica desde la cola del epidídimo al conducto deferente (Bedford, 1975).

La cola del epidídimo es un lugar de almacenamiento de espermatozoides. El macho caprino tiene la capacidad de almacenar 12 a 16 mil millones de espermatozoide en él (Evans; Maxwell, 1990), aunque el ambiente es favorable su estado de viabilidad no se conserva indefinidamente, siendo los espermatozoide seniles eliminados por orina o reabsorbidos por las paredes del canal epididimario, luego de su desintegración (Hafez, 1989).

Los cambios más importantes sufridos por el espermatozoide durante su tránsito por el epidídimo son (Amann *et al.*, 1993):

- ♦ Modificaciones en el complejo DNA-proteínas del núcleo: se produce el cambio de histonas por protaminas, lo que se traduce en el incremento de puentes di sulfuro y una mayor condensación de la cromatina;
- ♦ Cambios bioquímicos asociados con el desarrollo de la capacidad de movilizarse: estos cambios en la capacidad biosintética recaen en los fluidos que bañan los espermatozoides, fluidos segregados y absorbidos por el epitelio del conducto epididimario (Turner *et al.*, 1991; Tulsiani *et al.*, 1993), el resultado es un cambio en los patrones metabólicos de las mitocondrias de la cola y en el estado estructural del axonema (Hafez, 1989);

- ♦ Se observan grandes cambios en la membrana plasmática: la que además de adquirir la estabilidad necesaria para soportar el almacenamiento en la cola del epidídimo y el tránsito a través del tracto reproductor de la hembra, adquiere puntos de reconocimiento con el ovocito,
- ♦ La membrana acrosomal externa madura con el fin de asegurar el contenido enzimático del capuchón acrosómico (Amann *et al.*, 1993), y adquiere potencial eléctrico negativo, rasgo distintivo de la maduración, atribuido a la adición de ácido siálico a la membrana plasmática del espermatozoide (Holt, 1980).

- Plasma Seminal. Origen, composición, finalidad e importancia.

El plasma seminal es una compleja solución de fluidos testiculares y secreciones del epidídimo y de las glándulas sexuales accesorias, que además de posibilitar la vehiculización de los espermatozoides y aportar factores nutricionales, constituye el medio natural en que maduran los mismos. Cumple un rol fundamental en el proceso de capacitación y reacción acrosómica, afectando la aptitud fertilizante del eyaculado (Saling, 1989; Yanagimachi, 1994 a y b). Además, el plasma seminal es el responsable de la limpieza de la uretra antes de la cópula, eliminando bacterias y orina, por medio del goteo pre coital (Pellicier-Rubio *et al.*, 1997 y 1998, Sias *et al.*, 2005). Las glándulas sexuales accesorias del macho caprino que contribuyen con sus secreciones al plasma seminal son: los conductos deferentes, las ámpulas, las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales; siendo sus secreciones reguladas por la testosterona y por lo tanto, los compuestos que constituyen el plasma seminal son numerosos.

En su conjunto, la compleja composición del plasma seminal, juega un importante rol en la habilidad fecundante del espermatozoide. Las proteínas presentes en él, tienen un papel trascendente durante la reacción acrosómica (Florman; First, 1988; Cross, 1993), en la regulación del Ca^{2+} tomado por el espermatozoide (Clark *et al.*, 1993) y en la modulación de la capacitación espermática (Desnoyers; Manjunath, 1992; Miller *et al.*, 1990). Tal es el grado de controversia respecto de la contribución

del plasma seminal que es materia de continuo debate, debido a que algunos componentes actúan como factores que promueven la fertilidad (Killian *et al.*, 1993) y otros actúan como factores antifertilizantes cuando se evalúan “*in vitro*” (Shivaji; Bhargava, 1987).

El color amarillo del plasma seminal del macho caprino se debe a la presencia de riboflavina proveniente de las vesículas seminales (Mendoza *et al.*, 1989; Evans; Maxwell, 1990). El pH se encuentra alrededor de la neutralidad y es proporcionado por un complejo sistema amortiguador, que por su efecto tampón, protege a los espermatozoides de los bruscos cambios de pH y osmolaridad de las agrestes condiciones del aparato reproductor femenino (Evans; Maxwell, 1990) que deteriorarían su supervivencia.

Es el agua (75% en el macho caprino; Evans; Maxwell, 1990) el componente principal del plasma seminal pero, además, es posible encontrar las más variadas sustancias orgánicas e inorgánicas, entre las que sobresalen: ácido cítrico (Barth *et al.*, 1986; Mendoza *et al.*, 1989; Evans; Maxwell, 1990; Roca *et al.*, 1993), ácido láctico, fructosa (Barth *et al.*, 1986; Mendoza *et al.*, 1989; Evans; Maxwell, 1990; Roca *et al.*, 1993), sorbitol (Evans; Maxwell, 1990), inositol (Evans; Maxwell, 1990), glucosa (Mendoza *et al.*, 1989), otros azúcares libres (Barth *et al.*, 1986), glicoproteínas, albúmina, sialomucoproteína y globulina (Barth *et al.*, 1986); proteínas con afinidad por la heparina (HAP's) (La Falci *et al.*, 2002), glicerilfosforilcolina (Barth *et al.*, 1986; Mendoza *et al.*, 1989; Evans; Maxwell, 1990), glicerofosfato (Mendoza *et al.*, 1989), glicerol (Mendoza *et al.*, 1989), riboflavina (Mendoza *et al.*, 1989; Evans; Maxwell, 1990), entre los iones inorgánicos, cloro, potasio y sodio se encuentran en cantidades considerables (Evans; Maxwell, 1990).

También se han detectado gran cantidad de hormonas tales como inhibina, FSH, , LH, testosterona (Miyamoto *et al.*, 1987), andrógenos, estrógenos, prostaglandinas (Barth *et al.*, 1986; Evans; Maxwell, 1990; Harper, 1994), gonadotrofina coriónica, hormona del crecimiento, insulina, glucagón, prolactina, relaxina, hormona liberadora tiroidea (Hafez; Hafez, 2002) y también encefalinas e inmunoglobulinas como la IgA (Hafez *et al.*, 2002).

Otras sustancias orgánicas presentes en el plasma seminal y que particularmente en el caprino tienen importancia, son dos enzimas con actividad fosfolipasa A₂ provenientes de las glándulas bulbouretrales, que reciben el nombre de “Enzima coagulante de la yema de huevo” (EYCE) (Roy, 1957) y “Fracción glicoproteica del plasma seminal” (BUSgp60) (Pellicier-Rubio *et al.*, 1997 y 1998; Sias *et al.*, 2005). La presencia de estas enzimas reviste importancia en el caprino pues exhiben actividad sobre alguno de los constituyentes utilizados en los diluyentes de semen (Roy, 1957; Pellicier-Rubio *et al.*, 1997 y 1998), reacción que como consecuencia trae deterioro de la motilidad, pérdida en la integridad del acrosoma y aglutinación “*in vitro*” de los espermatozoides (Nunes *et al.*, 1982).

Muchos de estos componentes modifican su concentración a lo largo del año, haciendo variar, en consecuencia, la composición del plasma seminal del macho caprino. Por ejemplo, la mayor concentración y actividad enzimática de las proteínas con afinidad por la heparina (HAP's) se encuentra en la época no reproductiva (La Falci *et al.*, 2002), la inhibina en plasma seminal, gradualmente aumenta de primavera a verano, se reduce en otoño e inicia su recuperación durante el invierno (Miyamoto *et al.*, 1987), algo similar ocurre con la enzima fracción glicoproteica del plasma seminal (BUSgp60) que incrementa su secreción y actividad durante la época reproductiva, es decir durante el otoño hasta el inicio del invierno (Sias *et al.*, 2005), por otra parte el ácido cítrico y la fructosa en plasma seminal también tienen un comportamiento estacional, siendo altas las concentraciones durante el verano y otoño, disminuyendo hacia el invierno, encontrándose durante la primavera las más bajas concentraciones de ambas (Roca *et al.*, 1993).

Continúa siendo aún desconocida la importancia biológica y fisiológica de la presencia de enzimas en la secreción de las glándulas bulbouretrales (Pellicier-Rubio *et al.*, 1997; Sias *et al.*, 2005), pero se presume, en base a la actividad biológica demostrada por la fracción glicoproteica del plasma seminal (BUSgp60) y otras integrantes de la subfamilia de las “Lipasa pancreática relacionada a proteína 2” (PLRP2), que podría estar implicada en alguno de los siguientes tres mecanismos:

- Participar en la fusión de membranas del espermatozoide durante la reacción acrosómica, como se describió en el ovino (Roldan *et al.*, 1993),

- Poseer un importante papel en el metabolismo energético del espermatozoide (Scott *et al.*, 1967; Poulos *et al.*, 1973; Mita *et al.*, 1995) o
- Que estas enzimas jueguen el importante rol de higiene y desinfección de la uretra, al ser la secreción de las glándulas bulbouretrales integrante principal de goteo pre coital, (Pellicier-Rubio *et al.*, 1997 y 1998; Sias *et al.*, 2005).

- Cambios en el espermatozoide durante su tránsito por el tracto reproductor femenino.

Todos los mamíferos placentados (euterianos) poseen un mecanismo evolutivo de regulación funcional del espermatozoide recién eyaculado, quien a pesar de haber adquirido en el epidídimo motilidad progresiva y cierta capacidad fecundante, es incapaz de fertilizar el ovocito si es puesto en contacto con él, inmediatamente de eyaculado. Por lo tanto, los espermatozoides deben experimentar un proceso final de maduración durante el cual adquieren posteriormente capacidad fertilizante y de interactuar con las células del cummulus oofurus y el ovocito (Mortimer, 2000). Este proceso llamado capacitación fue descubierto independientemente por Austin y Chang en 1951.

El proceso de prevención de la capacitación es regulado por proteínas presentes en el plasma seminal (Yanagimachi, 1994 a y b) o en las secreciones del epidídimo, las cuales poseen efecto decapacitante al interactuar con el espermatozoide. Entonces, es durante el tránsito del espermatozoide por el tracto reproductor femenino donde éste sufre los tres procesos finales de su maduración: la capacitación, la hiperactivación y la reacción acrosómica. Cadena de procesos que terminan indefectiblemente en la fertilización o en la muerte del espermatozoide (Harrison, 1996).

- Capacitación e hiperactivación espermática.

Como mencionáramos anteriormente el espermatozoide inmediatamente de eyaculado es incapaz de fertilizar al ovocito, para adquirir esta capacidad debe sufrir un conjunto de procesos fisiológicos y moleculares durante su tránsito por el tracto genital femenino, este proceso es conocido como capacitación y le confiere la capacidad de fecundar al ovocito. Una manifestación que pone en evidencia la ocurrencia de este proceso está relacionada con cambios en los patrones de movilidad del espermatozoide, cambios conocidos con el nombre de hiperactivación espermática (Yanagimachi, 1994 a y b; Suarez, 1996). Estos cambios incluyen al conjunto de estructuras del espermatozoide, teniendo manifestaciones en la cabeza, la cola y en la fluidez de su membrana plasmática, que hará cambiar la concentración intracelular de iones (Visconti *et al.*, 1998).

A pesar del tiempo transcurrido desde su descubrimiento (Austin, 1951; Chang, 1951) es incipiente lo que se conoce de este proceso, debido a que poco se sabe de sus bases moleculares, del orden en que estos cambios se producen y de la finalidad de los mismos. Pero se cree, que la capacitación es el proceso natural encargado de regular el preciso mecanismo de la fecundación, a través de la coordinación del estado funcional del espermatozoide y del ovulo (Bedford, 1983).

Es más precisamente en el útero o en el oviducto donde tiene lugar la capacitación (Yanagimachi, 1994 b), dependiendo de la especie animal, ya que varía entre éstas el lugar donde el macho deposita el semen. También la capacitación puede ser inducida "*in vitro*", incubando espermatozoides en medios de cultivo cuya composición se asemeje al líquido oviductal (Visconti *et al.*, 1998). De los constituyentes que componen este medio, los que jugarían un papel fundamental en la capacitación serían el suero de oveja en celo o albúmina sérica (si se tratase de semen ovino o bovino, respectivamente), NaHCO_3 y Ca^{2+} (Visconti *et al.*, 1998). En este contexto, estos autores trabajaron en un modelo de caminos de señalización transmembrana e intracelular, representando hipotéticamente el mecanismo de la capacitación espermática (Figura 7). Este estado, en el espermatozoide puede ser determinado en laboratorio mediante pruebas de fertilización, inducción de la reacción acrosómica y mediante la prueba de la clortetraciclina (Prueba de la CTC) (Visconti *et al.*, 1998).

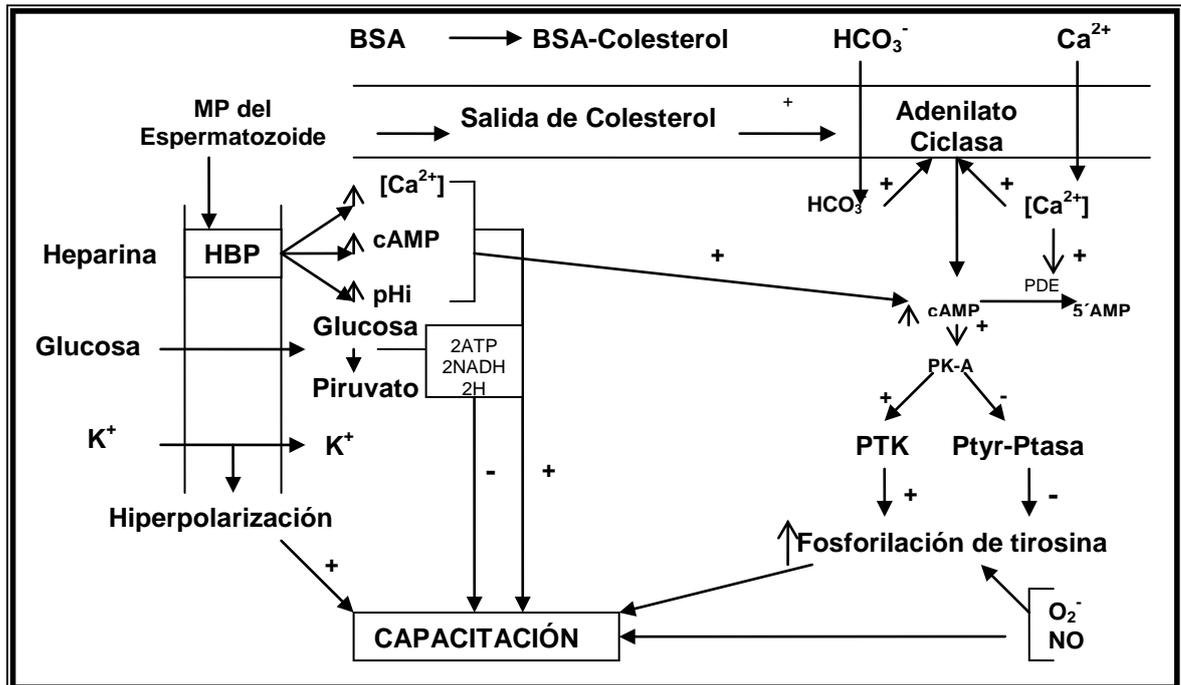


Figura 8: Modelo hipotético de los mecanismos de regulación de la capacitación espermática. (-) indica regulación negativa; (+) indica regulación positiva. BSA (albumina sérica bovina); HBP (proteína de unión a heparina); PTK (proteína quinasa tirosina); Pter-Ptasa (fosfatidilserina fosfatasa); PDE (fosfodiesterasa nucleótido cíclica), PK-A (proteína quinasa A) (Tomado de Visconti *et al.*, 1998).

Algunos autores observaron que durante este proceso se eliminan o alteran elementos que la membrana plasmática del espermatozoide adquiere durante su tránsito por el epidídimo (Boué *et al.*, 1996) y/o del plasma seminal (Thérien *et al.*, 1995), pareciendo ser ésta una condición “*sine qua non*” para que el espermatozoide adquiera la capacidad fecundante durante su tránsito por el tracto reproductivo de la hembra (Maxwell; Jonson, 1999). Otras modificaciones que ocurren en el espermatozoide son la relocalización de sus antígenos de membrana (Benoff *et al.*, 1993), activar o inhibir el flujo de iones y la fluidez de la membrana a través del cambio en la composición lipídica (Wolf *et al.*, 1986), todas éstas necesarias para que se complete la capacitación y adquiera la capacidad de fecundar al ovocito.

Los espermatozoides que son congelados y posteriormente descongelados, se encuentran en estado de capacitación acelerada producto de los bruscos procesos sufridos durante ambos pasos (Watson, 1995). Mediante el uso de antioxidantes es posible revertir algunos de los cambios anteriormente mencionados, logrando de esta forma que espermatozoides capacitados, pueden regresar a un estado de espermatozoides pre capacitados (Maxwell; Watson, 1996).

Durante el proceso de capacitación, existe formación de sustancias reactivas al oxígeno (ROS) como anión superóxido y peróxido de hidrógeno. La excesiva producción de sustancias reactivas al oxígeno daña la motilidad y la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

La formación de estas sustancias, sería una de las razones por las cuales los espermatozoides capacitados poseen a partir de adquirir tal condición una vida media fértil reducida y limitada a unas pocas horas luego de que este proceso se ha iniciado. Es ésta una razón clave a tener presente cuando se planifica realizar una sincronización de celos y ovulación para una posterior IA cervical, esta razón se fundamenta en el hecho que los espermatozoide bajo esta condición podrían ser incompetentes a la hora de fertilizar el óvulo, si envejecen en el tracto reproductor de la hembra (Maxwell; Watson, 1996; Salamon; Maxwell, 2000).

La hiperactivación espermática es el cambio más drástico que ocurre en el tracto reproductor femenino, tiene como manifestación más visible un cambio en el patrón de movimiento del flagelo, desde un tipo de movimiento progresivo hacia movimientos vigorosos, recordando los golpes de un látigo (Yanagimachi, 1981 citado por Olds-Clarke, 1990). Una característica que le es propia, es que la hiperactivación puede continuar independientemente de la capacitación espermática, una vez que se ha iniciado el ingreso de Ca^{2+} a la célula durante esta última (Olds-Clarke, 1990).

- Reacción acrosómica.

La reacción acrosómica es un evento esencial para la penetración de la zona pelúcida, ocurre como consecuencia de la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa. En múltiples sitios de esta fusión se forman poros transmembrana que permiten la salida del contenido acrosomal (Bedford, 1983; Figura 9).

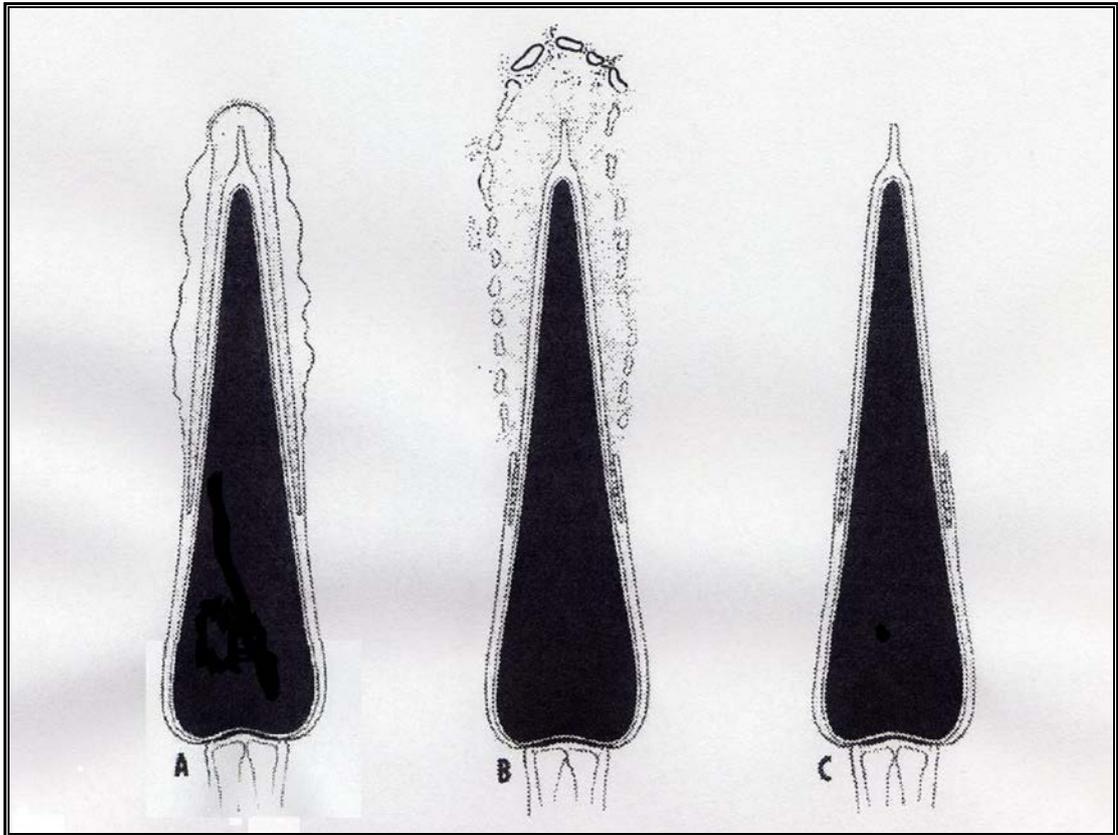


Figura 9: Tres estadios de la reacción acrosómica. Esta serie de ilustraciones muestran tres estadios de la reacción acrosómica, **A:** Cabeza intacta de espermatozoide de mamífero, **B:** Cabeza del espermatozoide reaccionado y **C:** Espermatozoide que ha perdido el acrosoma, en este estado el espermatozoide penetra la zona pellucida en busca del ovocito (Tomado de Bedford, 1983).

Luego, el espermatozoide puede unirse a la membrana plasmática del ovocito y seguir su paso a través del mismo para cumplir con el proceso de la fecundación. La reacción acrosómica es considerada como la demostración que el espermatozoide está completamente capacitado (Curry, 2000).

La capacidad heterogénea, por parte de los espermatozoides, de experimentar la reacción acrosómica (Bavister, 1990; citado por Amann *et al.*, 1993) es un mecanismo natural que prevé espermatozoides listos para realizar la fecundación del ovocito en el sitio y momento adecuado, por un tiempo más prolongado que si la capacitación se realizara de manera homogénea.

Vega Hernández; Treviño y Félix (2002) postularon un conjunto de eventos que desembocan en la reacción acrosómica. Además, estos autores concuerdan en la

existencia de un aumento lento y sostenido en la concentración de Ca^{2+} intracelular para que se desarrolle la reacción acrosómica (Figura 10).

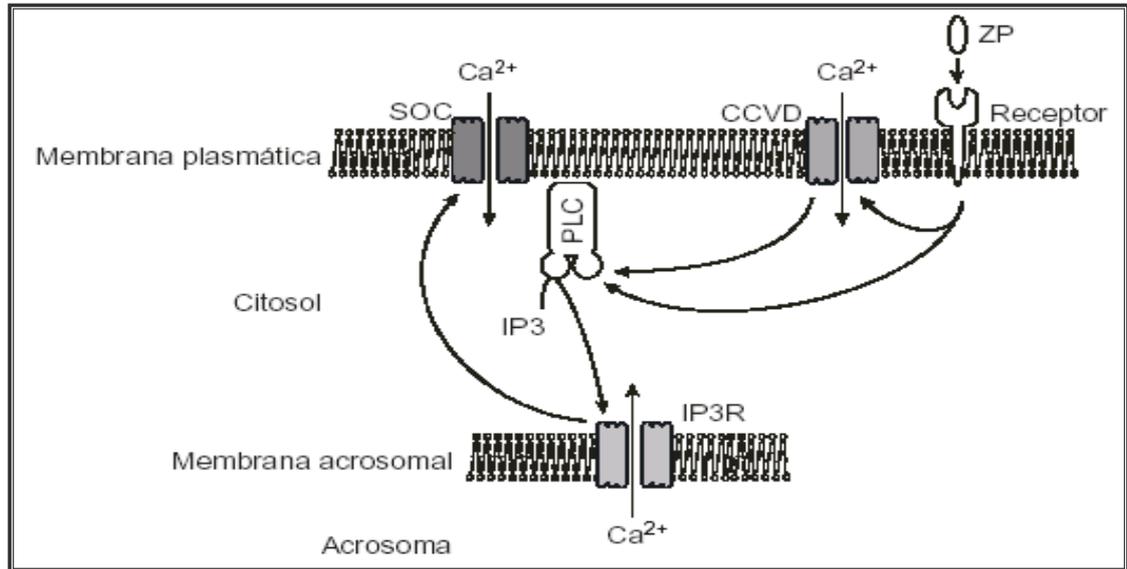


Figura 10: Participación de canales de Ca^{2+} durante la reacción acrosómica en el espermatozoide de los mamíferos. La unión de la glucoproteína de la zona pelúcida (ZP) a su receptor da como resultado: 1) Una despolarización de la membrana y una entrada subsecuente de Ca^{2+} a través de un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje (CCVD) y, 2) la activación de la fosfolipasa C (PLC) que conduce a la generación de inositol trifosfato (IP_3). Este segundo mensajero activa sus receptores (IP_3R) en la membrana acrosomal, liberándose Ca^{2+} al citosol. El vaciamiento de este reservorio provoca la apertura de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática (SOC). El conjunto de estos eventos conlleva a la reacción acrosómica (Tomado de Vega Hernández *et al.*, 2002).

Además de la zona pelúcida, la progesterona (producida por las células de la granulosa y del cummulus ooforus) induce la reacción acrosómica en distintas especies: bovino (Therien; Manjunath, 2003), caprino (Somanath; Suraj; Gandhi, 2000), canino (Brewis *et al.*, 2001), porcino (Melendrez; Meizel; Berger, 1994), equino (Meyers *et al.*, 1995), así como la heparina en el bovino (Whitfield; Parkinson, 1992). Del mismo modo que la capacitación espermática, también se puede inducir la reacción acrosómica “*in vitro*” mediante el uso del ionóforo A23187 (Aitken *et al.*, 1984). Una vez inducida, dicha reacción no puede ser interrumpida o revertida (Yanagimachi, 1994 b).

2.3.-TÉCNICAS ASISTIDAS DE REPRODUCCIÓN EN LOS CAPRINOS

- Inseminación Artificial

La IA es una herramienta ideal para la difusión de biotipos adecuados a nuestra realidad productiva, para un control de la reproducción y para implementar programas de mejora genética para cada una de las actividades productivas de la especie.

En nuestro país, esta tecnología ha tenido hasta el presente una escasa difusión. Pero no es de descartar que en un futuro cercano, de la mano del desarrollo alcanzado por el sistema productivo y los programas de selección local, la IA alcance la difusión de otras regiones del mundo. Una de las limitantes de la difusión de esta técnica reproductiva lo ha constituido la dificultad que presenta la crioconservación del semen de caprino.

Otra dificultad la representa las características anatómicas del aparato genital de la cabra, especialmente la conformación del cervix. Aunque en nuestro trabajo, con los instrumentos utilizados en la IA, sería más factible depositar profundamente el semen en el cervix o inclusive atravesarlo que en la oveja (Ritar, 1993). Por lo tanto, el cervix constituye la primera barrera al ascenso de los espermatozoides, alcanzando sólo un número menor el lugar de fecundación.

Por estas razones, existen tres modalidades de IA en caprinos: vaginal, cervical e intrauterina.

- por vía vaginal

Esta inseminación no necesita mayor instrumental, ya que sólo depositamos el semen en la vagina. Tiene el inconveniente que para lograr buenos resultados de preñez es necesario depositar gran volumen de semen o alta concentración de espermatozoides con lo cual el rendimiento por eyaculado es bajo en número de cabras inseminadas.

- por vía cervical

Es el principal método de inseminación en cabras. Debido a que el objetivo de deposición del semen es el cérvix es necesario utilizar instrumental un poco más complejo, como ser una pistola de inseminación (catéter de inseminación) y un vaginoscopio con luz, requiriendo además la elevación del tercio posterior de las cabras a fin de facilitar el trabajo del inseminador.

Dada la anatomía del cervix y la mayor facilidad para franquearlo en la cabra respecto de la oveja (Ritar, 1993), el semen se puede depositar a diferentes niveles o profundidades del mismo, mejorando los resultados de fertilidad conforme aumenta la profundidad de la inseminación (Ritar; Salamon, 1983; Ritar *et al.*, 1990; Gibbons, 2002; Salvador *et al.*, 2005).

Esta forma de inseminación permite un mejor aprovechamiento del semen, ya que el volumen utilizado es bajo y la concentración de espermatozoides también, aunque sigue siendo grande en comparación con el necesario en IA intrauterina.

- por vía laparoscópica

En este caso el semen se deposita directamente en la luz del útero o inclusive al final del cuerno. Existen dos vías de acceso al útero, una transcervical y otra quirúrgica. En la vía transcervical se accede al útero a través del cérvix, ayudado con la sujeción del cervix y a veces, con la aplicación de un fármaco relajante

El acceso al útero ha evolucionado desde su comienzo en la década de los ´70, cuando se realizaba un acceso quirúrgico por laparotomía medioventral (Lightfoot; Salamon, 1970), hasta la década de los 80, en la que por medio de un laparoscopio se accede a la cavidad abdominal (Killeen; Caffery, 1982) permitiendo la localización y deposición del semen en la luz uterina. Es el segundo método más empleado en la IA de pequeños rumiantes.

Presenta una serie de inconvenientes como son el costo del laparoscopio, la formación específica del personal inseminador, el número de operarios necesarios y el

bajo número de ovejas inseminadas por hora, lo que en conjunto hacen que el costo total de la técnica sea alto y se reserve su utilización para inseminar con semen de alto valor genético o para la transferencia embrionaria.

La IA intrauterina puede ser un procedimiento adecuado para mejorar la fertilidad en caprinos lograda por IA con semen congelado, ya que el lugar donde se produce el depósito del semen elimina el problema del primer obstáculo (el cérvix), como así también el envejecimiento de los espermatozoides en el tracto genital de la hembra (Maxwell; Salamon, 1993).

- Eficiencia reproductiva de la fertilidad “*in vivo*” por inseminación artificial

Son numerosos los factores que influyen en la eficiencia lograda a través de la IA, los cuales se pueden agrupar en: propios de la hembra o propios de la técnica. Los inherentes a la hembra son: la condición corporal (Gonzales de Bulnes; Osoro; López Sebastián, 1999; Cueto; Gibbons; Abad, 2000; Kusinas; *et al.*; 2001), la edad (Ritar *et al.*, 1990 a), la alimentación recibida, el tratamiento de sincronización de celo y ovulación recibido (Ritar y Salamon, 1983), el número de tratamientos de sincronización recibidos en el tiempo (Roy *et al.*, 1999; Drion *et al.* 2001), la condición fisiológica – seca o en lactación- y el nivel de producción (Gonzales *et al.*, 1990), la conformación anatómica del cuello del útero (Ritar; Salamon, 1983; Ritar; Ball; O'May, 1990 a y b; Ritar, 1993; Gibbons, 2002; Salvador *et al.*, 2005), entre otros.

Entre los factores propios de la técnica podemos mencionar: el sitio de deposición del semen (Ritar; Salamon, 1983; Ritar; Ball; O'May, 1990 a y b; Ritar, 1993; Gibbons, 2002; Salvador *et al.*, 2005), el tipo de semen utilizado: semen fresco (Ritar; Salamon, 1983; Lorenzo *et al.*; 1997; Greyling; van der Nest, 2000; Motlomelo; Greyling; Schwalbach, 2002; Romano, 2004; Lehloenya; Greyling; Schwalbach, 2005) o refrigerado o congelado (Ritar; Salamon, 1983; Ritar, 1993; Ritar; Ball, 1993; Ferrari *et al.*, 1998; Dorado; Rodríguez; Hidalgo, 2007); el grado de dilución del semen (Ritar *et al.*, 1990 a y b), tipo de empaquetado utilizado para congelarlo (Ritar *et al.*, 1990 a y b; Ritar; Ball, 1991), lugar del tracto reproductivo donde es depositado el semen (Ritar *et al.*, 1990 a; Ritar; Ball, 1991), momento de ovulación y momento de realizada la

inseminación (Ritar et al., 1990 a; Ritar; Ball, 1991), número de inseminaciones y dosis de espermatozoides (Ritar *et al.*, 1990 a), estos entre los más importantes.

En el Tabla 2, se pueden observar datos de eficiencia reproductiva “*in vivo*” obtenidos en diferentes partes del mundo a través de variados métodos utilizando semen fresco, refrigerado y congelado.

Tabla 2: Fertilidad después de inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado

Referencia	Método Sincronización	Época de Sincronización	Diluyente	Rango de Dilución	Método de Conservación Semen	Lugar IA	Concentración de spz/dosis ($\times 10^6$) o volumen (ml)	N° inseminaciones	N° de Cabras IA	Preñez o parición (%)	Comentarios
Motlomelo, <i>et al.</i> , 2002.	MAP 16 FGA 16 CIDR 16	Otoño	Leche des.	1:2	Fresco diluido	Cervical	300 en 0,1	2 (48 y 60 hs. pos extrac.-Esp)	30 30 30	51,7 60,0 46,7	CIDR con P4. Preñez (%)
Romano, 2004	CIDR 13 FGA 13 MAP 13	Otoño	Leche des.	ND	Fresco diluido y refrigerado	Intra cervical	ND	2 (12 y 24 hs. pos celo)	19 19 20	12/19 (63) 12/19 (63) 13/20 (65)	CIDR con P4. Parición (%)
Greyling <i>et al.</i> , 2000	CN MAP 60mg 14 MAP 30mg 14	Otoño.	No	--	Fresco	Cervical	0,05	2 (12 y 24 hs pos celo) 2 (48 y 60 hs. pos extrac.-Esp)	20 20 20	75 65 70	Preñez (%)
Lehloenya <i>et al.</i> , 2005	MAP 16 MAP 16	Otoño.	Leche des.	1:2	Fresco diluido	Cervical	6-700 en 0,1	2 (48 y 60 hs. pos extrac.-Esp)	42 48	52 53	Raza Boer Raza Nguni
Lorenzo <i>et al.</i> , 1997	ND	Prim. Ver. Otoño Inv.	ND	ND	Fresco	ND	ND	ND	20 13 21 15	80 69,20 80,95 60	Parición (%)
Gibbons, 2002	ND	ND	ND	ND	congelado	Cervical Laparoscopia	200 100	ND	620 1238	40-45 46-60	Parición (%)
Chauhan <i>et al.</i> , 1990	ND	ND	Tris-YH 20% Lech. des.-YH YH-Cit.-Glu.	1:10	Congelado en pajuelas	ND	140-180 en 0,25	ND	26	80,7	Parición (%)
Bedotti <i>et al.</i> , 2003	CN	ND	ND	ND	ND	Cervical	ND	Servicio natural	170	92,12	Parición (%)
Dorado, <i>et al.</i> , 2007	FGA 11	ND	Tris-YH 20% Lech. des.-YH 20%	ND	ND	Intra cervical	ND	2 (36 y 60 hs. pos extrac.-Esp)	21 21	42,9 (28,6) 52,4 (47,6)	Preñez (Parición) (%)
Ferrari <i>et al.</i> , 1998	MAP 11	Otoño	Tris-YH 1,5%	ND	Congelado	Cervical	ND	ND	16	31,2	Preñez (%)

Tabla 2: Fertilidad después de inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado.

Referencia	Método Sincronización	Época de Sincronización	Diluyente	Rango de Dilución	Método de Conservación Semen	Lugar IA	Concentración de spz/dosis ($\times 10^6$) o volumen (ml)	N° inseminaciones	N° de Cabras IA	Preñez, parición u otras	Comentarios
Ritar, 1993	CIDR	Otoño	Tris-Cit.-Glu.-YH 1,5%		Congelado en pastillas	Cervical			354		
Ritar <i>et al.</i> , 1990	FGA CIDR				Congelado en Pastillas o Pajuelas	Cervical Laparoscópica	80 120 160		1833	39,1 63,6 52,1	Preñez (%)
Ritar; Ball, 1993	CIDR	Otoño	Tris-Cit.-Glu.-YH 1,2 ; 1,5 y 1,8%	1:0,5 1:2	Congelado en pastillas o pajuelas	Cervical	0,09 y 0,12 (pastillas) o 0,25 (Pajuelas)		109 113	29,4 37,2	Parición (%)
Roca <i>et al.</i> , 1997	FGA 11	Otoño Prim.	Tris-Cit.-Glu.-YH 2%		Refrigerado diluido en pajuelas	Cervical	120 en 0,5	2 (31 y 49 hs. pos extrac.-Esp)	115 104	75 73	Preñez (%)
Ritar; Salamon, 1983	FGA 16-18	Otoño	Tris-Cit.-Glu.-YH 9%	1:2	Congelado en pastillas Freso diluido	Cervical	60 120	1 ó 2 (10-14 y 24 hs. pos extrac.-Esp)	64 62	84,4 (75) 67,7 (50)	Preñez (Parición) (%)
Ritar <i>et al.</i> , 1989	CIDR FGA	Otoño			Congelado	Laparoscópica				46 65	Parición (%)
Vera <i>et al.</i> , 2004	CN	ND			SNC SDC Fresco Congelado en pajuelas	Cervical	ND ND 0,12 0,5	ND 1 1 1	40 40 40 40	74 64 63 18	Parición (%)
Vera <i>et al.</i> , 2003	CN	Prim. Ver. Otoño Invier.			SNC SNC SNC SNC	Cervical	ND	ND	75 210 210 125	9,0 67,7 77,8 70,6	Parición (%)

Aclaración: Dentro de cada fila respetar la línea, ya que los datos presentados hacen referencia a experimentos y resultados obtenidos en cada uno de ellos.

Referencias: **SPZ:** Espermatozoides; **MAP:** Acetato de Medroxiprogesterona; **FGA:** Acetato de Fluorogestona; **CIDR:** Dispositivo Interno de Liberación controlada de drogas; **P4:** progesterona; **ND:** No disponible en la publicación; **CN:** Celo natural; el **número** que acompaña el método de sincronización expresa los días de duración del tratamiento; **YH:** yema de Huevo; **Leche. des:** leche descremada; **Cit.-Glu.:** Citrato-Glucosa; **pos extrac.-Esp :** posterior a la extracción de la esponja; **SNC:** Servicio Natural a Campo; **SDC:** Servicio Dirigido a Corral. Prim.: Primavera; Ver.: Verano; Inv.: Invierno.

2.4.- PROCESAMIENTO DEL SEMEN

Obtener una muestra de semen, constituye el primer paso para poder realizar trabajos en espermatología. El o los método/s de recolección de semen debe/n cumplir con algunos requerimientos mínimos para garantizar la calidad de los eyaculados, no suponer peligro para el animal ni para el operador y permitir la obtención de volúmenes seminales semejantes a los de una monta natural, evitando tanto la contaminación como los cambios bruscos de temperatura.

Es muy importante examinar con precisión los órganos reproductores, puesto que la producción de semen está relacionada con el tamaño testicular (1 g de testículo produce 20.000 espermatozoide/día). Por otra parte, la palpación testicular permite eliminar aquellos machos con alteraciones morfológicas o patológicas (Evans; Maxwell, 1990).

Un factor a tener presente es la influencia de la edad en la calidad relativa del semen obtenido de un macho. Las primeras divisiones de las espermatogonias en los túbulos seminíferos que inician la actividad de formación de espermatozoides tienen lugar entre los 40 y 50 días posnacimiento del animal. Los primeros espermatoцитos se pueden observar alrededor de los 60 días, momento a partir del cual se establece en forma permanente la espermatogénesis. Sin embargo, recién a los 84 días prácticamente todos los tubos seminíferos se encuentran activos (Hafez, 1989). En la raza caprina Takara, los primeros espermatozoides se observan en los conductos deferentes a la edad de 3 meses, apareciendo células espermáticas en los túbulos seminíferos a los 4 meses de edad (Nishimura *et al.*, 2000).

En este momento, los espermatozoides presentes en los primeros eyaculados en un alto porcentaje se encuentran incompletos, inmaduros y con malformaciones, siendo su motilidad mas bien escasa (Hafez, 1989). Por lo tanto, la edad de los machos es un factor muy importante en el rendimiento seminal, ya que en animales menores a los 6 meses de vida la espermatogénesis no está plenamente desarrollada consiguiendo por lo tanto eyaculados de calidad variable. Por otro lado, machos con más de 4 años de edad pueden presentar menor producción seminal y calidad del eyaculado, lo que también se constituye en un factor a tener en cuenta.

La frecuencia de recolección es un factor no menos importante, debido a que puede hacer variar algunos parámetros cuantitativos (volumen, concentración y número total de espermatozoides) (Ritar *et al.*, 1992), siendo la frecuencia de recolección más adoptada en caprinos de 1-2 saltos por semana (Deka; Rao, 1986; Chauhan; Anand, 1990).

- Métodos de recolección del semen: Vagina Artificial

El uso de la vagina artificial es el método más utilizado para la recolección de semen caprino gracias a las ventajas que confiere (Ritar; Salamon, 1982; Memmon *et al.*, 1985; Deka; Rao, 1986; Chauhan; Anand, 1990; Pintado *et al.*, 1991; Roca *et al.*, 1992 y 1993; Ritar; Ball, 1993; Ritar, 1993). Se realiza mediante la utilización de un dispositivo artificial cilíndrico que simula la vagina de la cabra y que consta de un tubo externo rígido de material sintético y de una camisa interna de látex que se repliega y se asegura sobre los extremos del tubo externo con bandas elásticas. A uno de los extremos de la vagina se le adosa un cono de látex unido a un tubo de colector. El ajuste de la vagina se logra mediante una válvula lateral por donde se introducen agua caliente y aire que quedan alojados entre el tubo rígido y la camisa interna de la vagina.

Existe variedad de modelos de vagina artificial que se diferencian en su morfología, pero todas proporcionan estímulos térmicos (temperatura), elásticos y mecánicos (presión) necesarios para mantener la erección del pene del macho y la eyaculación (Evans; Maxwell, 1990). En los rumiantes, el estímulo ejercido por la temperatura es más importante para producir el eyaculado, que el producido por la presión sobre el pene (Hafez, 1989 y 2002). Por lo tanto la temperatura interior de la vagina artificial debe encontrarse entre 41 y 45° C (Evans; Maxwell, 1990).

- Características Seminales del Caprino:

La espermatogénesis del caprino es continua, siendo afectada por numerosos factores tales como la raza (Karagiannidis *et al.*, 2000; Todini *et al.*, 2007), la edad, la época de nacimiento, la temperatura ambiente, la presencia de otros machos o

hembras, el estado nutricional y el fotoperíodo (Tron, 1986; Roca, 1991; Restall, 1992; Walkden Brown *et al.*, 1993; Perez; Mateos, 1997; Rivera, 2003; Álvarez Ramírez *et al.*, 2001). La influencia del fotoperíodo, se traduce en variaciones en la concentración de hormonas (testosterona, LH y FSH; Delgadillo *et al.*, 1993, 2004 a y b; Barkawi *et al.*, 2006; Todini *et al.*, 2007) y éstas hacen que se presenten variaciones en la cantidad y calidad espermática durante el año (Perez *et al.*, 1996; Lorenzo *et al.*, 1997; Dorado *et al.*, 2003; Al-Ghalban *et al.*, 2004; Delgadillo. *et al.*, 2004 a; Barkawi *et al.*, 2006) variaciones que se presentan también a diferentes edades (Gauthier *et al.*, 1998; Tabla 3).

Es normal que la concentración espermática varíe de 4.302×10^6 /espermatozoides/eyaculado en primavera (Perez *et al.*, 1996; Lorenzo *et al.*, 1997; Karagiannidis *et al.*, 2000; Dorado *et al.*, 2003; Delgadillo *et al.*, 2004a; Al-Ghalban *et al.*, 2004; Barkawi *et al.*, 2006;) a 3.261×10^6 /espermatozoides/eyaculado en otoño (Perez *et al.*, 1996; Lorenzo *et al.*, 1997; Karagiannidis *et al.*, 2000; Dorado *et al.*, 2003; Vera *et al.*, 2003; Al-Ghalban *et al.*, 2004; Delgadillo *et al.*, 2004; Barkawi *et al.*, 2006), estos cambios en la concentración están acompañados por cambios en el volumen (Perez *et al.*, 1996; Lorenzo *et al.*, 1997; Karagiannidis *et al.*, 2000; Dorado *et al.*, 2003; Al-Ghalban *et al.*, 2004; Barkawi *et al.*, 2006;). Mientras que al progresar la edad de los machos, también se observan cambios en la concentración y volumen (Gauthier *et al.*, 1998; Al-Ghalban *et al.*, 2004; Tabla 3).

Respecto de la circunferencia escrotal, también se observan variaciones estacionales (Walkden-Brown *et al.*, 1994; Vera *et al.*, 2002 a y b, 2004; Barkawi *et al.*, 2006; Vera *et al.*, 2008) y del peso testicular (Delgadillo *et al.*, 1993; Walkden-Brown *et al.*, 1994; Delgadillo *et al.*, 2004 b), estas variaciones también se manifiestan a distintas edades (Vera *et al.*, 2002a y b; 2004; Al-Ghalban *et al.*, 2004; Vera *et al.*, 2008; Tabla 3).

Este mismo comportamiento se observa en el porcentaje de espermatozoides vivos (Al-Ghalban *et al.*, 2004; Delgadillo *et al.*, 2004a Barkawi *et al.*, 2006), la motilidad (Perez *et al.*, 1996; Lorenzo *et al.*, 1997; Karagiannidis *et al.*, 2000; Dorado *et al.*, 2003; Al-Ghalban *et al.*, 2004; Delgadillo *et al.*, 2004 a; Barkawi *et al.*, 2006) y la fertilidad que muestran sus mejores valores durante la estación reproductiva (Lorenzo *et al.*, 1997; Vera *et al.*, 2003 b, Tabla 3). Mientras que las malformaciones

espermáticas también muestran un marcado patrón de comportamiento estacional (Karagiannidis *et al.*, 2000; Dorado *et al.*, 2003; Al-Ghalban *et al.*, 2004; Barkawi *et al.*, 2006).

Respecto del comportamiento de algunas de estas variables (volumen, concentración $\cdot 10^6/\text{ml}$ -, pH; motilidad masal; motilidad individual progresiva; porcentaje de espermatozoides vivos y presencia de anormalidades) en relación a la secuencia del eyaculado, algunos autores observaron mejores valores en el segundo eyaculado respecto del primero de ellos (Barkawi *et al.*, 2006). Por el contrario, Ritar *et al.* (1992) observaron un desmejoramiento en el segundo salto respecto del primero en variables como volumen, concentración y tiempo de reacción al eyaculado.

El Tabla 3 muestra las características del semen fresco obtenido por medio de vagina artificial, la circunferencia escrotal y la fertilidad reportada por diferentes autores en el mundo.

Tabla 3: Características de un eyaculado (concentración espermática, volumen, espermatozoides vivos y motiles) obtenido por medio de vagina artificial, valor de la circunferencia escrotal y la fertilidad.

Autor	Concentración espermática (x10 ⁹ /ml)		Volumen (ml)		Circunferencia Escrotal (cm) o Peso Testicular (g)		Espz Vivos (%)		Motilidad		Fertilidad (% Parición)	
	Inc. Foto.	Desc. Foto.	Inc. Foto.	Desc. Foto.	Inc. Foto.	Desc. Foto.	Inc. Foto.	Desc. Foto.	Inc. Foto.	Desc. Foto.	Inc. Foto.	Desc. Foto.
Delgadillo et al., 2004 ^a	Invierno 3,95/ey. Primav.: 4,2/ey.	Oto.: 4,3/ey. Ver.: 3,8/ey.	ND	ND	ND	ND	Inv.: 59,3 Prim.: 45,6	Oto.: 60,7 Ver.: 50	Inv.: 3,3 Prim.: 2,6	Oto.: 3,4 Ver.: 2,6	ND	ND
Lorenzo et al., 1997	Invierno 3,59 Primav. 3,32	Oto.: 3,12 Ver.: 3,69	Inv.: 1,02 Prim.: 0,94	Oto.: 0,94 Ver.: 1,05	ND	ND	ND	ND	Inv.: 3,82 (MM) Prim.: 3,9 (MM)	Oto.: 3,12 (MM) Ver.: 4,07 (MM)	Inv.: 60 Prim.: 80	Oto.: 81 Ver.: 69,2
Perez et al., 1996	6,016±0,15/ml	3,923±0,12/ml	0,48±0,03	1,01±0,06	ND	ND	ND	ND	73 %	76 %	ND	ND
Vera et al., 2003 a	ND	4,948±0,16/ml	ND	1,0±0,27	ND	ND	ND	ND	ND	4,31 (MM)	ND	ND
Vera et al., 2002 a	ND	ND	ND	ND	Inv.:17,2 Prim.:21,9	Oto.: 17,7 Ver.: 24	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Walkden-Brown et al., 1994	ND	ND	ND	ND	Inv.: 22,8 Prim.: 23,6	Oto.:25,1 Ver.:25,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Vera et al.,2003 b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Inv.: 70,6 Prim.: 8,9	Oto.: 77,8 Ver.: 67,7

Tabla 3: Características de un eyaculado (concentración espermática, volumen, espermatozoides vivos y motiles) obtenido por medio de vagina artificial, valor de la circunferencia escrotal y la fertilidad.

Autor	Concentración espermática (x10 ⁹ /ml)		Volumen (ml)		Circunferencia Escrotal (cm) o peso testicular (g)		Espz Vivos (%)		Motilidad		Fertilidad (% Parición)	
	Inc. Foto.	Desc. Foto.	Inc. Foto.	Desc. Foto.	Inc. Foto.	Desc. Foto.	Inc. Foto.	Desc. Foto.	Inc. Foto.	Desc. Foto.	Inc. Foto.	Desc. Foto.
Karagianidis <i>et al.</i> , 2000	Inv.: 3,5 Prim.: 4,3	Oto.: 3,1 Ver.: 3,9	Invi.: 1,1 Prim.: 0,9	Oto.: 1,3 Ver.: 1,3	ND	ND	ND	ND	Inv.: 60 Prim.: 57	Oto.: 69 Ver.: 66	ND	ND
Vera <i>et al.</i> , 2002b	ND	ND	ND	ND	Inv.: G1: 18,7, G2: 20,3 y G3: 23,8. Prim.: G1: 21,7, G2: 24 y G3: 25,8.	Oto.: G1: 20,7, G2: 22,2 y G3: 25,3. Ver.: G1: 24,7, G2: 26,5 y G3: 28,5.	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Vera <i>et al.</i> , 2004a	ND	ND	ND	ND	Inv.: G4: 18,5, G5: 21,3 y G6: 22,1. Prim.: G4: 23,3, G5: 23,3 y G6: 25,2.	Oto.: G4: 18,5, G5: 23,3 y G6: 24,2. Ver.: G4: 25,3, G5: 27,7 y G6: ND.	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Delgadillo <i>et al.</i> , 2004b	ND	ND	ND	ND	Inv.: 76,8 gr Prim.: 93,7 gr	Oto.: 84,9 gr Ver.: 110,1 gr	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Barkawi <i>et al.</i> , 2006	Inv.: 3 Prim.: 1,8	Oto.: 4,6 Ver.: 4,4	Inv.: 0,6 Prim.: 0,4	Oto.: 1 Ver.: 0,9	Inv.: 25 Prim.: 26,2	Oto.: 25,4 Ver.: 27,3	Inv.: 77,2 Prim.: 76,4	Oto.: 82,5 Ver.: 87,2	Inv.: 80,3 (MIP) Prim.: 73,1 (MIP)	Oto.: 79,5 (MIP) Ver.: 81,2 (MIP)	ND	ND

Tabla 3: Características de un eyaculado (concentración espermática, volumen, espermatozoides vivos y motiles) obtenido por medio de vagina artificial, valor de la circunferencia escrotal y la fertilidad.

Autor	Concentración espermática ($\times 10^9/\text{ml}$)		Volumen (ml)		Circunferencia Escrotal (cm) o peso testicular (g)		Espz Vivos (%)		Motilidad		Fertilidad (% Parición)	
	Inc. Foto.	Desc. Foto.	Inc. Foto.	Desc. Foto.	Inc. Foto.	Desc. Foto.	Inc. Foto.	Desc. Foto.	Inc. Foto.	Desc. Foto.	Inc. Foto.	Desc. Foto.
Vera <i>et al.</i> , 2008	ND	ND	ND	ND	Inv.: G7: 17,6 G8: 20,6 G9: 21,5 G10: 22,9 Prim.: G7: 20,9 G8: 23 G9: 24,1 G10: 25,2	Oto.: G7: 19,1 G8: 22,8 G9: 23,9 G10: 25,3 Ver.: G7: 19,6 G8: 24,2 G9: 26,3 G10: 26,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Gauthier <i>et al.</i> , 1998	Edad: 4 mes.: 0,2 5 mes.: 1,9 8 mes.: 3,2 3 años: 2,4	ND	Edad: 4 mes.:0,1 5 mes.: 0,2 8 mes.: 0,3 3 años: 0,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dorado <i>et al.</i> , 2003.	Inv.: 4 Prim.: 4,3	Otoño: 3,1 Ver.: 3,1	Inv.: 1,2 Prim.: 1,2	Oto.: 1,3 Ver.: 1,1	ND	ND	ND	ND	Inv.: 80,9 Prim.: 84,9	Oto.: 79,4 Ver.: 81,6	ND	ND
Al-Ghalban <i>et al.</i> , 2004	Inv.: 4,2 Prim.: 6,3	Oto.: 1,4 Ver.: 2,7	Inv.: 1,1 Prim.: 0,8	Oto.: 1 Ver.: 1,1	Inv.: 30,3 Prim.: 32	Oto.: 31,5 Ver.: 31,7	Inv.: 80,6 Prim.: 77,9	Oto.: 67,4 Ver.: 75,9	Inv.: 61,7 Prim.: 79,4	Oto.: 51,1 Ver.: 70,3	ND	ND

Referencias: Espz.: Espermatozoides; Inc.: incremento; Desc.: Descenso; ND: No disponible; ey.: eyaculado; mes.: meses; Inv.: invierno; Oto.: Otoño; Prim.: Primavera; Ver.: Verano; MM: Motilidad Masal; MIP: motilidad individual progresiva; G1: 12 a 24 meses de edad; G2: 20 a 32 meses de edad; G3: 36 a 48 meses de edad; G4: 6 a 17 meses de edad; G5: 18 a 29 meses de edad; G6: 30 a 38 meses de edad; G7: 2 a 13 meses de edad; G8: 14 a 25 meses de edad; G9: 26 a 37 meses de edad; G10: 38 a 50 meses de edad.

- Características generales de la criopreservación de espermatozoides

La sobrevivencia de los espermatozoides en presencia de plasma seminal luego de la eyaculación se encuentra limitada sólo a una muy corta fracción de tiempo. Para favorecer su supervivencia por un período más prolongado, es necesario adicionarle sustancias (diluyentes) que le aseguren un medio adecuado. Este proceso se denomina dilución. Otra ventaja adicional de la dilución es que permite aumentar el volumen del eyaculado logrando reducir la concentración de espermatozoides por unidad de volumen lo que permite inseminar un mayor número de hembras que las que se podían inseminar con el volumen inicial.

- Diluyentes y crioprotectores

Es necesario distinguir entre el diluyente para la congelación y el crioprotector propiamente dicho, que normalmente es uno de los componentes del primero.

El diluyente para la congelación, de acuerdo a lo definido por Salisbury y Vandemark (1964), debe tener las siguientes características:

- Contener agentes crioprotectores que protejan las células espermáticas durante el congelamiento;
- Proteger la célula espermática del shock térmico;
- Poseer capacidad de "buffer" para amortiguar los posibles cambios de pH de producto del metabolismo,
- Suministrar una fuente energética para el metabolismo espermático;
- Proveer un adecuado balance mineral esencial para la vida de la célula;
- Poseer una presión osmótica isotónica con el espermatozoide y
- Proteger a los espermatozoides de los organismos bacterianos.

La mayoría de los diluyentes son ligeramente hiperosmóticos con respecto al plasma seminal, ya que de este modo se reduce la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelulares por provocar una salida parcial de agua anterior al enfriamiento (Fiser; Langford, 1981).

En cambio, los crioprotectores propiamente dichos se pueden dividir en penetrantes (glicerol, etilenglicol, DMSO, metanol, polietilenglicol, etc.) y no penetrantes (glucosa, sacarosa, galactosa, polivinilperrolidona, alcoholpolivinilico, etc.). Su función es contrarrestar el cambio de volumen que se va a producir durante la congelación. Así, la pérdida rápida de agua intracelular, provocada por la congelación del medio extracelular, permite la entrada lenta de crioprotector. Es el caso del glicerol. Todos los crioprotectores producen deshidratación celular por ósmosis, disminuyen el punto de congelación, alteran la bicapa lipídica incrementando su permeabilidad al agua y a los iones al aumentar el tamaño de los canales de agua, interaccionan con proteínas y glicoproteínas de membrana (Hammerstedt *et al.*, 1990). Para ejercer estos efectos los agentes no tienen por qué penetrar en la célula (Watson, 1995). No obstante, la ventaja de los penetrantes es la protección contra el daño derivado de la reducción excesiva de volumen.

Por lo tanto, para cumplir con estas características, los constituyentes más comúnmente utilizados en los diluyentes para criopreservación de espermatozoides son:

- Crioprotectores: penetrantes (glicerol, etilenglicol y dimetilsulfoxido)
- Protectores de membrana y aportantes de nutrientes (leche descremada y yema de huevo);
- Buffers: Tris o Tes;
- Azúcares: glucosa, lactosa, rafinosa, sacarosa o trealosa;
- Sales: citrato de sodio y ácido cítrico
- Antibióticos: penicilina, estreptomina, etc.

En cambio, los diluyentes para conservación “En Fresco o Refrigerado” de semen no requieren en su composición a los crioprotectores.

Por lo tanto, el uso de diluyentes seminales permite, según pequeñas modificaciones en la formulación de los mismos, variar el tiempo de conservación del semen. Por ello, si lo que se pretende es conservar:

- Semen en estado “Fresco”, ya sea “puro o diluido”, sólo por algunas horas (no mas de 2 hs) se deberá diluir el semen y

conservarlo a una temperatura próxima a los 30° C. Este leve descenso de la temperatura tiene por objetivo deprimir el metabolismo celular y de esta manera prolongar la vida media (Guillan *et al.*, 2004). En este proceso de conservación el diluyente puede o no contener crioprotector (glicerol) debido a que no se van a congelar las células y además que éste es tóxico para los espermatozoides a temperaturas mayores a los 30° C (Colas, 1975).

- Semen en estado “Fresco refrigerado”, ya sea “puro o diluido”, por más tiempo (12 a 24 horas), se realiza dilución con medios que no contengan crioprotectores o apenas un mínimo porcentaje de ellos. Además, un descenso paulatino de la temperatura de conservación, entre los 15° C y 5° C. Esta temperatura final de conservación, disminuye sustancialmente el metabolismo celular y la motilidad de los espermatozoides, prolongando de esta manera la vida media de los mismos por varias horas e inclusive días (Maxwell; Salamon, 1993; Lebouef *et al.*, 2000; Guillan *et al.*, 2004).
- Semen por largos períodos (meses o años), el proceso es la “Congelación” a una temperatura de – 196° C sumergido en nitrógeno líquido. En este caso el diluyente utilizado deberá contener todos los constituyentes descritos más arriba, además de un riguroso protocolo de trabajo que minimice los daños que provocan tanto la congelación como el descongelado (Lebouef *et al.*, 2000; Salamon; Maxwell, 2000;). Esta temperatura de conservación, detiene el metabolismo celular y con ello toda actividad de los espermatozoides, prolongando de esta manera la vida media de los mismos por años o indefinidamente (Maxwell; Salamon, 1993; Lebouef *et al.*, 2000; Guillan *et al.*, 2004).

2.5.- CONGELADO DE LOS ESPERMATOZOIDES.

El congelado es una técnica muy difundida que tiene como finalidad conservar material biológico a muy bajas temperaturas, en principio por tiempo indefinido. Este proceso conlleva la interrupción artificial del proceso de maduración y fertilización o muerte de los espermatozoides (Watson, 1995). Específicamente en el área de la reproducción y por su aplicabilidad, se ha constituido en un elemento clave en la evolución de los sistemas de mejoramiento genético animal ya que ha permitido la conservación de semen de machos genéticamente superiores por largos períodos, lo que sumado a planes de selección y mejora genética ha posibilitado el uso masivo de la inseminación artificial en el mundo.

En este complejo proceso de la criopreservación inciden múltiples factores que afectarán la conservación de las células y la recuperación posdescongelado de las cualidades que éstas poseían previo a la misma. Esta técnica tiene por objetivo preservar la vida celular a -196°C (Lebouef *et al.*, 2000; Guillan *et al.*, 2004), donde las células experimentan estrés producto de importantes cambios físicos en su pasaje del estado líquido al sólido (Holt, 2000). Los protocolos de criopreservación, por medio de la utilización de diluyentes y crioprotectores, buscan minimizar los daños producidos por la formación de cristales de hielo que se forman del agua libre dentro de la célula y a su vez, reducir el efecto de solución que se produce al exponer células no congeladas a altas concentraciones de solutos (Mazur *et al.*, 1970), para conservar intactas las cualidades que éstos presentaban antes de este proceso.

El hielo intracelular es cristal de agua pura que durante el proceso de congelado es inevitable que se forme. Ahora bien, si la velocidad de congelación es alta, el agua no abandona la célula y se congela formando grandes cristales que no provocan daño celular. En cambio, si la velocidad de congelación es baja se da lugar a la cristalización de agua de pequeño tamaño, extremadamente dañina para la célula (Holt, 2000).

Por otro lado, a medida que se congela el agua dentro de la célula también ocurre lo mismo con el agua que se encuentra fuera de ésta, este proceso lleva a la concentración de solutos extracelulares (sales, azúcares y proteínas), esta alta concentración externa supone un estrés osmótico para el espermatozoide (Mazur *et*

al., 1970), debido tanto a la pérdida de agua que sufre como al ingreso de algunos solutos (Mazur *et al.*, 1984). Estos procesos suponen deshidratación celular y con ello una disminución del volumen. Si esta disminución sobrepasa un límite crítico, la bicapa de fosfolípidos de la membrana se rompe y con ello, se altera la entrada y salida de componentes, el contenido celular se vierte al exterior y el hielo extracelular penetra hacia el interior del espermatozoide.

Algunos componentes de los diluyentes son indispensables para la protección del espermatozoide, actuando unos en forma directa sobre las membranas celulares durante el enfriado como la yema de huevo (Philips, 1939 citado por Gillan *et al.*, 2004), la leche entera (Michajinov, 1951 citado por Salisbury; VanDemark, 1964) y la leche descremada (Almquist *et al.*, 1954 citado por Salisbury; VanDemark, 1964 y Jones *et al.*, 1972). Otros actúan en forma indirecta y son sustancias que atraviesan rápidamente la membrana plasmática, se unen al agua intracelular, disminuyendo el tamaño y la cantidad de cristales de hielo (glicerol, Berstein; Petropavlosky 1937 citado por Gillan *et al.*, 2004).

En el caso de la yema de huevo, los fosfolípidos presentes en las lipoproteínas de baja densidad serían los responsables del efecto protector (Parks *et al.*, 1992). En el caso de la leche, la caseína sería responsable de brindar tal efecto (O'Shea *et al.*, 1966) cuando es adicionada al diluyente de semen para luego proceder a congelarlo.

Estos componentes han sido utilizados en la crioconservación de semen de la mayoría de las especies con efectos positivos. En el macho cabrío por el contrario, desde los primeros intentos de crioconservación, se observó que el uso de estos componentes en presencia de plasma seminal tenían más efectos negativos que los positivos esperados (Roy, 1957).

- Efecto del descenso térmico sobre las estructuras celulares.

El descubrimiento del glicerol como crioprotector (Polge; Smith; Parkes, 1949), sumado al hecho que fueran espermatozoides las primeras células en ser satisfactoriamente congeladas-descongeladas, resultó determinante en el desarrollo de la IA. La cripreservación de espermatozoides, como también el mantenimiento de

su capacidad fecundante, ha sido lograda de manera exitosa tanto en animales domésticos como en silvestres. Pero muy a pesar de estos logros, los espermatozoides experimentan daños durante el proceso de congelado y descongelado (Parks; Graham, 1992).

El mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides después del proceso de congelado–descongelado depende de la interacción de múltiples factores durante dicho proceso. Cada paso en el proceso de criopreservación produce un estrés celular que puede llegar a causar un daño parcial o total del espermatozoide (Hammerstedt *et al.*, 1990; Watson, 1995).

El proceso óptimo de criopreservación debe minimizar los efectos potencialmente perjudiciales en cada uno de los pasos del protocolo. La manipulación del semen, la centrifugación, el efecto osmótico de los crioprotectores y medios de congelación, las variaciones de la temperatura y los cambios de volumen celular durante el proceso de congelado–descongelado son algunos de los factores perjudiciales para la viabilidad espermática (Watson, 1995). Minimizando la acción de estos factores, los espermatozoides podrán conservar un metabolismo que producirá energía suficiente, poseerá motilidad progresiva lineal, el acrosoma se encontrará intacto y los daños a las proteínas de la membrana plasmática serán mínimos, características que le permitirán fecundar un ovocito.

En síntesis, el proceso de criopreservación provoca estrés celular, según la magnitud del descenso térmico al que son expuestos los espermatozoides. Este estrés se manifiesta de forma diferente a en los diferentes rangos de temperatura.

- Shock Térmico

Como ya se mencionara anteriormente, los espermatozoides sujetos a la criopreservación son muy sensibles a la reducción brusca de la temperatura. El rango de temperatura comprendido entre 25° C y 5° C (Watson, 1995), produce en el espermatozoide agresiones o alteraciones que se conocen con el nombre de “SHOCK TÉRMICO”. Es así que tiene mucha importancia la velocidad a la que ocurre el descenso térmico dentro de este rango de temperatura. El “SHOCK TÉRMICO” es la

principal fuente de producción de daños a las membranas biológicas, que se pueden resumir en:

- Pérdida de la permeabilidad selectiva y de la integridad de la membrana plasmática (Pellicier-Rubio *et al.*, 1997),
- Liberación de enzimas intracelulares (Mann *et al.*, 1955; Blackshaw *et al.*, 1957; Harrison *et al.*, 1972) y lípidos (Blackshaw *et al.*, 1957; Darin-Benet *et al.*, 1973),
- Redistribución de iones (Quinn *et al.*, 1966),
- Cambios en la membrana del acrosoma (Watson *et al.*, 1972; Jones *et al.*, 1973) y de las mitocondrias (Watson *et al.*, 1995),
- Pérdida de motilidad (Willet *et al.*, 1942; Nunes *et al.*, 1982) y
- Disminución de la actividad metabólica (Salisbury; VanDemark, 1945)

- Shock Osmótico

Luego de un periodo de estabilización a la temperatura de 4-5° C, se procede a descender aún más la temperatura, hasta -196° C. En esta etapa se observa un nuevo rango de temperatura crítica entre -5° C y -15° C en la que se produce el llamado "SHOCK OSMOTICO". Según la velocidad en que transcurre el descenso en este rango de temperatura, los daños sobre el espermatozoide serán más o menos importantes. Aquí juega un papel muy significativo no sólo el contenido de agua en el espermatozoide sino también los electrolitos presentes en la célula y en el ambiente circundante. Si el proceso de descenso de la temperatura es lo suficientemente rápido y la temperatura final lo suficientemente baja y este proceso ocurre en presencia de crioprotectores como los agentes antes mencionados, la congelación da lugar a cristales pequeños que no producen excesivo daño celular (Smith, 1954 citado por Salisbury; VanDemark, 1964).

Estas lesiones incluyen daños a escala estructural, ultraestructural, bioquímica y funcional cuyo resultado es una reducción en la motilidad y viabilidad de los espermatozoides que se traducen en una baja fertilidad cuando este semen es usado en IA (Salisbury; VanDemark, 1964).

- Diluyentes en la especie caprina

- Características de un diluyente seminal

Los diluyentes utilizados en la criopreservación de semen caprino, al igual que los utilizados en otra especie, debe poseer un pH adecuado, buena capacidad "buffer", adecuada osmolaridad y deben proteger al espermatozoide de la frío injuria. A continuación describiremos las características de tres de los diluyentes más utilizados para la congelación de semen caprino.

- Diluyentes en base a leche

La leche, entera o descremada, es muy utilizada en la constitución de diluyente para semen caprino. El primer reporte de utilización de la leche como diluyente de semen bovino fue realizado en 1856 por un investigador alemán (Kölliker, mencionado por Salisbury; VanDemark, 1964). Los componentes que serían responsables de su efecto protector se encuentran en su fracción proteica. Hay quienes postulan que la caseína sería responsable de brindar tal efecto (O'Shea *et al.*, 1966), mientras que para otros, la lactoalbúmina podría actuar como tampón frente a los cambios de pH (Watson, 1979) y como agente quelante de metales pesados (Jones, 1969).

Por otra parte, para su utilización, la leche debe previamente sufrir un proceso de tindalización, es decir calentarse a 92-95° C durante 10 minutos para inactivar una proteína de la leche (lactenina) que es tóxica para los espermatozoides (Flipse *et al.*, 1954), no siendo necesario este proceso cuando se emplea leche que ha sufrido el proceso de esterilización a ultra alta temperatura (UAT). Los medios que utilizan leche en su conformación son muy utilizados (Salamon; Maxwell, 1995), incluyendo frecuentemente leche descremada (Colas, 1975), ya que parece proporcionar mejores resultados de fertilidad (Maxwell; Salamon, 1993).

Como se comentara anteriormente, se ha identificado una enzima que se origina en las glándulas bulbouretrales que interactuando con la leche, produce un efecto

detrimental sobre los espermatozoides (Pellicier-Rubio *et al.*, 1997 y 1998), aspecto que se abordará particularmente más adelante.

- Diluyentes en base a yema de huevo

Fue a partir de los estudios de Philips (1939) de la Universidad de Wisconsin (USA) que se conocen las propiedades de la yema de huevo y comienza a utilizarse como constituyente de los diluyentes de semen en variadas especies (mencionado por Salisbury; VanDemark, 1964). La yema de huevo es el principal y más efectivo protector de la membrana plasmática de los espermatozoides contra el shock térmico o por frío. Debido a esta propiedad, se ha convertido en uno de los principales constituyentes de los diluyentes para criopreservación del semen, aunque su efecto protector no es igualmente efectivo en todas las especies (Watson, 1995). Serían responsables de esta actividad los fosfolípidos de baja-densidad de la fracción lipoproteica (low density fraction, LDF) que se encuentra en la yema de huevo (Parks *et al.*, 1952; Quinn *et al.*, 1980; Watson, 1981 b).

Su actividad protectora es fundamental en la membrana del espermatozoide durante el shock térmico, pero también confiere protección durante el congelado-descongelado (Salamon; Maxwell, 2000). El mecanismo de protección de la yema de huevo sobre las membranas plasmáticas permanece por ahora desconocido (Watson, 1981 b; Aboagla; Terada, 2004), existiendo varias hipótesis para explicar este mecanismo. Por un lado se postula que su acción se debe a que induce una mayor resistencia de la membrana (Kamschmidt; Mayer; Herman, 1953), por otro lado, están quienes postulan que su actividad se basa en la adhesión superficial a la membrana, evitando así la pérdida de lípidos constituyentes de la misma (Quinn *et al.*, 1980; Watson, 1981 b). Incluso, están quienes postulan que constituyentes de la yema de huevo reemplazarían a los fosfolípidos de la membrana que se pierden durante el proceso de congelado (Graham; Foote, 1987).

También, como en el caso de la leche, se ha descrito una enzima que forma parte del plasma seminal y que interactuando con la yema de huevo presenta efecto detrimental sobre los espermatozoides.

- Diluyentes en base a Lecitina de soja

Entre las dificultades que acarrea utilizar componentes de origen animal en la formulación de los diluyentes de semen se encuentran: las variaciones en su composición y los riesgos en la bioseguridad, debido a la contaminación con agentes patógenos (bacterias, micoplasmas y virus) (Bousseau *et al.*, 1998; Müller-Schlösser, 2005). Esto posibilitaría la transmisión de enfermedades transportadas en los componentes lácteos o en la yema de huevo que conforman el diluyente seminal.

Debido a estos riesgos y atendiendo a las crecientes demandas respecto de cumplir con normas de bioseguridad que algunos países le imponen a productos y subproductos de origen animal como son los medios de dilución de semen, es que desde hace algunos años existen en el mercado diluyentes comerciales, que carecen de proteínas de origen animal en su formulación (Biochiphos, Bioxcell y Bioxcell CSS de IMV o AndroMed de Minitüb). Éstos presentan algunas ventajas frente a los elaborados artesanalmente o comercialmente con proteína de origen animal, como por ejemplo: partidas controladas y estandarizadas, bacteriológicamente más seguros (evita la transmisión de enfermedades animales), libre de drogas medicamentosas (hormonas, antibióticos, antimicóticos, antiparasitarios, promotores del crecimiento, etc.). Estos diluyentes permiten además una mejor observación al microscopio óptico, son de uso simple, se pueden conservar congelados por mucho tiempo, etc.

Estos diluyentes han demostrado muy buen comportamiento en la especie bovina y se han comenzado a probar en otras especies como cérvidos (Ciervo rojo y Gamo, Zomborszky *et al.*, 2005), equinos (Aurich *et al.*, 2007), ovinos (Gil *et al.*, 2003 a y b), caninos (Nöthling *et al.*, 2007) y caprinos (Jannett *et al.*, 2005, Paulenz *et al.*, 2005 y Bittencourt *et al.*, 2006). Particularmente en semen de caprino, el éxito de su aplicación tendría un doble beneficio: eliminar el uso de proteínas de origen animal y posiblemente evitar los problemas de la interacción del plasma seminal con los componentes de la yema de huevo o la leche.

- Refrigeración y equilibramiento del semen previo al congelado

La refrigeración del semen diluido incluye un proceso de adaptación del espermatozoide a la sobrevivencia con un metabolismo reducido (Salamon; Maxwell, 2000). El enfriamiento que sufre el semen de los 37° a los 5° C provoca un tipo de alteración específica relacionada con transiciones de fase de lípidos de la membrana plasmática, alteración que es muy diferente a la que ocurre durante el congelado y el descongelado, la cual incluye cambios mecánicos y osmóticos (Ollero *et al.*, 1998).

La refrigeración produce un menor número de espermatozoides muertos respecto al producido por el congelado-descongelado. Con este semen refrigerado utilizado en la IA por vía cervical, se obtienen tasas de fertilidad aceptables, siempre que el semen refrigerado sea utilizado dentro de las 24 h de enfriado, contados desde el momento de la eyaculación. El enfriamiento muy rápido del semen de ungulados entre los 30° y 0° C, produce estrés en la célula, pudiendo ser letal para ella. El grado de estrés producido está directa y proporcionalmente relacionado a la tasa de enfriamiento y al rango de temperatura (Watson, 1981 b). Este fenómeno, conocido como shock térmico afecta de forma diferente a espermatozoides de distintas especies, por lo tanto es necesario establecer un cuidadoso manejo del enfriamiento previo a la congelación.

El equilibramiento es considerado como el tiempo que un espermatozoide debe permanecer en contacto con el glicerol previo a la congelación y durante el cual éste penetra en la célula para establecer una concentración intra y extracelular balanceada (Salamon; Maxwell, 2000), posibilitando que ejerza su acción de forma apropiada. Generalmente, para el cumplimiento del fenómeno descrito anteriormente, el semen diluido y enfriado a 5° C es mantenido a esa temperatura durante un período de 2 h, luego de la adición del glicerol.

- Curva de descenso de la temperatura.

Una velocidad muy lenta de congelación produce formación de cristales de hielo (dentro y fuera del espermatozoide), concentración de sales, alteraciones de la osmolaridad y del pH, con graves consecuencias para la célula. Cuando el proceso se hace de manera muy rápida, esta congelación celular no da tiempo a que el agua

salga del interior de la célula, con consecuencias letales para el espermatozoide (Mazur, 1965 citado por Watson, 1995). Por lo tanto esta curva de descenso es el producto de una solución de compromiso entre lo suficientemente rápida como para prevenir los efectos negativos de las altas concentraciones de sales extracelulares que se producen en el momento de la congelación, y lo suficientemente lenta, como para prevenir la formación de cristales de hielo intracelulares que pueden destruir la célula (Foote, 1984).

La velocidad ideal durante la congelación depende de varios factores como del tipo de diluyente, del tipo de envase, del método de congelación, de la temperatura mínima alcanzada por el semen en el proceso de congelación, etc. En el ovino, la velocidad óptima de congelación guarda una estrecha relación con la concentración de glicerol utilizada obteniéndose la mejor conservación de semen con una concentración de glicerol del 4 ó 6 % (Colas, 1975). En el caprino, el rango de concentración de glicerol utilizado oscila entre 6 y 16 % (Fraser, 1962; Sahni; Roy, 1972; Rassouw, 1974 y Waide *et al.*, 1977 todos mencionados por Deka; Rao, 1986).

Considerando la temperatura mínima al final del proceso de congelación, Holt y North (1994) vieron que entre -10 a -15° C, no existe un efecto significativo de la velocidad de congelación (15° C/minuto) sobre la calidad de semen de carnero, en cambio a temperaturas inferiores a -15° C, encontraron importantes pérdidas de la integridad de la membrana citoplasmática.

- Reacción entre constituyentes del plasma seminal caprino y constituyente de los diluyentes.

Entre las numerosas sustancias que componen el plasma seminal de la especie animal en estudio, se ha observado que algunos componentes provenientes de las glándulas bulbouretrales interaccionan con constituyentes de los medios de preservación, particularmente con la yema de huevo (Roy, 1957) o de la leche descremada (Pellicier-Rubio *et al.*, 1997 y 1998; Sias *et al.*, 2005) provocando lesiones en los espermatozoides que conspiran contra su supervivencia y la fertilidad final del semen así conservado.

En 1957, Roy trabajando con semen de caprinos describió una enzima que producía coagulación de la yema de huevo lo cual provocaba que el semen conservado con diluyente constituido con yema de huevo tuviera una viabilidad disminuida. Este investigador determinó que esta enzima era una Fosfolipasa A que en presencia de fosfolípidos tales como la lecitina, cataliza la reacción produciendo lisolecitinas y ácidos grasos, encargados de provocar disminución del pH y coagulación de la yema de huevo.

Además esta interacción se manifiesta por una disminución de la motilidad y viabilidad del semen criopreservado hecho que, por consiguiente, afecta negativamente la fertilidad final del semen así conservado (Nunes *et al.*, 1982). También se observa descondensación de la cromatina en los espermatozoides, debido a la acción de esta enzima (Sawyer; Brown, 1995).

La presencia en las células de lisolecitinas es muy importante ya que juegan un importante rol en la fusión celular de numerosos tipos celulares (Poole *et al.*, 1970). Así en el espermatozoide, es la encargada de provocar la fusión de las membranas plasmáticas del capuchón acrosómico produciendo la reacción acrosómica (Upreti *et al.*, 1999).

Respecto del agregado de leche descremada en el diluyente, también existe una enzima originada en las glándulas bulbouretrales que produce efecto detrimental sobre los espermatozoides. Se trata, como en el caso anterior, de una lipasa que fue llamada lipasa glicoproteica secretada por la glándula bulbouretral del caprino (Fracción glicoproteica del plasma seminal -BUSgp60-), la cual posee un peso molecular de 55-60 kDa (Pellicier-Rubio *et al.*, 1997). El mecanismo de acción de esta lipasa está estrechamente relacionado con la presencia de triglicéridos en la leche descremada y en las membranas plasmáticas del espermatozoide. Por medio de su acción se produce un ácido graso insaturado (ácido oleico) responsable de la acción tóxica sobre el espermatozoide (Pellicier-Rubio *et al.*, 1997 y 1998). Como consecuencia de su actividad se produce deterioro en la motilidad, en la integridad del acrosoma y disminución de la sobrevivencia "*in vitro*" de los espermatozoides (Nunes *et al.*, 1982).

Pellicier-Rubio *et al.* (1997; 1998), concluyeron primeramente que la fracción glicoproteica del plasma seminal (BUSgp60) es una lipasa similar a las pancreáticas debido a su gran similitud con éstas en su peso molecular, su naturaleza glicoproteica y su afinidad por la heparina. Además, en su investigación realizaron la secuenciación de sólo 37 aminoácidos que constituyen esta enzima, estudio que arrojó como resultado una gran homología (64% de identidad) con las lipasas pancreáticas relacionadas a proteína 2 (PLRP2) de diferentes especies (Pellicier-Rubio *et al.*, 1997).

Recientemente, se logró purificar, secuenciar y sintetizar la lipasa presente en el plasma seminal caprino, la fracción glicoproteica del plasma seminal (BUSgp60; Sias *et al.*, 2005). La secuenciación del ADNc permitió determinar que se trata de una lipasa pancreática, perteneciente a la subfamilia de las lipasas pancreáticas relacionadas a proteína 2 (Sias *et al.*, 2005). Por tal motivo, estos autores proponen un nuevo nombre para esta enzima, el mismo es: “lipasa pancreática relacionada a proteína 2 del caprino (GoPLRP2)” en vez de “fracción glicoproteica del plasma seminal (BUSgp60)”. También mostraron que esta enzima, según el sustrato con el que cuente, posee actividad tanto de lipasa como de fosfolipasa, por lo que estos autores hipotetizan que probablemente la enzima GoPLRP2 podría ser idéntica a la “enzima coagulante de la yema de huevo (EYCE)” descrita por Roy (1957). Esta misma idea fue anteriormente propuesta por Leboeuf (2000), luego del análisis de la información disponible de ambas enzimas.

- Procesamiento del semen previo a la congelación de espermatozoides caprinos -
Lavado seminal.

Desde un punto de vista práctico, muchos intentos se hicieron para corregir este comportamiento negativo del plasma seminal en contacto con la leche o la yema del huevo. Algunos de ellos fueron la eliminación de las glándulas bulbouretrales (Esteva-Hernandez, 1976), el “lavado” del semen previo a su dilución para la crioconservación (Corteel, 1974, 1975 y 1980; Ritar *et al.*, 1982; Memon *et al.*, 1985) o la utilización de semen de estaciones del año que no contenga gran proporción de las enzimas responsables de la reacción, ya que ha sido demostrado que las mismas tienen variaciones estacionales (Sias *et al.*, 2005).

El "lavado" del eyaculado incrementa el porcentaje de espermatozoides móviles no sólo antes sino después del congelado (Corteel, 1974) y mantiene la integridad del acrosoma (Memon *et al.*, 1985), mejorando la capacidad de los espermatozoides de resistir el congelado-descongelado. Por lo tanto, esta última metodología es utilizada corrientemente en la actualidad en los protocolos de congelación de semen caprino, ya que brinda la posibilidad de conservar características deseables en el semen posdescongelado. Sin embargo, esta manipulación resulta relativamente engorrosa para el procesamiento rutinario del semen previo a su congelación, además de provocar, por si misma, daños al espermatozoide (Graham, 1994; Padilla; Foote, 1991). Por otra parte, algunos autores consideran que este procesamiento previo no es necesario para mejorar la calidad del semen congelado-descongelado (Azaêredo *et al.*, 2001).

-Descongelado del semen criopreservado

La temperatura a la que se realiza el descongelado del material seminal criopreservado como así también el tiempo que se puede mantener el material a descongelar a esta temperatura varía según la forma de presentación (pajuela, pastilla) en que el semen ha sido congelado (Salamon; Maxwell, 1995). No existe uniformidad de criterios en la bibliografía respecto de este tema aunque ha sido demostrado que el descongelado a altas temperaturas y por pocos segundos muestra mejores resultados que el descongelado a menor temperatura y por más tiempo (75° vs. 37° C: Salamon; Maxwell, 1995; 70° durante 7" vs 37° por 2' o 40° C por 20": Lebouef *et al.*, 2000). Sin embargo, esta modalidad pese a sus ventajas, no ha sido muy adoptada. Quizás la razón que justifica la falta de adopción de esta práctica, es que resulta más conveniente descongelar semen alrededor de los 37° C a fin de evitar la exposición celular a temperaturas que podrían ser fatales para las mismas (Lebouef *et al.*, 2000).

El número de espermatozoides que luego del proceso de congelado-descongelado se encuentra en perfecto estado es mínimo y esto es el resultado de la interacción de múltiples factores (dilución, refrigeración, glicerización, congelado y descongelado). Cuando estos factores se asocian negativamente, el resultado final es: muerte de espermatozoides, pérdida de motilidad y vitalidad, presencia de acrosomas dañados,

alteración de la permeabilidad de la membrana y aumento de la presencia de malformaciones espermáticas, todo lo cual afecta negativamente la fertilidad final del semen criopreservado (Chauhan; Anand, 1994; Holt; North, 1994). Además de esto, un número importante de espermatozoides que resisten este proceso son incapaces de llegar al sitio de fertilización, debido a que producto del congelado-descongelado un gran número de ellos presenta reacción acrosómica prematura (Watson, 1995). Esto se traduce en una disminución rápida de la cantidad de espermatozoides vivos después del descongelado (Saling, 1989; Yanagimachi, 1994).

2.6.- EVALUACIÓN “IN VITRO” DE LA CALIDAD SEMINAL O ESPERMÁTICA POSDESCONGELADO

El análisis del semen tiene por objeto la valoración de la calidad del eyaculado y a través de éste, relacionarlo con la calidad como reproductor del macho que proveyó la muestra. Si bien sólo la valoración “*in vivo*” (fecundación y nacimiento de un individuo) sería el método definitivo de valorarla, el costo y tiempo que implica esta forma óptima de valoración seminal, la hace poco práctica. La alternativa ha sido su reemplazo por pruebas de valoración “*in vitro*” que tuvieran relación con la anterior. Estas pruebas de valoración “*in vitro*” son utilizadas de rutina en todos los laboratorios de reproducción del mundo.

Existen variadas pruebas para establecer la calidad seminal, siendo necesaria la utilización de varias de ellas para valorar la viabilidad y capacidad fertilizante (Hafez, 1989; Evans; Maxwell, 1990) de una célula tan especializada y con una actividad biológica tan compleja como es el espermatozoide.

Estas pruebas para la valoración “*in vitro*” de la calidad seminal, tienen múltiples aplicaciones como ser: evaluar como el proceso de congelado-descongelado afectó a los espermatozoides o como la variación de la composición de diferentes diluyentes o diferentes procedimientos que el semen recibe previo a la dilución afectan a los espermatozoides conservados en fresco diluidos, refrigerados o congelados-descongelados. También su uso ha acompañado a la gran difusión que ha tenido la IA, ya que varias de estas pruebas son utilizadas de rutina para contrastar eyaculados provenientes de diferentes individuos que poseen diferentes fertilidades, etc.

A pesar de uso extensivo, numerosos autores cuestionan la correspondencia entre las evaluaciones seminales “*in vitro*” y la fertilidad “*in vivo*” que este mismo semen demuestra (Hammerstedt, 1993; Berger *et al.*, 1994; Rodríguez-Martines, 2003; Amann; Rodríguez-Martinez; Barth, 2007). Sin embargo esto no invalida su utilización ya que existe consenso que no hay por el momento una prueba “*in vitro*” que por si sola reemplace a la valoración “*in vivo*”.

- Motilidad Individual Progresiva

Ésta se determina a través de la valoración de una muestra de cada eyaculado. Requiere de portaobjetos, cubreobjetos y solución fisiológica o diluyente atemperado a 37° C. Se coloca una gota de semen y otra de solución fisiológica o diluyente, se mezclan y se coloca el cubre objetos para su lectura en microscopio óptico sobre platina térmica. En ella se calcula el porcentaje de los espermatozoides móviles que presenta movimiento progresivo rectilíneo, según los siguientes parámetros:

- a.- Espermatozoides inmóviles,
- b.- Con movimiento rotatorio: Movimientos sobre si mismo con un radio reducido y cierta velocidad,
- c.- Con movimiento ondulatorio: movimiento lento, con pequeño desplazamiento originado por golpes lentos y laterales de la cola en toda su extensión,
- d.- Con movimiento progresivo rectilíneo: espermatozoides con desplazamiento energético, activo y rectilíneo en sentido de avance o con motilidad individual progresiva.

Es generalmente la primera evaluación que se realiza al semen a utilizar en IA, brinda un panorama general del resultado de la manipulación realizada al semen. La motilidad individual progresiva es la responsable de permitir a los espermatozoides recorrer la distancia que los separa del ovocito (Scott, 2000), y sobre todo, junto a otros factores, posibilita el acceso al ovocito a través de las capas que lo cubren haciendo posible de esta manera que ocurra la fecundación.

La valoración de la motilidad individual progresiva es una prueba que a distintos autores les permitió comparar y encontrar diferencias entre diluyentes en caprinos (Corteel *et al.*, 1974, 1975 y 1980; Ritar *et al.*, 1982 y 1991; Memon *et al.*, 1985; Cabrera *et al.*, 2005; Paulenz *et al.*, 2005; Jannet *et al.*, 2005; Bittencourt *et al.*, 2006;), Ovinos (Gil *et al.*, 2003 a y b), bovinos (Hinsch, *et al.*, 1997; Gil *et al.*, 2000; Thun *et al.*, 2002; Aires *et al.*, 2003), equinos (Aurich *et al.*, 2007) y caninos (Nöthling *et al.*, 2007).

En el caprino, la misma permitió poner en evidencia el efecto de la presencia o ausencia de plasma seminal en el semen evaluado luego de descongelado (Corteel *et al.*, 1974, 1975 y 1980; Ritar *et al.*, 1982; Memon *et al.*, 1985), como así también la respuesta a las diferentes concentraciones de yema de huevo que contenía el diluyente utilizado para congelar semen (Ritar *et al.*, 1982; Cabrera *et al.*, 2005) o a las temperaturas a las que fuera refrigerado el semen caprino (Paulenz *et al.*, 2005).

- Vigor

En forma simultánea a la valoración de motilidad individual progresiva, se puede realizar la valoración del vigor, es decir subjetivamente se estima la intensidad o vigor que demuestran los espermatozoides al realizar los movimientos de desplazamiento. Para ello se utiliza una escala subjetiva de espermatozoide inmóvil a espermatozoide con motilidad vigorosa.

En la evaluación de un semen previo a su uso, el vigor de los espermatozoides proporciona una idea de la “fuerza o vitalidad” con que los espermatozoides móviles realizan su desplazamiento dentro del campo óptico donde se lleva a cabo la valoración. Posee importancia en el proceso de transporte espermático y la fertilización.

Esta valoración fue utilizada previamente para diferenciar el comportamiento entre distintos tratamientos (Corteel, J. M., 1975; Ritar, 1993; Ritar; Salamon, 1991; Ferrari *et al.*, 1998), incluyendo el lavado previo de los eyaculados antes de proceder a su dilución y congelado (Corteel, 1974, 1975 y 1980; Ritar *et al.*, 1982; Memon *et al.*, 1985).

- Funcionalidad de la Membrana Plasmática (HOS test o test hipoosmótico)

A través de esta valoración se busca establecer la funcionalidad de la membrana plasmática que cumple un rol fundamental durante el proceso de la fecundación, pero también es importante en otros procesos previos que lleva a cabo el espermatozoide, como son su capacitación, la reacción acrosómica y la adhesión del espermatozoide a la superficie del ovocito (Jeyendran *et al.*, 1984; García Artiga, 1994), todos ellos necesarios y fundamentales para que ocurra una correcta fertilización. Uno de los objetivos de la adición de distintas proporciones de yema de huevo o de lecitina de soja a los medios de dilución espermática, es precisamente brindar protección a las membranas celulares durante el shock térmico que tiene lugar durante el transcurso del congelado-descongelado (Salisbury; VanDemark 1964; Holt; North, 1994).

Algunos autores utilizaron esta prueba para encontrar diferencias entre lavar o no el semen previo a la dilución y al congelado con la finalidad de evitar la interacción entre éste y la yema de huevo (Corteel, 1974, 1975, y 1980; Ritar; Salamon, 1982; Memon *et al.*, 1985; Bittencourt *et al.*, 2005; Salvador *et al.*, 2006). También para comparar diferentes diluyentes en la congelación (Bittencourt *et al.*, 2005) o en el refrigerado (Salvador *et al.*, 2006) de semen caprino. También es utilizado en otras especies animales, como el bovino, para comparar diluyentes que contienen yema de huevo o lecitina de soja en su formulación (Gil *et al.*, 2000; Thun; Hurtado; Janett., 2002).

- Espermatozoide Vivos

La evaluación se realiza luego del descongelado y brinda una idea de la cantidad de espermatozoides que resistieron el proceso de congelado-descongelado, sobreviviendo al mismo. Se utilizan para este fin coloraciones vitales, es decir procesos de coloración que son realizadas cuando la muestra no está fijada, es decir cuando los espermatozoides se encuentran vivos. El resultado se puede presentar como porcentaje de espermatozoides vivos.

Cuando el espermatozoide se encuentra vivo y la membrana plasmática íntegra, el colorante no ingresa al citoplasma del espermatozoide, situación que evidencia integridad de la membrana plasmática y vitalidad, por lo tanto estos espermatozoides

se consideran vivos. En cambio, los que se colorean son espermatozoides considerados muertos.

Existen varias coloraciones vitales para semen. Algunas de las más utilizadas son la coloración de eosina-nigrosina (Brito *et al.*, 2003; Domínguez *et al.*, 2008) o de tripan blue (Hinsch *et al.*, 1997; Brito *et al.*, 2003), siendo los resultados obtenidos entre ambas comparables (Brito *et al.*, 2003). Las mismas han sido utilizadas para evaluar el comportamiento de diferentes diluyentes (Hinsch *et al.*, 1997; Brito *et al.*, 2003; Domínguez *et al.*, 2008).

- Anomalías Espermáticas

La evaluación de la presencia de espermatozoides que presentan anomalías espermáticas luego del descongelado brinda una idea de la cantidad de espermatozoides que resistieron el proceso de congelado-descongelado sin que éste les ocasionara alteraciones en su conformación. Se utilizan para esta prueba, la coloración vital preparada para la valoración de espermatozoides vivos y el resultado de la evaluación se puede expresar en porcentaje de espermatozoides que presentan anomalías.

En estudios realizados con semen bovino, la presencia de anomalías espermáticas en el extendido de semen ha mostrado estar relacionada con bajas tasas de concepción y altas tasas de retorno al celo (Phillips *et al.*, 2004). La correlación entre espermatozoides normales y fertilidad posterior a una IA varía ampliamente (desde $r=0,06$ a $0,86$ Graham *et al.*, 1980, mencionado por Rodríguez-Martínez 2003), pudiendo deberse esta variación a la calidad del semen utilizado (Kuster *et al.*, 2004) al tipo de anomalías observadas (Barth, 1989; Barth *et al.*, 1992; Ostermeier *et al.*, 2001) o a la metodología utilizada para realizar esta determinación (Kuster; Singer; Althous, 2004). En bovinos, se recomienda que para obtener óptimos valores de fertilidad luego de una inseminación artificial el semen congelado tenga niveles superiores al 70% de espermatozoides normales al descongelado, (Barth; Oko, 1989).

Respecto a esta determinación, la bibliografía consultada no brinda información del comportamiento de ésta en caprinos, por lo tanto la información presentada más arriba puede ser tomada como orientativa en esta especie animal.

- Integridad del Acrosoma

La integridad del acrosoma es fundamental para que el espermatozoide pueda atravesar las barreras físicas que lo separan del ovocito y producir la fecundación (Flesch; Gadella, 2000). Por lo tanto es muy importante que los medios de dilución protejan adecuadamente esta estructura durante el proceso de congelado-descongelado. Para realizar el presente estudio, normalmente se utilizan los extendidos de coloración vital de eosina-nigrosina.

Varios autores observaron diferencias respecto de la cantidad de espermatozoides con acrosoma íntegro entre tratamientos evaluados posdescongelado (Memon *et al.*, 1985; Cabrera *et al.*, 2005), en semen refrigerado a diferentes temperaturas (Paulenz *et al.*, 2005) o entre aquellos que recibieron lavado del plasma seminal previo a la dilución y los que no (Memon *et al.*, 1985; Cabrera *et al.*, 2005). Por su parte en bovinos, Aires *et al.* (2003) utilizando una técnica de coloración mas compleja (FITC-PSA) comparando medios de dilución conteniendo lecitina vegetal versus otro con yema de huevo, no observaron diferencias entre la calidad de los patrones de coloración entre ambos.

- Prueba de Termorresistencia

Esta prueba fue diseñada para equiparar las condiciones de resistencia que deben tener los espermatozoides en el tracto reproductor femenino, por lo tanto los espermatozoides son colocados en medios de dilución o descongelado y mantenidos a temperatura de 37° C durante lapsos variables de tiempo. Durante el transcurso de tiempo establecido se toman muestras a tiempo fijo y en ellas generalmente se evalúa su motilidad y otros rasgos de vitalidad.

Cuando los espermatozoides son descongelados y puestos en cultivo durante un determinado período, ocurren cambios en el medio de cultivo, ya que espermatozoides vivos y muertos comparten el mismo ambiente de incubación, generando un ambiente nocivo para los primeros. Los espermatozoides muertos liberan sustancias con efecto claramente tóxico para los espermatozoides vivos (Shannon; Curson, 1971) conocidas como especies oxígeno reactivas o ROS. Entre ellas encontramos superóxidos, radicales oxidrilo y peróxido de hidrógeno (Del-Maestro, 1980) cuya presencia ha sido estudiada en bovinos (Shannon; Curson, 1982) y ovinos (Upreti; Jensen; Oliver, 1997).

Debido a la estabilidad imperante en el medio de cultivo tanto espermatozoides vivos como muertos y en proceso de degeneración, sedimentan en el fondo del tubo, región que presenta la más alta concentración de estos productos tóxicos, que disminuyen el pH del medio (Salvador *et al.*, 2006) y provocan peroxidación de lípidos (Foote *et al.*, 2002; Salvador; Yáñez; Viudes-de-Castro, 2006).

Esta son algunas de las razones por las cuales este tipo de valoración se encuentra cuestionada ya que el ambiente del aparato reproductor femenino es absolutamente diferente, debido, entre otras cosas, a los movimientos ciliares y a la reabsorción que realiza el epitelio celular. Por ello se observa allí un ambiente muy diferente al que enfrentan los espermatozoides durante esta valoración en un tubo de ensayo. Muy a pesar de estos argumentos, en bovinos el comportamiento demostrado por el semen en esta prueba fue asociada con la fertilidad posterior a una IA (Foote *et al.*, 2002).

Este procedimiento es utilizado en la evaluación de semen de distintas especies entre ellas el caprino, reportado con frecuencia en la diferenciación de distintos tratamientos que el semen recibe para la congelación (Corteel, 1975; Ritar; Salamon, 1991; Ritar, 1993; Hinsch *et al.*, 1997; Ferrari *et al.*, 1998; Gil *et al.*, 2000; Aires *et al.*, 2003). También es utilizada para demostrar diferencias entre la presencia o ausencia de plasma seminal en el semen caprino evaluado luego de descongelado (Corteel *et al.*, 1974, 1975 y 1980; Ritar *et al.*, 1982; Memon *et al.*, 1985) y en la determinación de la proporción de yema de huevo necesaria para proteger los espermatozoides caprinos sin necesidad de lavar el eyaculado previamente (Ritar *et al.*, 1982; Cabrera *et al.*, 2005).

- Comparación de razas

La bibliografía consultada no reporta comparaciones de razas realizadas en forma simultánea. Sin embargo, si se hace el esfuerzo de establecer una analogía entre los mismos, es posible observar comportamientos marcadamente diferentes entre razas para un mismo tipo de manipulación que recibe el semen (ej: lavado o no lavado de los espermatozoides), lo que llevaría a suponer que existen razas donde esta manipulación no es necesaria (Raza Canaria: Cabrera *et al.*, 2005; raza Jamunapari: Chauhan *et al.*, 1990; Raza Boer: Tuli *et al.*, 1994; Raza Saanen: Azerêdo *et al.*, 2001). Por el contrario, hay razas donde esta manipulación previa a la dilución y congelado se hace por demás necesaria (No especifican Raza: Corteel, 1975; Raza Angora: Ritar; Salamon, 1982 y 1991; Raza Verata: Pintado *et al.*, 1991; Raza Saanen: La Falci *et al.*, 2002, Raza Florida: Dorado *et al.*, 2007). Esto posibilitaría el uso o no del lavado del semen según la raza con la que estemos trabajando. Es conveniente aclarar al respecto que muchos de estos trabajos no son comparables en cuanto a poder decir que las respuestas observadas se deban directamente a un efecto racial. En la mayoría de los casos no es posible establecer el estado fisiológico de los machos en estudio, a que latitud fueron realizados los estudios, no se aclaran aspectos como ser las condiciones de alimentación que los machos recibieron previo y durante el ensayo, etc.

- Conservación en Nitrógeno Líquido. Efecto del Tiempo de Almacenamiento.

La conservación de material biológico en nitrógeno líquido es una técnica muy difundida, que tiene como finalidad conservar material biológico a muy bajas temperaturas por tiempo indefinido. Esto lleva en los espermatozoides a la interrupción artificial de los procesos de capacitación, reacción acrosómica y muerte de los mismos (Watson, 1995).

Numerosos trabajos de la bibliografía mencionan un hecho que produce sorpresa respecto de la conservación de semen caprino en nitrógeno líquido, ya que éstos reportan una pérdida paulatina de las características que este semen presentó entre el momento del congelado y los 6 meses posteriores durante el almacenamiento en nitrógeno líquido (Corteel, 1975; Ritar; Salamon, 1991; Ritar, 1993; Ferrari; Leinz;

Bernabe, 1998; Lebouef; Restall; Salamon, 2000). La característica más reportada es la pérdida de la motilidad individual progresiva (Corteel, 1975; Ritar; Salamon, 1991; Ritar, 1993; Ferrari *et al.*, 1998). Esta particular manifestación también ha sido observada en muestras congeladas con o sin plasma seminal (Ritar; Salamon, 1991).

- Agregado de plasma seminal posdescongelado en la supervivencia espermática.

En la incesante búsqueda por mejorar la protección brindada a los espermatozoides expuestos a la criopreservación, diferentes procedimientos o biotecnologías han sido evaluados en pequeños rumiantes. Entre ellos se han evaluado diferentes medios o incluso la incorporación de diferentes componentes en estos. Es así, que se probó la incorporación de plasma seminal o algunos de sus componentes, a los medios tanto de dilución como de incubación utilizados para contener espermatozoides recién eyaculados o para los que van a ser congelados o refrigerados.

Dentro de las especies de interés zootécnico, varios trabajos informan del efecto beneficioso en la recuperación de los espermatozoides luego de resuspender el semen en plasma seminal, una vez que éste ha sido descongelado. Esto fue observado en ovinos (Maxwell *et al.*, 1999, Barrios *et al.*, 2000; Dominguez *et al.*, 2007 y 2008), porcinos (Guthrie *et al.*, 2000), búfalos (Amin *et al.*, 2000), entre otras especies. Los efectos observados luego de la resuspensión de espermatozoides congelados-descongelados en plasma seminal en ovinos incluyen: mejora de la sobrevivencia (Barrios *et al.* 2000), de la motilidad y la integridad de la membrana del acrosoma (patrón F del CTC) (Maxwell *et al.*, 1999 a; Dominguez *et al.*, 2007 y 2008), disminución de espermatozoides con reacción acrosómica y aumento de la capacidad de atravesar "*in vitro*" el mucus cervical (Maxwell *et al.*, 1999 a). Además, esta recuperación se tradujo en un aumento de la preñez lograda por IA cervical tanto con semen fresco como con semen congelado-descongelado (Maxwell *et al.*, 1999 b).

Entre los mecanismos que posiblemente expliquen estos efectos, Barrios *et al.* (2000) exponen que se deberían a la adsorción de proteínas del plasma seminal a la membrana plasmática de los espermatozoides. Esta adsorción sería capaz de reparar en cierta manera el daño causado por el shock frío, restaurando la permeabilidad característica de la membrana plasmática de un espermatozoide sano y de esta

manera, revirtiendo parcialmente el estado de capacitado al estado de no capacitado. Sin embargo, resulta imperiosa la búsqueda de un mecanismo preciso que explique el conjunto de transformaciones que revierten los cambios tipo-capacitación que ocurren en los espermatozoides criopreservados luego del descongelado, ya que ayudaría a comprender los cambios producidos y los mecanismos implicados durante la ocurrencia de estos procesos.

En el ovino, se han llevado adelante estudios con la finalidad de identificar las distintas fracciones proteicas que conformarían el plasma seminal, con el objetivo de identificar e individualizar la fracción que sería responsable de la acción beneficiosa en la recuperación de los espermatozoides. Las fracciones que comprobaron poseer capacidad de proteger a los espermatozoides fueron las proteínas individualizadas por electroforesis en la fracción 6, con un peso molecular de aproximadamente 20 kDa (Barrios *et al.*, 2000) y 14 kDa (Barrios *et al.*, 2003).

Sin embargo, a pesar de los efectos beneficiosos obtenidos en algunas especies por el agregado de plasma seminal, otros estudios han descripto efectos negativos respecto del agregado del mismo sobre la motilidad espermática (Dot *et al.*, 1979; Ritar *et al.*, 1982; de Lamirande; Gagnon, 1984; Iwamoto *et al.*, 1993; Graham, 1994), la viabilidad espermática (Dot *et al.*, 1979; Ritar *et al.*, 1982; Schmehl *et al.*, 1986; Garcia *et al.*, 1987 a y b) o sobre la susceptibilidad al “shock por frío” (Watson *et al.*, 1981) de los espermatozoides en distintas especies, como así también se encontraron variaciones entre individuos de la misma especie o influencia de la composición de la dieta recibida por éstos (Cremades *et al.*, 2004) .

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL EXPERIMENTAL Y EXPERIMENTOS PLANTEADOS

Aspectos generales

Para testear las hipótesis planteadas, se llevaron a cabo sesiones de colecta, evaluación y congelación de semen para cada raza y paralelamente, para cada raza, se realizaron sesiones de colecta de plasma seminal. Una vez obtenido el material experimental se realizaron 3 experimentos:

- En el primero de ellos, se evaluaron los efectos de los tratamientos de congelación (tres tipos de diluyente) y del tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido.
- El segundo experimento, se hizo con el propósito de realizar una evaluación de la fertilidad "*in vivo*" de los diluyentes de congelación para la raza caprina Saanen.
- En el tercero de los experimentos, el propósito fue evaluar el efecto de la raza y del agregado de plasma seminal pos descongelado.

Lugar y fecha de realización de los experimentos

Los experimentos 1 y 3 fueron realizados en las instalaciones del grupo de Biotecnología de la Reproducción (EEA Balcarce del INTA), ubicadas en el Km. 73,5 de la ruta nacional 226, partido de Balcarce en la Provincia de Buenos Aires, Argentina (37°45' Latitud Sur, 53°18' Longitud Oeste). Los trabajos abarcaron el periodo comprendido entre mayo de 2006 y enero de 2007.

El experimento 2 se llevó adelante en el establecimiento Granja "La Piedra" perteneciente al productor Daniel Colombo y ubicado en el partido de General Pueyrredón, provincia de Buenos Aires, Argentina (38° 01' 47" Latitud Sur y 57° 42' 17" Longitud Oeste). El ensayo se llevó a cabo entre los meses de Febrero y Abril de 2007.

Drogas y Reactivos

Las drogas y reactivos utilizados en las formulaciones de los distintos medios y soluciones (anexo I) utilizadas durante el experimento fueron de Merck®, Sigma-Aldrich®, Mallincrodt® e IMV®.

Semen y Plasma Seminal caprino

Los espermatozoides y el plasma seminal utilizados en los experimentos fueron obtenidos a partir de 4 machos caprinos adultos de raza Criolla y el mismo número de machos caprinos adultos de la raza Saanen.

3.2. MÉTODOS DE EVALUACIÓN, PROCESAMIENTO, REALIZACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS, DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Colecta y procesamiento del semen

Se realizaron para cada raza, 5 sesiones de colecta de semen, utilizándose 2 cabras de raza Saanen adultas como súcubo. La extracción de semen se realizó empleando vagina artificial atemperada a 39-40° C. El semen eyaculado fue colectado en tubos cónicos graduados de 14 ml adosados a la vagina artificial. Las muestras fueron mantenidas en baño maría a 37° C hasta su valoración cuali-cuantitativa, para posteriormente, en volúmenes iguales, conformar un “pool” por raza.

Métodos de valoración cuali-cuantitativa del semen fresco para congelación u obtención de plasma seminal

Los eyaculados fueron evaluados individualmente de acuerdo a los procedimientos descritos por Evans y Maxwell (1990) para esta especie animal. Los valores límite utilizados para la aceptación o rechazo de los eyaculados que continuarían el procesamiento son mencionados en cada parámetro en particular. Estos valores se tuvieron presentes en las sesiones de extracción de semen para congelación y también en aquellas llevadas adelante para la obtención de plasma seminal.

- Volumen del eyaculado

La determinación del volumen del semen eyaculado de cada macho caprino y en cada sesión fue tomada de forma inmediata, mediante la observación directa de la graduación marcada en el tubo de colecta (precisión de 0,1 ml). Finalmente se eligieron aquellos eyaculados con un volumen $\geq 0,4$ ml.

- Motilidad Microscópica Masal

La evaluación de la onda de movimiento espermático denominada motilidad microscópica masal, se determinó utilizando una escala subjetiva de clasificación de 0 a 5 puntos donde cada valor correspondió a la siguiente descripción:

0. Ausencia de espermatozoides móviles.
1. Algunos espermatozoides se mueven en su sitio.
2. Presencia de espermatozoides móviles, pero en insuficiente cantidad como para formar ondas.
3. Presencia de ondas o remolinos muy lentos (50-70 % de espermatozoides móviles).
4. Las ondas o remolinos se forman rápidamente (70-90 % de espermatozoides móviles).
5. Velocidad de formación de ondas extremadamente alta (>90 % de espermatozoides móviles).

Para realizar la determinación de cada eyaculado a evaluar, era descargada una gota de semen de 6 μ l en un portaobjetos templado a 37° C sobre una platina térmica a la misma temperatura y utilizado un microscopio óptico a 100x. La observación de las ondas características del semen se realizó sobre el borde de la gota de semen. Como criterio para la congelación o para la obtención de plasma seminal se eligieron aquellos eyaculados con motilidad microscópica masal ≥ 4 .

- Motilidad Progresiva Individual

Para esta determinación una muestra de cada eyaculado se diluyó (1:400) en una solución de citrato de sodio 2,92% (ver Anexo I) atemperada a 37° C. Posteriormente,

una gota de 6 μ l de esta dilución fue colocada entre porta y cubre objetos templado a 37° C sobre una platina térmica a la misma temperatura, la lectura se realizó en microscopio óptico (400x). Se consideró a los espermatozoides con motilidad individual progresiva aquellos que mostraban un desplazamiento enérgico, activo y rectilíneo en sentido de avance o con motilidad individual progresiva. Para calcular la proporción de espermatozoides en cada caso se observaron como mínimo 4 o 5 campos microscópicos con un mínimo de 50 células en cada campo, determinándose el porcentaje de espermatozoides con motilidad individual progresiva en relación al total de los espermatozoides móviles (con motilidad individual progresiva, con movimiento rotatorio o con movimiento ondulatorio).

Como criterio final, se eligieron aquellos eyaculados con motilidad individual progresiva $\geq 70\%$, tanto en los eyaculados destinados para congelación como en aquellos destinados a la obtención de plasma seminal.

- Vigor Espermático

En forma simultánea a la valoración de motilidad individual progresiva, se valoró el vigor espermático. Para ello se estimó subjetivamente la intensidad de movimientos que realizaban los espermatozoides con motilidad individual progresiva, para lo que se utilizó una escala subjetiva de 1 (motilidad progresiva muy lenta) a 5 (motilidad progresiva vigorosa), siendo el criterio mínimo de selección de los eyaculados, aquellos que mostraron un vigor de ≥ 3 .

Procesamiento del semen y plasma seminal. Conformación de "Pooles" de semen por raza y por tratamiento

Cada eyaculado que superó los estándares mínimos fijados para cada valoración (volumen $\geq 0,4$ ml; motilidad masal ≥ 4 (escala 1-5); motilidad individual progresiva $\geq 70\%$ y vigor ≥ 3) fue dividido en tres alícuotas de igual volumen, mezcladas entre si, conformando de esta manera tres pooles por sesión y por raza. En cada sesión de congelado, cada "pool" se conformó con semen de los cuatro machos caprinos de cada raza. Cada "pool" de semen fue mantenido a 32° C en baño maría hasta su

dilución para la congelación. Los diferentes diluyentes utilizados generaron los siguientes grupos:

- 1- Tris + Yema de huevo al 2% (Grupo T2)
- 2- Tris + lavado espermático + yema de huevo al 12% (Grupo T12) y
- 3- Bioxcell® (IMV Technologies, Francia), (Grupo TBioxcell).

La dilución se realizó en un solo paso hasta obtener una concentración final de 333×10^6 espermatozoides x ml.

Concentración espermática del “pool” para la dilución de cada tratamiento

La concentración espermática del “pool” se determinó utilizando la cámara de Thoma. Para esta determinación, se tomó una alícuota de 5 µl del “pool” y se diluyó en 2 ml de solución fisiológica formolada (ver anexo I), lográndose de esta manera una dilución 1:400. Luego de unos minutos se cargó la cámara que fue colocada en un microscopio de contraste de fase y observada a 400x, contándose los espermatozoides encontrados en 5 cuadrados mayores, equivalentes a 80 cuadrados menores. Al valor hallado se le aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Nº de ESPZ x inversa de la dilución x 4000} \\ = \frac{\text{Nº de ESPZ} \times 4000}{80 \text{ (Nº cuadrados menores)}} = \text{Nº ESPZ / mm}^3$$

Nº de ESPZ= total de espermatozoides contados;

Inversa de la Dilución: es 400;

4000: volumen total de la cámara (400/0,1mm³)

Nº cuadrados menores: es el número de cuadrados donde se contaron espermatozoides.

$$= \text{Nº ESPZ / mm}^3 \times 1000 = \text{Nº ESPZ} \times 10^6 / \text{ml de “pool” de semen}$$

El número total de espermatozoides del “pool” se calculó como el producto de la concentración por ml de “pool” de semen x Volumen del “pool”.

Nº ESPZ x 10⁶ / ml de semen x volumen del “pool” de semen (ml)

De esta misma forma y hasta este paso haciendo los reemplazos correspondientes es posible obtener la concentración por eyaculado.

A este número total de espermatozoides del “pool” se lo dividió por 50 millones (Concentración espermática/pellet), obteniéndose de esta manera y en cada caso la cantidad de pellets a producir. Al multiplicar este valor por 0,150 µl (volumen de cada pellet) se obtuvo el volumen total de diluyente y semen. Por lo tanto, sí a este volumen total se le resta el volumen del “pool” de semen, se obtiene el volumen de diluyente a agregar.

Procesamiento, congelado y descongelado del semen y plasma seminal

- Eliminación del plasma seminal del semen a congelar

En el tratamiento 2, previo a la dilución, se procedió a realizar el lavado del semen para eliminar el plasma seminal según protocolo descrito por Cabrera *et al.* (2005), que consistió en diluir el semen en una proporción 1:9 (v:v) en una solución de TRIS-Lavado a 37° C (ver Anexo I). El semen así diluido fue centrifugado durante 15 minutos a 700 g a temperatura ambiente.

Previo retiro del sobrenadante, el pellet se diluyó con la misma solución pero esta vez a temperatura ambiente y la centrifugación se repitió como la primera vez. Posteriormente se retiró nuevamente el sobrenadante, recuperándose en el pellet los espermatozoides libres de plasma seminal para su posterior dilución en TRIS+Yema de huevo al 12% (Cabrera *et al.*, 2005).

- Congelado del “pool” de semen

Para el congelado del semen, se siguió el protocolo propuesto por Evans; Maxwell (1990). Una vez diluido el semen en cada diluyente, las muestras fueron enfriadas de

los 32° C hasta alcanzar 5° C en dos horas (descenso térmico: 0,225°C/min). Alcanzada esta temperatura, las muestras diluidas fueron mantenidas por un nuevo período de dos horas a 5° C (etapa de equilibramiento).

El congelado se realizó mediante el siguiente procedimiento:

- ✓ En un bloque hielo seco (- 79° C), se realizaron pozos de 0,5-0,8 cm.
- ✓ El semen a 5° C fue homogeneizado y una gota fue evaluada nuevamente para comprobar su vitalidad. Seguidamente se depositaron alícuotas de 150 µl de semen diluido sobre cada hoyo (utilizándose pipetas enfriadas a 5° C), conteniendo una cantidad por pellet de 50×10^6 espermatozoides.
- ✓ Luego de transcurridos 5 minutos, los pellets congelados se volcaron en un recipiente con nitrógeno líquido.
- ✓ Finalmente se depositaron en un envase de plástico identificado (individualizando sesión, raza y tratamiento) y se almacenaron en un termo de N₂ líquido hasta su evaluación.

- Obtención, Procesamiento y Congelado del plasma seminal

En el 2006, en el mes de Abril para los machos de Raza Saanen y en el mes de Mayo en los machos de Raza criolla, en días distintos y mediando como mínimo dos días entre cada extracción, se colectó semen de los mismos machos cabrios donantes de semen con el objetivo de obtener el plasma seminal necesario para el trabajo experimental.

Los eyaculados que cumplieron los estándares mínimos fijados para el semen destinado a congelación fueron manipulados de la siguiente manera:

- ✓ Posteriormente a la evaluación, el semen se colocó en heladera a 5° C, por el lapso de una hora para disminuir el metabolismo de los espermatozoides.
- ✓ Seguidamente, cada eyaculado se centrifugó en tubos individuales (1200xg, 15 min., 4° C).

- ✓ Se obtuvo el sobrenadante por aspiración. Éste se colocó en un nuevo tubo y se repitió nuevamente el centrifugado como en el paso anterior.
- ✓ El sobrenadante del segundo centrifugado, fue filtrado a través de una membrana de acetato de celulosa (Microclar[®]) de 0,22 µm.
- ✓ Posteriormente, volúmenes iguales de plasma seminal correspondientes a los machos de cada raza, conformaron pools de cada sesión, los que fueron almacenados en tubos eppendorff.
- ✓ Cada tubo de cada sesión y raza fue identificado con la fecha y los números de los machos caprinos participantes del "pool", para posteriormente ser conservados a -18° C hasta su uso.

- Descongelado del semen

El descongelado se efectuó en tubos de vidrio conteniendo 150 µl de una solución de citrato de sodio 2,92% a 37° C. En cada tubo se procedió a colocar un pellet de cada tratamiento, sesión y raza obteniéndose un volumen final de 300 µl.

Esta nueva solución se mezcló y homogeneizó por agitación suave del tubo durante un tiempo no mayor a los dos minutos y fue dejada en el baño maría hasta las evaluaciones correspondientes.

- Descongelado del plasma seminal

El plasma seminal fue descongelado colocando los tubos eppendorf directamente en el baño maría a 37° C, permaneciendo así hasta su utilización.

Métodos de valoración cuali-cuantitativa de las muestras de semen congelado-descongelado y con agregado de plasma seminal

Las lecturas y valoraciones seminales fueron realizadas por la misma persona debidamente entrenada antes de la realización del estudio. Las determinaciones fueron realizadas a "ciegas", a fin de evitar subjetividades en las valoraciones. Para

ello una segunda persona se encargó de la aleatorización de las muestras a evaluar y la presentación de las alícuotas correspondientes sin ninguna identificación para que el evaluador realizara las lecturas sin saber a que o a quien pertenecían las mismas. Además, el mencionado colaborador anotaba el valor de la determinación en la planilla correspondiente.

Las metodologías de las valoraciones realizadas “*in vitro*” que se describen a continuación se realizaron luego de descongelar el semen según procedimiento descrito previamente.

- Motilidad progresiva individual y vigor

Se procedió de la misma manera como se describió previamente pero evaluando una muestra de semen congelado-descongelado.

- Coloración vital

Con la finalidad de valorar la proporción de espermatozoides vivos y muertos luego del proceso de congelado-descongelado se procedió a realizar una coloración vital. Para ello se colocaron 10 µl de semen congelado-descongelado en el extremo de un porta-objetos templado, se añadió una gota de solución de eosina-nigrosina (ver Anexo I), se mezcló durante 30 segundos y posteriormente se realizó el extendido del material sobre el resto del portaobjetos.

Los porta y cubre objetos como así también la eosina-nigrosina que se utilizaron en esta valoración fueron atemperados a 37° C antes de su utilización a fin de evitar el *shock* térmico.

Para esta determinación se observó el extendido en microscopio óptico (400x) provisto de platina térmica (37° C), contándose como mínimo 200 cabezas de espermatozoides. Se consideraron espermatozoides vivos aquellos cuyas cabezas aparecían sin color a diferencia de los muertos que estaban teñidos de color rosa. Las cabezas de espermatozoides que se coloreaban en la región pos acrosomal de color

rosado o rosado pálido, quedando el acrosoma blanquecino, fueron considerados vivos, de acuerdo con Bjorndahl *et al.* (2004).

Para el análisis estadístico, se considero sólo el porcentaje de espermatozoides vivos.

- Morfología espermática

Sobre el frotis teñido con eosina-nigrosina, se determinó el porcentaje de células espermáticas que presentaban algún tipo de anomalía en su conformación.

Para esta determinación se observó el extendido en microscopio óptico (400x) provisto de platina térmica (37° C), contándose como mínimo 200 espermatozoides. Las categorías de anomalías observadas se agruparon en acrosoma dañado o desprendido, microcéfalo, macrocéfalo, decapitados, mal implantación de la pieza intermedia, presencia de gota citoplasmática y colas torcidas. Los espermatozoides que no presentaban ninguna de estas alteraciones fueron considerados normales.

Para el análisis estadístico, se consideró el porcentaje de espermatozoides normales y con acrosoma dañado.

- Concentración espermática

En este caso se procedió de igual manera a la descrita previamente con la finalidad de confirmar que los pellets tenían la concentración definida en cada uno de los tratamientos.

- Prueba de Termorresistencia

Los pellets descongelados fueron mantenidos por dos horas en baño maría a 37° C determinándose Motilidad Individual Progresiva y Vigor según se ha descrito previamente.

- Prueba de Endósmosis o Hipoosmótica

La metodología utilizada fue la siguiente:

- ✓ Se tomó una muestra de 30 μ l del semen congelado-descongelado que fue colocada en un tubo eppendorf conteniendo 0,5 ml de solución de HOS (ver Anexo I) a 37° C.
- ✓ Se incubó en baño María a 37° C durante 30 minutos.
- ✓ Posteriormente se agregó 100 μ l de solución de HOS formol 3% (Ver Anexo I) con la finalidad de estabilizar las membranas y facilitar la lectura de la muestra.
- ✓ Las muestras permanecieron en una gradilla a temperatura ambiente hasta su evaluación, realizada dentro de las 2 h posteriores.
- ✓ La evaluación se realizó en un microscopio de contraste de fase (400x), contándose como mínimo 200 células.

Los resultados se expresaron en porcentaje de células positivas al test, es decir con cola enrollada (HOS+), en cambio los espermatozoides negativos, fueron aquellos cuya cola se encontraba recta o no enrollada (HOS-).

Para el análisis estadístico, se consideró sólo el porcentaje de células positivas.

Agregado de plasma seminal a muestras de semen congelado-descongelado

Para el experimento donde se buscó medir el efecto del agregado del plasma seminal, las muestras de semen congelado-descongelado que fueron obtenidas como se describió en el punto 3.8. y se dividieron en volúmenes iguales en dos tubos separados. Uno de ellos recibió 20 % de su volumen en plasma seminal de la misma raza, es decir 30 μ l, en cambio el otro no recibió ningún agregado y fue considerado grupo control.

Luego de 15 minutos de espera se realizaron las mismas valoraciones descritas en los puntos anteriores.

3.3. EXPERIMENTOS:

Se realizaron en total tres experimentos, como se detalla a continuación:

Experimento 1: Valoración cuali-cuantitativa de las muestras de semen congelado-descongelado.

Como el objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de los tratamientos de dilución y el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido, la secuencia que se explica abajo se realizó a los 2, 4 y 6 meses de transcurrido el momento de congelado del material experimental.

Fueron realizadas dos repeticiones de descongelado, por fecha de realización de las evaluaciones. Cinco minutos después de descongelados los pellets (considerado tiempo 0) según procedimiento detallado previamente, se procedió de la siguiente manera:

- ✓ Se tomó una primera alícuota de semen para valorar la Motilidad Individual Progresiva y el Vigor,
- ✓ Se tomó una segunda alícuota de semen para valorar Funcionalidad de la Membrana Plasmática (HOS T),
- ✓ Se tomó una tercera alícuota de semen para valorar el porcentaje de espermatozoides vivos (coloración de eosina-nigrosina),
- ✓ Las patologías espermáticas se determinaron realizando una nueva lectura al preparado anterior.

El sobrante permaneció en baño maría a 37° C por un lapso de dos horas (Tiempo 2) y con el se procedió de la siguiente manera:

- ✓ Se tomó una alícuota de semen para valorar la Motilidad Individual Progresiva y el Vigor

Experimento 2: Prueba de fertilidad “in vivo”, comparación de tratamientos de congelación.

Este experimento fue realizado entre los meses de Febrero y Abril del 2007. Se realizó un tratamiento de inducción y sincronización de celos e inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) con semen congelado por cada uno de los tratamientos en cabras de raza Saanen. La inclusión de un tratamiento con semen fresco diluido (en leche descremada tinalizada) actuó como control de la fertilidad y del tratamiento de inducción y sincronización de celo realizado a las cabras.

- Inducción y Sincronización de celos e Inseminación Artificial

Con la finalidad de poder realizar la IATF, el lote de hembras recibió tratamiento de inducción y sincronización de celos mediante la administración de hormonas. El mismo consistió en la aplicación de esponjas intravaginales impregnadas con 50 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) durante un período de 11 días, dos días antes de finalizar el tratamiento se aplicó 100 µgr de PGF2α. Al momento de ser retiradas las esponjas, se aplicó una inyección de 250 UI de gonadotrofina corionica equina y se realizó inseminación a las 48 y a las 54 h. La IATF se realizó por vía cervical mediante vaginoscopia, utilizando pistola para inseminar. La dosis inseminante en cada oportunidad fue de 150 µl (volumen de 1 pellet) conteniendo como mínimo 50 millones de espermatozoides, tanto en el caso del semen congelado-descongelado como con el semen fresco diluido.

Del termo de nitrógeno líquido en que se encontraban las muestras, se tomaron 4 pellets al azar de cada una de las cinco sesiones de congelado, siendo acondicionados en tubos criogénicos identificados y mantenidos en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización. Previo a la IATF, en tubo de vidrio sin diluyente, se descongeló individualmente un pellet de cada sesión (total de 5 pellets), mantenido en baño maría a 37° C hasta su descongelación (no mas de 30 segundos). Luego, el semen contenido en cada tubo se mezcló en un tubo nuevo conformando un “pool”; este fue homogeneizado por movimientos suaves de agitación, se cargó en la pistola de inseminar y con esta carga, se inseminaron cinco cabras. Este procedimiento fue repetido en cada uno de los momentos en que se realizó la IATF.

Quedaron así conformados los siguientes grupos de cabras:

- ✓ 27 cabras inseminadas con semen fresco diluido (Tratamiento T0), que sirvió de control de fertilidad y del tratamiento de inducción y sincronización de celo,
- ✓ 28 Cabras, con semen del tratamiento T2,
- ✓ 30 Cabras, con semen del tratamiento T12 y
- ✓ 29 Cabras, con semen del tratamiento TBioxcell.

- Diagnóstico de gestación

La evaluación de gestación se realizó a los 37 días posinseminación, utilizándose un ecógrafo Aloka SSD 500 con sonda de 5 Mhz por vía transrectal.

Experimento 3: Valoración cuali-cuantitativa de las muestras de semen congelado descongelado con y sin agregado de plasma seminal en razas Criollo y Saanen.

Durante este experimento se realizaron tres repeticiones de descongelado, por fecha de realización de las evaluaciones. Una vez descongeladas las pastillas se dividieron en dos volúmenes iguales en tubos separados. Uno de ellos recibió 20 % de su volumen en plasma seminal de la misma raza que fue obtenido, es decir 30 μ l, en cambio el otro no recibió ningún agregado.

Luego de 15 minutos, se realizaron las evaluaciones descritas en el experimento 1 comparando simultáneamente las muestras control (sin agregado de plasma seminal) y las muestras con agregado de plasma seminal de la misma raza que fue obtenido.

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En los primeros análisis realizados explorando el avance del trabajo, se utilizó el procedimiento PROC-GLM de SAS en el cual aparecía diferencia entre razas, que en

esta etapa fue considerada como tal. Sin embargo con la totalidad de datos del trabajo y en análisis posteriores se determinó que los datos obtenidos presentaban heterogeneidad de varianza. Para homogeneizar las varianzas de los efectos de las razas, los tratamientos y el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido se utilizó el procedimiento PROC-MIXED de SAS, modelando dicha heterogenicidad mediante la opción group de la sentencia random.

Cuando éstas fueron aplicadas, las diferencias entre razas en el experimento 1 no fueron más significativas y a raíz de esto se tomó la decisión de sacar la raza como efecto fijo del modelo, realizándose nuevamente los análisis. El modelo propuesto ajustó correctamente y no se observó efecto de la sesión en ninguno de los experimentos.

Experimento 1: Valoración cuali-cuantitativa de las muestras de semen congelado-descongelado.

Las evaluaciones se realizaron bajo un DBCA con un arreglo factorial 3x3 (tres tratamientos y tres tiempos de almacenamiento). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el PROC MIXED del paquete estadístico SAS (V. 8.0), analizando los datos mediante ANOVA. El nivel de significancia (α) para el test de hipótesis fue del 0,05. Cuando existieron diferencias se procedió de la siguiente manera:

- La comparación de medias se analizó mediante el test de Duncan,
- La presencia de interacción por medio del test de Tukey.

El modelo matemático fue:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + T_j + M_k + (T^*M)_{jk} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Observación de la variable respuesta

μ = Media general

B_i = efecto de i-ésimo bloque (sesión)

T_j = efecto del j-ésimo tratamiento

M_k = efecto del k-ésimo tiempo de almacenamiento

$(T^*M)_{jk}$ = efecto de la interacción del j-ésimo tratamiento con la k-ésimo tiempo de almacenamiento

ϵ_{ijk} = error experimental sobre el cual se debe cumplir la validez de los supuestos que permiten el análisis de varianza, es decir normalidad, homogeneidad de varianza e independencia.

Las variables dependientes a tiempo 0 en el modelo matemático fueron:

- ✓ Motilidad individual progresiva,
- ✓ Vigor,
- ✓ Funcionalidad de la membrana plasmática,
- ✓ Porcentaje de espermatozoides vivos,
- ✓ Patologías espermáticas y
- ✓ Porcentaje de espermatozoides con acrosomas dañados.

Las variables dependientes a tiempo 2 en el modelo matemático fueron:

- ✓ Motilidad individual progresiva y
- ✓ Vigor

Experimento 2: Prueba de fertilidad "in vivo"

El experimento 2 se analizó a través del procedimiento para modelos generalizados (Proc GENMOD) del paquete estadístico SAS (V. 8.0).

El modelo matemático fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_j + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Observación de la variable respuesta

μ = Media general

T_j = efecto del k-ésimo tratamiento

ϵ_{ij} = error experimental sobre el cual se debe cumplir la validez de los supuestos que permiten el análisis de varianza, es decir normalidad, homogeneidad de varianza e independencia.

El nivel de significancia (α) que se empleó para el test de hipótesis fue del 0,05.

Experimento 3: Valoración cuali-cuantitativa de las muestras de semen congelado-descongelado, con y sin agregado de plasma seminal

Las evaluaciones se realizaron bajo un DBCA con un arreglo factorial 2x2x3 (Agregado o no de plasma seminal, dos razas y tres tratamientos). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el PROC MIXED del paquete estadístico SAS (V. 8.0), analizando los datos mediante ANOVA. El nivel de significancia (α) que se empleó para el test de hipótesis es del 0,05. Cuando existieron diferencias se procedió de la siguiente manera:

- La comparación de medias se analizó mediante el test de Duncan
- La presencia de interacción por medio del test de Tukey.

El modelo matemático fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + R_j + T_k + P_l + (R*T)_{jk} + (R*P)_{jl} + (T*P)_{kl} + (R*T*P)_{jkl} + \epsilon_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijk} = Observación de la variable respuesta

μ = Media general

B_i = efecto de i-ésimo bloque (sesión)

R_j = efecto de la j-ésima raza

T_k = efecto del k-ésimo tratamiento

P_l = efecto del l-ésimo plasma

$(R^*T)_{jk}$ = efecto de la interacción del j-ésima raza con la k-ésimo tratamiento

$(R^*P)_{jl}$ = efecto de la interacción de la j-ésima raza con el l-ésimo plasma

$(T^*P)_{kl}$ = efecto de la interacción del k-ésimo tratamiento con el l-ésimo plasma

$(R^*T^*P)_{jkl}$ = efecto de la interacción del j-ésima raza con el k-ésimo tratamiento y con el l-ésimo plasma

ϵ_{ijkl} = error experimental sobre el cual se debe cumplir la validez de los supuestos que permiten el análisis de varianza, es decir normalidad, homogeneidad de varianza e independencia.

Las variables dependientes a tiempo 0, en el modelo matemático son:

- ✓ Motilidad individual progresiva,
- ✓ Vigor,
- ✓ Funcionalidad de la membrana plasmática,
- ✓ Tasa de espermatozoides vivos,
- ✓ Patologías espermáticas y
- ✓ Porcentaje de espermatozoides con acrosomas dañados.

Las variables dependientes a tiempo 2, en el modelo matemático son:

- ✓ Motilidad individual progresiva y
- ✓ Vigor.

3.5. ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA EN CADA EXPERIMENTO.

Durante las valoraciones “*in vitro*” realizadas a tiempo 0 en los experimentos 1 y 3 se utilizó el material seminal congelado durante las 5 sesiones de colecta (semen y plasma seminal) para cada raza, sobre estas muestras se realizaron las evaluaciones de Motilidad Individual Progresiva, Vigor, Funcionalidad de la Membrana Plasmática, Porcentaje de Espermatozoides Vivos, Patologías Espermáticas y Porcentaje de

Espermatozoides con Acrosomas Dañados. En cambio, a tiempo 2 horas sólo se realizaron las evaluaciones de Motilidad Individual Progresiva y Vigor (Figura 11).

Sólo en el experimento 1, estos procedimientos (Figura 11) se repitieron durante los meses de Julio, Septiembre y Noviembre del año 2006, con el objetivo de evaluar el efecto del transcurso del tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido sobre las evaluaciones de Motilidad Individual Progresiva, Vigor, Funcionalidad de la Membrana Plasmática, Porcentaje de Espermatozoides Vivos, Patologías Espermáticas y Porcentaje de Espermatozoides con Acrosomas Dañados a tiempo 0. En cambio luego de transcurridas dos horas de incubación a 37° C, sólo se realizaron las evaluaciones de Motilidad Individual Progresiva y Vigor.

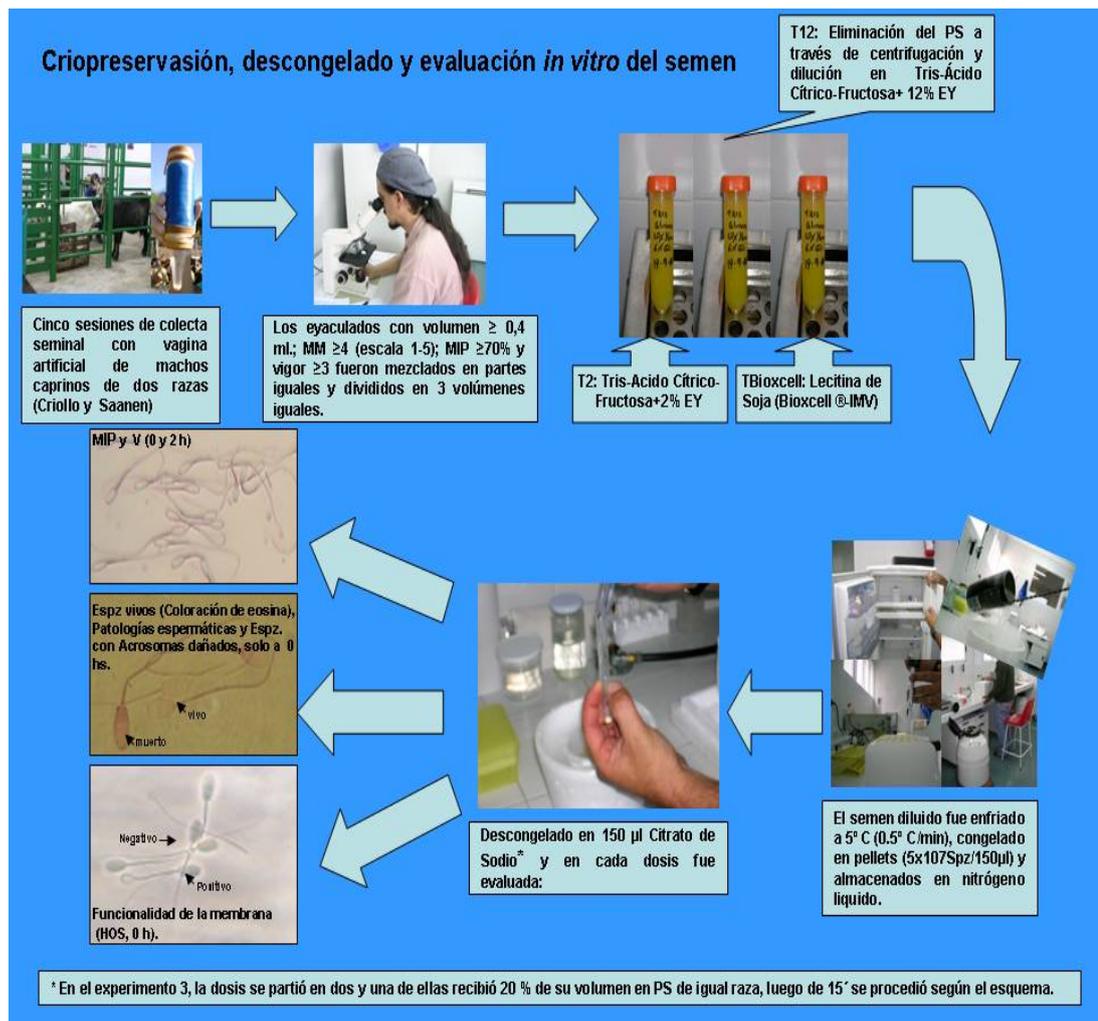


Figura 11: Esquema de la metodología utilizada para los experimentos 1 y 3.

En el experimento 2, se efectuó la valoración “*in vivo*” de los medios de congelación de la raza Saanen, donde se realizó una sincronización de celo y ovulación siguiendo el esquema de trabajo que muestra la Figura 12. Estos procedimientos se realizaron durante los meses de Febrero-Abril de 2007.

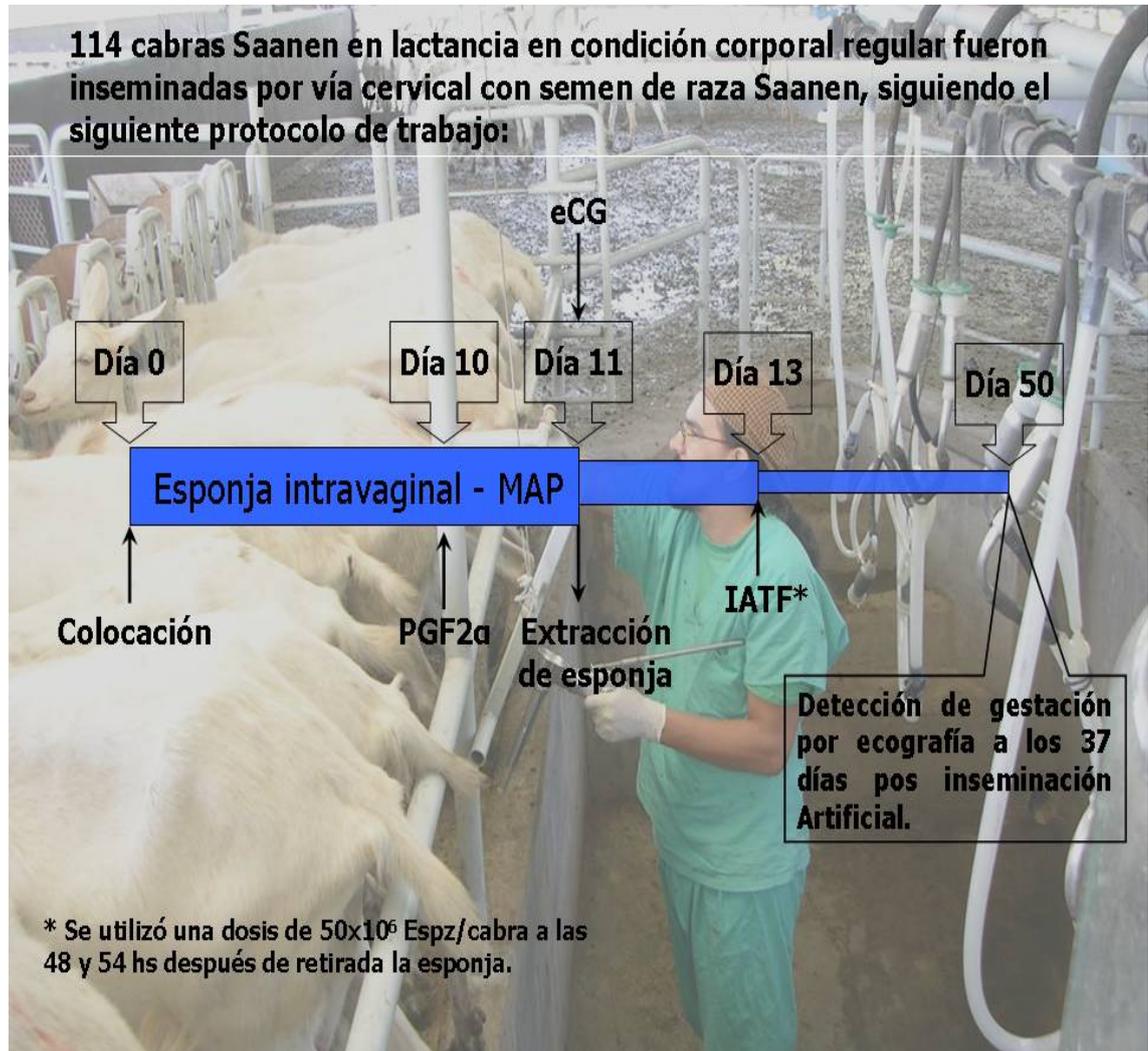


Figura 12: Esquema de la metodología utilizada para el experimento 2.

4. RESULTADOS

4.1.- MATERIAL PROCESADO Y UTILIZADO

Durante las cinco sesiones de congelado se obtuvieron un total de 1661 dosis inseminantes (pastillas) que fueron discriminadas para cada raza y tratamiento de acuerdo a la Tabla 4.

Tabla 4: Pastillas elaboradas durante las sesiones de congelado.

Raza	Tratamiento		
	T 2	T 12	T Bioxcell
Criollo	311	209	295
Saanen	336	175	335

Las pastillas evaluadas, fueron distribuidas según se describe en la Tabla 5.

Tabla 5: Cantidad de pastillas utilizadas en cada experimento.

		Tratamiento		
		T 2	T 12	T Bioxcell
Experimento 1		30	30	30
Experimento 2		58	60	60
Experimento 3	Criollo	30	30	30
	Saanen	30	30	30

4.2.- EXPERIMENTO 1: COMPARACIÓN DE DILUYENTES DE CONGELACIÓN, TIEMPO DE ALMACENAMIENTO Y RAZA

El efecto de la raza, que fuera evaluado por distintos autores en diferentes aspectos influenciados por el comportamiento estacional de esta especie y los efectos que ésta tiene sobre la calidad seminal (Perez; Mateos, 1996; Dickson-Urdaneta; Torres-Hernández; Becerril-Pérez, 2000; Karagiannidis; Varsakeli; Karatzas, 1999; Ahmad; Noakes, 1996) no fue evaluado hasta el presente en su respuesta frente a la criopreservación. En nuestro estudio se intentó evaluar esta característica mediante el procedimiento PROC-GLM de SAS encontrándose diferencias entre razas. Sin embargo, la determinación posterior de heterogeneidad de la varianza obligó a utilizar el procedimiento PROC-MIXED de SAS, cuando éste fue aplicado, las diferencias significativas entre razas no se observaron, aún cuando en muchos de los parámetros, la raza Criolla aparece como menos afectada por el proceso de la congelación. De acuerdo con esto, para disminuir el error experimental al aumentar el n , esta variable no fue considerada en los análisis posteriores de este experimento.

- Evaluaciones realizadas a Tiempo 0

Transcurridos 5 minutos del descongelado del semen (tiempo 0), se realizaron las evaluaciones, obteniéndose los siguientes resultados:

- Motilidad Individual Progresiva

Se observó efecto del tratamiento y del momento de evaluación sobre la motilidad individual progresiva ($p < 0,05$), no detectándose efecto de la interacción entre ambas (Tabla 6).

La motilidad individual progresiva de los espermatozoides del tratamiento T 12 fue mayor ($p < 0,05$) que aquellas de los tratamientos T 2 y T Bioxcell. En tanto que éstos no fueron diferentes entre sí.

Respecto al tiempo de almacenamiento, la motilidad individual progresiva observada a los 2 meses fue superior que la observada a los 6 meses, mientras que entre 4 y 6 meses no hubo disminución de motilidad individual progresiva.

Tabla 6: Motilidad individual progresiva (MIP) de los tratamientos y los meses de almacenamiento a tiempo 0 (media \pm e.e. en %)

Evaluación	Tratamiento			Tiempo de Almacenamiento (meses)			Interacción
	T 2	T 12	T Bioxcell	2	4	6	
MIP	33,7 \pm 1,6b	51,0 \pm 1,6a	31,3 \pm 1,6b	42,2 \pm 1,7a	38,3 \pm 1,6ab	35,5 \pm 1,6b	NS

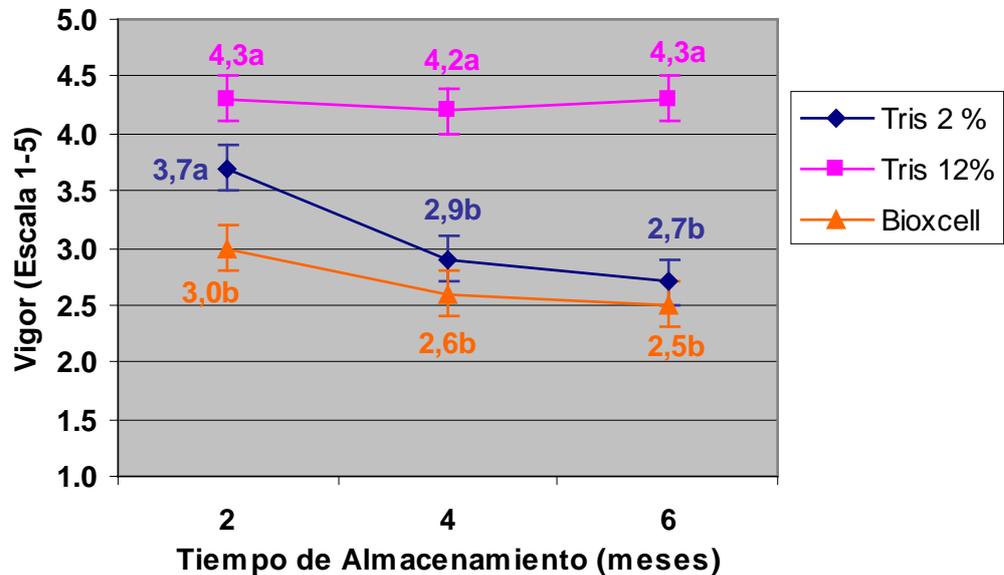
Nota: ab: Valores con letras distintas difieren significativamente ($p < 0.05$); NS: no significativa

- Vigor

En esta variable se observó efecto ($p < 0,05$) de la interacción de las variables fijas tratamiento y tiempo de almacenamiento (Figura 13).

Al observar el comportamiento de los tratamientos dentro de cada tiempo de almacenamiento (Figura 13), encontramos que el vigor observado en el tratamiento con lavado de plasma seminal y alta concentración de yema de huevo fue mayor ($p < 0,05$) que el de los tratamientos con bajo contenido de yema de huevo y lecitina vegetal, en los tres tiempos de almacenamiento (Figura 13).

Si se observa el comportamiento de cada tratamiento a través del tiempo de almacenamiento (Figura 13), el vigor manifestado en los tratamientos T Bioxcell y T 2 mostró una tendencia a decrecer a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento. Esta disminución sólo fue significativa en el tratamiento T 2 ($p < 0,05$). El tratamiento con lavado del plasma seminal y alta concentración de yema de huevo fue el que mostró un vigor constante al transcurrir el tiempo de almacenamiento.



Nota: ab: Valores con letras distintas difieren significativamente ($p < 0,05$).

Figura 13: Efecto de la interacción de los tratamientos y el tiempo de almacenamiento sobre el vigor a tiempo 0 de espermatozoides caprinos congelados/descongelados (medias \pm e.e.).

- Prueba de Endosmósis o Hipoosmótica

Para esta variable respuesta, la variable fija tratamiento fue significativa ($p < 0,05$), no detectándose efecto del tiempo de almacenamiento ni de la interacción entre ambas (Tabla 7).

Los eyaculados del tratamiento con lavado de plasma seminal y alta concentración de yema de huevo presentaron un mayor porcentaje de espermatozoides con membrana funcional con respecto a los otros dos tratamientos ($p < 0,05$) los cuales no difirieron entre si (Tabla 7).

Los porcentajes de espermatozoides HOS + fueron similares a los 2, 4 ó 6 meses de almacenamiento (Tabla 7).

Tabla 7: Funcionalidad de la membrana plasmática de los tratamientos y tiempos de almacenamiento a Tiempo 0 (media \pm e.e. en %).

Evaluación	Tratamiento			Tiempo de Almacenamiento (meses)			Interacción
	T 2	T 12	T Bioxcell	2	4	6	
Hos +	23,1 \pm 1,4b	33,6 \pm 1,4a	27,1 \pm 1,4b	29,0 \pm 1,4	26,7 \pm 1,4	28,0 \pm 1,4	NS

Nota: ab: Valores con letras distintas difieren significativamente ($p < 0,05$); NS: no significativo

- Espermatozoides vivos (%)

El efecto del tipo de diluyente fue significativo ($p < 0,05$) para esta variable, no detectándose efecto del tiempo de almacenamiento ni de interacciones (Tabla 8).

El porcentaje de espermatozoides vivos en los diluyentes con lecitina vegetal o sin plasma seminal y alta concentración de yema de huevo no fueron diferentes entre sí, evidenciando, ambos un mayor porcentaje de espermatozoides vivos que el tratamiento con bajo contenido de yema ($p < 0,05$; Tabla 8).

A pesar que los porcentajes de espermatozoides vivos tendieron a disminuir entre 2 y 6 meses de almacenamiento, estas diferencias no alcanzaron a ser significativas ($p < 0,63$; Tabla 8).

Tabla 8: Espermatozoides vivos de los tratamientos y tiempo de almacenamiento a tiempo 0 (media \pm e.e. en %)

Evaluación	Tratamiento			Tiempo de Almacenamiento (meses)			Interacción
	T 2	T 12	T Bioxcell	2	4	6	
Vivos (%)	37,3 \pm 2,4b	47,5 \pm 2,2a	48,6 \pm 2,7a	46,3 \pm 2,5	43,0 \pm 2,5	44,1 \pm 2,5	NS

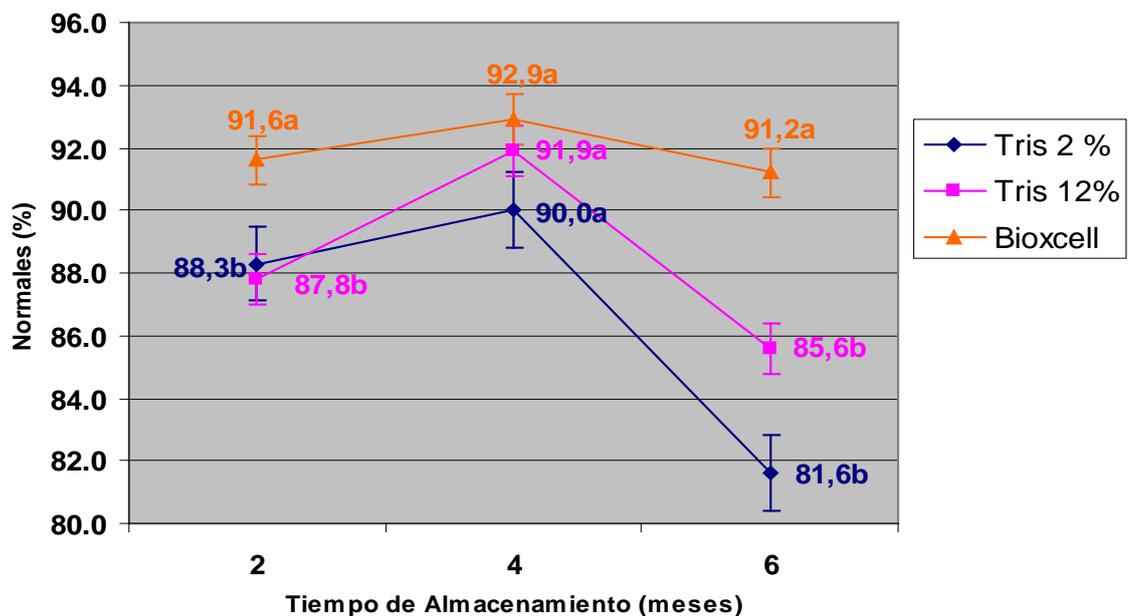
Nota: ab: Valores con letras distintas difieren significativamente ($p < 0,05$); NS: no significativo

- Espermatozoides Normales (%)

En el porcentaje de espermatozoides normales se observó efecto ($p < 0,05$) de la interacción tratamiento por tiempos de almacenamiento (Figura 14). El tratamiento Bioxcell se mantuvo constante a diferencia de los otros dos tratamientos que tuvieron una baja significativa de la proporción de espermatozoides normales a los 6 meses.

La interacción entre los tratamientos y el tiempo de almacenamiento en el porcentaje de espermatozoides normales, se manifestó por el aumento en el porcentaje de espermatozoides normales que se observó en el mes 4 de almacenamiento en el tratamiento T 12 ($p < 0,05$; Figura 14). Si bien fue el único tratamiento con diferencias significativas, en todos los casos se observó una tendencia similar.

Figura 14: Efecto de los tratamientos y tiempo de almacenamiento sobre los espermatozoides congelados/descongelados de caprinos sin alteraciones de conformación (media \pm e.e.)



Nota: ab: Valores con letras distintas difieren significativamente ($p < 0,05$).

- Acrosomas dañados (%)

Para esta variable respuesta, la variable fija tratamiento y tiempo de almacenamiento fueron significativas ($p < 0,05$), no detectándose efecto de la interacción entre ambas (Tabla 9).

Tabla 9: Porcentaje de espermatozoides con acrosomas dañados en los tratamientos y tiempo de almacenamiento a tiempo 0 (media \pm e.e. en %)

Evaluación	Tratamiento			Tiempo de Almacenamiento (meses)			Interacción
	T 2	T 12	Bioxcell	2	4	6	
Acrosomas dañados	2,5 \pm 0,22a	2,5 \pm 0,29a	1,6 \pm 0,21b	2,9 \pm 0,25a	0,8 \pm 0,25b	2,9 \pm 0,25a	NS

Nota: ab: Valores con letras distintas difieren significativamente ($p < 0,05$); **NS:** no significativo

Para esta variable, el tratamiento con lecitina vegetal presentó el menor porcentaje de espermatozoides con el acrosoma dañado ($p < 0,05$). Los tratamientos con yema de huevo no se diferenciaron entre si.

Respecto de los tiempos de almacenamiento, los espermatozoides con acrosomas dañados tuvieron el mínimo valor en el cuarto mes poscongelado. Este mes fue diferente al segundo y sexto mes de conservación; estos meses presentaron valores mayores de acrosomas dañados y no fueron diferentes entre si.

- Evaluaciones realizadas a Tiempo 2

Transcurridas dos horas de incubación a 37° C en baño maría las muestras se evaluaron nuevamente, obteniéndose los siguientes resultados:

- Motilidad Individual Progresiva

Esta variable fue afectada significativamente por la composición del diluyente ($p < 0,05$), no observándose efectos del tiempo de almacenamiento ni de la interacción entre las variables.

La motilidad individual progresiva de los espermios del tratamiento con lavado de plasma seminal y alta concentración de yema de huevo fue superior ($p < 0,05$) a la de los otros tratamientos que a su vez no fueron diferentes entre si (Tabla 10).

La motilidad individual progresiva no presentó diferencias significativas ($p < 0,58$) entre los tiempos de almacenamiento (Tabla 10).

Tabla 10: Efecto de los tratamientos y tiempo de almacenamiento sobre la motilidad individual progresiva (MIP) a tiempo 2 (media \pm e.e. en %)

Evaluación	Tratamiento			Tiempo de Almacenamiento (meses)			Interacción
	T 2	T 12	T Bioxcell	2	4	6	
MIP	17,3 \pm 1,7b	39,7 \pm 1,7a	11,9 \pm 1,7b	24,4 \pm 1,6	22,2 \pm 1,7	22,3 \pm 1,7	NS

Nota: ab: Valores con letras distintas difieren significativamente ($p < 0,05$); NS: no significativo

- Vigor

Para el vigor, los efectos fijos tratamiento y tiempo de almacenamiento fueron significativos ($p < 0,05$), no detectándose efecto de su interacción (Tabla 11).

Los espermatozoides del tratamiento T 12 fueron los que presentaron mayor vigor a las 2 h posdescongelado ($p < 0,05$) respecto de los otros dos tratamientos. Por su lado, el vigor observado en el tratamiento con bajo contenido de yema mostró una tendencia a ser mejor que el tratamiento con lecitina vegetal (Tabla 11).

El vigor registrado a los dos meses de almacenamiento fue mayor ($p < 0,05$) al observado a los 4 y 6 meses, mientras que estos meses no se diferenciaron entre si (Tabla 12).

Tabla 11: Efecto de los tratamientos y el tiempo de almacenamiento sobre el Vigor a tiempo 2 (media \pm e.e. en %)

Evaluación	Tratamiento			Tiempos de almacenamiento (meses)			Interacción
	T 2	T 12	Bioxcell	2	4	6	
Vigor	1,4 \pm 0,2b	2,6 \pm 0,2a	0,7 \pm 0,2b	2,0 \pm 0,2a	1,1 \pm 0,2b	1,5 \pm 0,2b	NS

Nota: ab: Valores con letras distintas difieren significativamente ($p < 0,05$); NS: no significativo

4.3. EXPERIMENTO 2: PRUEBA DE FERTILIDAD “IN VIVO”, COMPARACIÓN DE DILUYENTES DE CONGELACIÓN.

Hubo efecto significativo de los los diluyenes utilizados ($p < 0,05$) y los resultados se muestran en el Tabla 12.

Tabla 12: Efecto de los tratamiento sobre la fertilidad “*in vivo*” (%)

Tratamiento	♀ preñadas/ Inseminadas	%	Efecto
Semen Fresco Diluido	10/27	37	a
T 2	7/28	25	ab
T 12	9/30	30	a
T Bioxcell	2/29	6	b

Nota: ab: Valores con letras distintas difieren significativamente ($p < 0,05$).

Las tasas de preñez en los tratamientos Control (semen fresco diluido) y T 12 (eliminación del plasma seminal y 12% de yema de huevo) fueron superiores ($p < 0,05$) al tratamiento con lecitina de soja.

El tratamiento con bajo contenido de yema de huevo no fue diferente ($p < 0,05$) de ninguno de los tratamientos, a pesar que el valor numérico del resultado de preñez muestra una tendencia muy superior al tratamiento con lecitina de soja y mas cercano a los valores de los tratamientos con semen fresco diluido y con eliminación de plasma seminal y alto contenido yema de huevo.

4.4.- EXPERIMENTO 3: EVALUACIÓN DEL AGREGADO DE PLASMA SEMINAL POSDESCONGELADO, SU EFECTO SOBRE LAS RAZAS Y LOS DILUYENTES DE CONGELACIÓN

- Evaluaciones realizadas a tiempo 0

Transcurridos 15 minutos del descongelado y del agregado del plasma seminal (a tiempo 0), se obtuvieron los siguientes resultados:

- Motilidad Individual Progresiva

Esta variable respuesta no fue afectada por el agregado de plasma seminal, la raza o sus interacciones, encontrándose efecto significativo de los medios de congelación ($p < 0,05$; Tabla 13).

La motilidad individual progresiva del tratamiento T 12 fue superior ($p < 0,05$) a las observadas en los tratamientos con bajo contenido de yema de huevo y con lecitina vegetal, los que a su vez no difirieron entre si (Tabla 13).

La motilidad individual progresiva del tratamiento con eliminación del plasma seminal y alta concentración de yema de huevo fue superior ($p < 0,05$) a la observada en el tratamiento con bajo contenido de yema y con lecitina vegetal que a su vez no difirieron entre si (Tabla 13).

Tabla 13: Efecto del plasma seminal, la raza y los tratamientos sobre la motilidad individual progresiva (MIP) a tiempo 0 (media \pm e.e. en %)

Evaluación	Plasma		Raza		Tratamiento			Interacción
	Sin	Con	Criollo	Saanen	T 2	T12	Bioxcell	
MIP	43,0 \pm 1,4	41,4 \pm 1,4	43,6 \pm 1,7	40,8 \pm 1,8	36,7 \pm 1,9b	56,9 \pm 2,2a	33,1 \pm 2,1b	NS

Nota: ab: Valores con letras distintas difieren significativamente ($p < 0,05$); NS: no significativo

- Vigor

En esta evaluación, no se observó efecto del agregado de plasma seminal, de la raza, ni de las interacciones; sólo el efecto del tratamiento se mostró significativo ($p < 0,05$; Tabla 14). Entre razas, sólo se observó una tendencia a mayor vigor en la raza Criollo ($p < 0,069$)

El tratamiento con eliminación de plasma seminal y alta concentración de yema de huevo mostró tener mayor vigor ($p < 0,05$) que el observado en los otros dos tratamientos los que a su vez no difirieron entre si (Tabla 14).

Tabla 14: Vigor observado en el plasma seminal, las razas y los tratamientos a tiempo 0 (media \pm e.e. en %)

Evaluación	Plasma		Raza		Tratamiento			Interacción
	Sin	Con	Criollo	Saenen	T 2	T12	Bioxcell	
Vigor	3,5 \pm 0,1	3,5 \pm 0,1	3,6 \pm 0,1	3,5 \pm 0,1	3,2 \pm 0,2b	4,5 \pm 0,1a	2,8 \pm 0,2b	NS

Nota: ab: Valores con letras distintas difieren significativamente ($p < 0,05$); **NS:** no significativo

- Prueba de Endosmósis o Hipoosmótica

En la actividad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide se observó efecto significativo de la presencia de plasma seminal y los tratamientos ($p < 0,05$), no observándose efectos de la raza ni de sus interacciones (Tabla 15).

A tiempo cero, el agregado de plasma seminal al semen descongelado deprimió ($p < 0,05$) la actividad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides (Tabla 15).

El valor obtenido para espermatozoides con membrana plasmática funcional en el tratamiento con eliminación de plasma seminal y alta concentración de yema de huevo fue superior ($p < 0,05$) al de los tratamientos con bajo contenido de yema y con lecitina vegetal. En tanto que en este último, el valor superó ($p < 0,05$) al observado en el tratamiento con bajo contenido de yema (Tabla 15).

Tabla 15: Efecto del agregado de plasma seminal, la raza, los tratamientos sobre la funcionalidad de la membrana plasmática a Tiempo 0 (media \pm e.e. en %)

Evaluación	Plasma		Raza		Tratamiento			Interacción
	Sin	Con	Criollo	Saenen	T 2	T12	Bioxcell	
Hos +	27,8 \pm 1,5a	17,7 \pm 1,5b	24,0 \pm 1,8	21,5 \pm 1,8	18,7 \pm 1,9c	27,5 \pm 1,9a	22,0 \pm 1,9b	No

Nota: ab: Valores con letras distintas difieren significativamente ($p < 0,05$); **NS:** no significativo

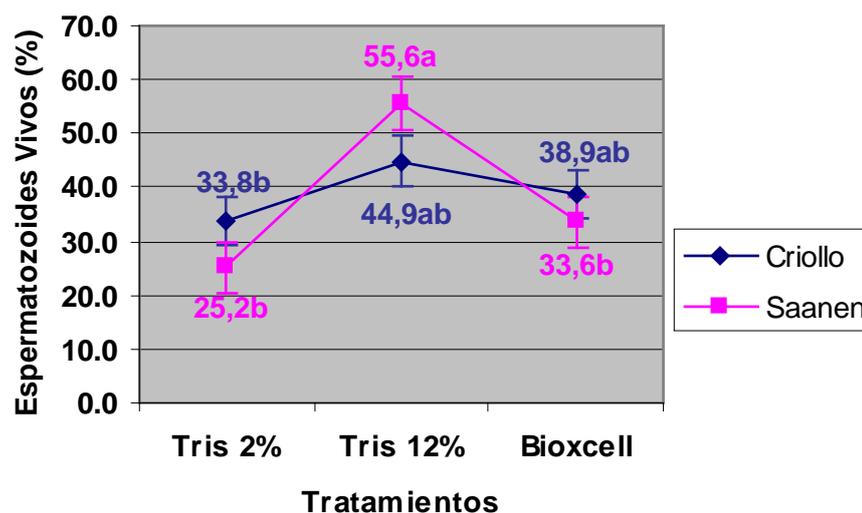
- Espermatozoides vivos (%)

El porcentaje de espermatozoides vivos determinados por medio de la coloración vital de eosina-nigrosina se vio afectado significativamente ($p < 0,05$) por el efecto fijo

plasma seminal y por la interacción de la raza y los tratamientos. No se observó comportamiento significativo de otras interacciones.

En presencia de plasma seminal la cantidad de espermatozoides vivos fue inferior ($p < 0,05$) a la observada en el semen al que no se agregó plasma seminal ($31,4 \pm 2,7b$ vs $45,9 \pm 2,8a$ %, respectivamente).

El mayor porcentaje de espermatozoides vivos fue observado en el tratamiento con eliminación del plasma seminal y alto porcentaje de yema de huevo en el semen de raza Saanen ($p < 0,05$; Figura 15).



Nota: Valores con letras distintas difieren significativamente ($p < 0,05$).

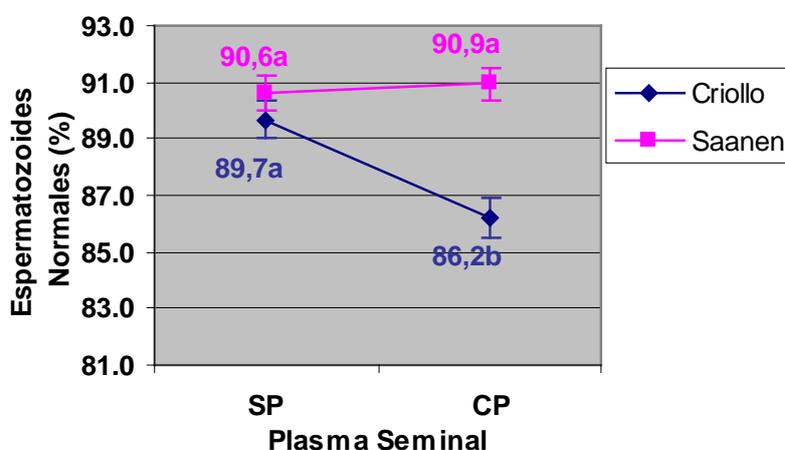
Figura 15: Efecto de la interacción de los tratamientos y las razas sobre el porcentaje de espermatozoides vivos luego del descongelado a tiempo 0 (media \pm e.e.).

- Espermatozoides Normales (%)

El porcentaje de espermatozoides normales fue afectado significativamente por el efecto simple de los medios de congelación y por la interacción raza*plasma seminal ($p < 0,05$), no se observó comportamiento significativo de otras interacciones.

El porcentaje de espermatozoides normales en el tratamiento con lecitina vegetal mostró ser significativamente mayor que los observados en los otros dos tratamientos ($92,2\pm 0,5a$, $87,2\pm 0,7b$ y $88,7\pm 0,6b$ para T Bioxcell, T 2 y T 12, respectivamente). Las diferencias entre T 2 y T 12 no resultaron significativas.

Se observó una disminución significativa en el porcentaje de células normales de la raza criolla cuando se le adicionó plasma seminal posdescongelado (Figura 16).



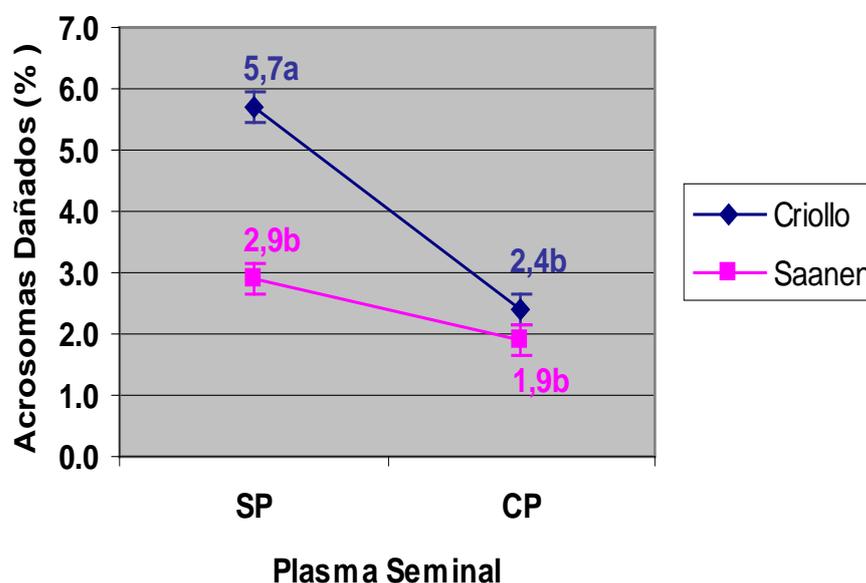
Nota: Valores con letras distintas difieren significativamente ($p < 0,05$); **SP:** sin plasma; **CP:** con plasma

Figura 16: Efecto del agregado de plasma seminal y de la raza sobre el porcentaje de espermatozoides normales luego del descongelado a tiempo 0 (media \pm e.e.).

- Acrosomas dañados (%)

El porcentaje de espermatozoides con acrosomas dañados se vio afectado por la interacción agregado posdescongelado de plasma seminal y por la raza ($p < 0,05$), no observándose efecto de ninguna variable simple.

Se observó una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado de la raza Criollo luego del agregado de plasma seminal a tiempo 0 (Figura 17).



Nota: Valores con letras distintas difieren significativamente ($p < 0,05$); **SP:** sin plasma; **CP:** con plasma

Figura 17: Efecto de la interacción agregado pos descongelado de plasma seminal y de la raza sobre el porcentaje de espermatozoides con acrosomas dañados a tiempo 0 (media \pm e.e.).

- Evaluaciones realizadas a Tiempo 2

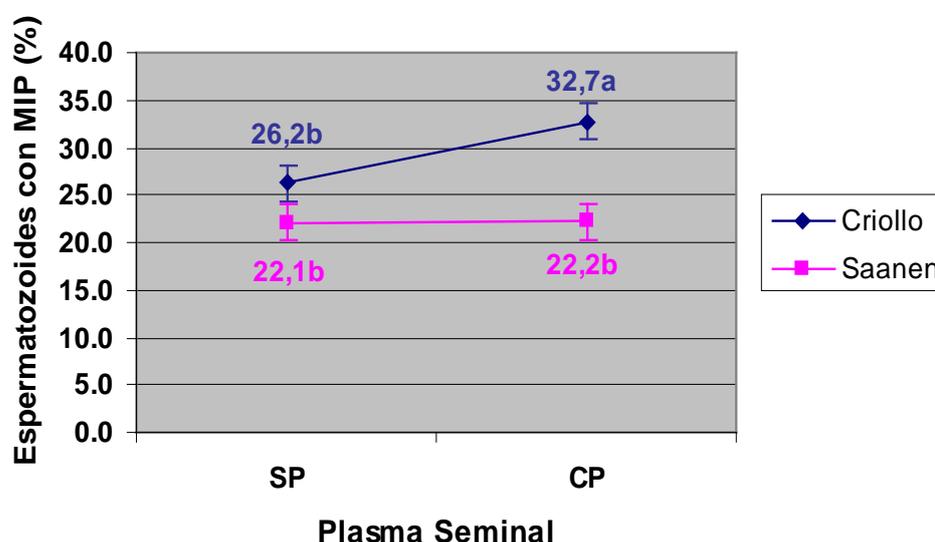
Transcurridas dos horas del descongelado y mantenidas las muestras en incubación a 37° C en baño maría, se realizaron las evaluaciones, obteniéndose los siguientes resultados:

- Motilidad Individual Progresiva

La motilidad individual progresiva a las dos horas de incubación fue afectada significativamente por la interacción de plasma seminal*raza ($p < 0,05$). No hubo efecto significativo de otras interacciones.

El agregado de plasma seminal aumentó significativamente ($p < 0,05$) la motilidad individual progresiva de espermatozoides de raza Criollo (Figura 18) luego de incubarlos a 37° C en baño de María.

El tratamiento con eliminación de plasma seminal y alta concentración de yema de huevo mostró mayor ($p < 0,05$) motilidad individual progresiva que la observada en los otros dos tratamientos que a su vez no fueron diferentes entre si ($42,2 \pm 1,8a$; $19,7 \pm 1,5b$ y $15,6 \pm 1,4b$ para T 12%, T 2% y Bioxcell, respectivamente).



Nota: Valores con letras distintas difieren significativamente ($p < 0,05$); **SP:** sin plasma; **CP:** con plasma

Figura 18: Efecto del agregado de plasma seminal y la raza sobre motilidad individual progresiva de espermatozoides congelados/descongelados de caprinos a tiempo 2 horas (media \pm e.e.).

- Vigor

Transcurridas dos horas de incubación en baño maría a 37° C, los efectos simples agregado de plasma seminal, raza y tratamiento mostraron efecto significativo ($p < 0,05$), no observándose efecto de interacciones (Tabla 16).

El vigor demostrado por los espermatozoides luego de dos horas de incubación en baño maría a 37° C mejoró ($p < 0,05$) con el agregado de plasma seminal frente a la ausencia de agregado del mismo (Tabla 16).

El vigor observado en la raza Criollo, luego de dos horas de incubación a 37° C en baño maría fue mayor ($p < 0,05$) al observado en la raza Saanen (Tabla 16).

En cambio en el tratamiento con eliminación de plasma seminal y alta concentración de yema de huevo el vigor observado fue superior ($p < 0,05$) al manifestado por los otros dos tratamientos, en tanto que el vigor observado en el tratamiento con bajo contenido de yema de huevo fue superior ($p < 0,05$) al observado en el tratamiento con lecitina vegetal (Tabla 16).

Tabla 16: Efecto del agregado de plasma seminal, la raza y los tratamientos sobre el vigor a tiempo 2 (media \pm e.e. en %).

Evaluación	Plasma		Raza		Tratamiento			Interacción
	Sin	Con	Criollo	Saanen	T 2	T12	T Bioxccl	
Vigor	1,2 \pm 0,1b	2,0 \pm 0,1a	1,9 \pm 0,1a	1,3 \pm 0,1b	1,4 \pm 0,1b	2,7 \pm 0,1a	0,0 \pm 0,1c	NS

Nota: abc: Valores con letras distintas difieren significativamente ($p < 0.05$); NS: no significativo

5.- DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó para evaluar el comportamiento de semen congelado con tres diluyentes conteniendo dos concentraciones de yema de huevo (2 y 12%) o su reemplazo por proteína de origen vegetal, el efecto de la eliminación del plasma seminal antes de la congelación y su posible interacción con la yema de huevo, el comportamiento frente al transcurso del tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido y el agregado de plasma seminal después de la descongelación.

En el **Experimento 1** se compararon diferentes diluyentes de congelación y diferentes tiempos de almacenamiento en nitrógeno líquido, evaluando para ello características “*in vitro*” del semen relacionadas con su capacidad fertilizante, inmediatamente de descongelado y luego de dos horas incubado a 37° C.

Como fue dicho anteriormente, el efecto de la raza en la producción espermática fue evaluado por diferentes autores en su variación estacional y los efectos de ésta sobre la calidad seminal (Perez; Mateos, 1996; Dickson-Urdaneta; Torres-Hernández; Becerril-Pérez, 2000; Karagiannidis; Varsakeli; Karatzas, 1999; Ahmad; Noakes, 1996) pero no fue evaluado hasta el presente en su respuesta a la criopreservación. En nuestro estudio, durante los primeros análisis realizados explorando el avance del trabajo, se evaluó esta característica mediante el procedimiento PROC-GLM de SAS encontrándose diferencias entre razas, que en esta primera etapa fue considerada tal cual. Sin embargo con la totalidad de los datos disponibles y habiendo determinado presencia de heterogeneidad de las varianzas, los datos fueron reanalizados utilizando el procedimiento PROC-MIXED del SAS. Al aplicar este procedimiento, las diferencias significativas entre razas no fueron observadas, aún cuando en varios de los parámetros estudiados, la raza Criollo parece ser menos afectada por el proceso de congelación. De acuerdo con esto, esta variable no fue considerada en los análisis posteriores de este experimento lo cual contribuyó a disminuir el error experimental al aumentar el n.

Efecto de los tratamientos sobre la motilidad individual progresiva evaluada al descongelado (Tiempo 0).

La primera evaluación que se realiza al semen congelado/descongelado antes de su utilización en IA es su Motilidad Individual Progresiva, la cual nos brinda un panorama general del resultado de la manipulación realizada al semen. La motilidad individual progresiva es la responsable de permitir a los espermatozoides recorrer la distancia que los separa del ovocito, y sobre todo, posibilita el acceso al ovocito a través de las capas que lo cubren posibilitando la fecundación.

En nuestro estudio fue posible determinar que la motilidad individual progresiva fue menos afectada cuando se utilizó una alta proporción de yema de huevo en el diluyente y el plasma seminal fue eliminado previamente por medio del “lavado” del eyaculado. Por el contrario, la motilidad individual progresiva fue deprimida en el tratamiento sin eliminación del plasma seminal aún cuando la proporción de yema de huevo en el medio de dilución fue significativamente disminuida con respecto al grupo anterior. Este comportamiento indicaría que la disminución en la proporción de yema de huevo en el diluyente, si bien reduciría los efectos negativos de su interacción con el plasma seminal, no los eliminaría totalmente. Por lo tanto, la presencia del plasma seminal sigue siendo un factor central a través de su interacción con la yema de huevo. Este último punto es ratificado por el efecto favorable observado en el tratamiento donde es separado el plasma seminal de los espermatozoides, previo a su dilución y congelado (Corteel *et al.*, 1974, 1975 y 1980; Ritar *et al.*, 1982; Memon *et al.*, 1985).

La respuesta deprimida en el grupo con baja proporción de yema de huevo en presencia de plasma seminal también pudo deberse a que la cantidad de yema de huevo disponible en el diluyente no fue la suficiente para proteger adecuadamente a los espermatozoides durante el proceso de congelado. Si bien Ritar *et al.* (1982) determinaron que una concentración mínima de yema de huevo del orden de 1,5% era suficiente para proteger a los espermatozoides, Cabrera *et al.* (2005) observaron que concentraciones mayores de yema de huevo mostraron una clara mejora de la motilidad espermática después de la congelación respecto de la concentración mínima antes mencionada.

De esta manera quedaría por dilucidar si lo observado en nuestro trabajo en el grupo con baja yema de huevo y presencia de plasma seminal es producto de la interacción yema de huevo-plasma seminal (a pesar de la menor presencia de yema de huevo en el diluyente) o tal vez sea debido, precisamente, a una excesiva disminución de un agente crioprotector reconocido como lo es la yema de huevo. También podría ocurrir que en el trabajo de Cabrera *et al.* (2005) existiese una composición diferencial del plasma seminal de la raza por ellos utilizada y esto generase una respuesta del tipo de la antes mencionada. Aunque en este experimento no se puso en evidencia el efecto de las razas en estudio, esto no implica que este efecto no se manifieste en otras razas.

Finalmente, y para concluir con este punto, es posible que sea necesario establecer un delicado equilibrio entre el factor protector (cuya proporción puede ser variada) y el plasma seminal para lograr una adecuada protección seminal con un mínimo efecto nocivo. Sin embargo, determinar este equilibrio en un estudio específico es insuficiente para establecer normas al respecto ya que la proporción de plasma seminal varía entre eyaculados, entre épocas, entre razas, etc. De la misma manera, la propia composición del plasma seminal puede variar entre épocas, como fuera observado tanto en caprinos (La Falci *et al.*, 2002) como en ovinos (Dominguez *et al.*, 2008).

Con respecto al empleo de componentes de origen animal en la formulación de diluyentes para congelación de semen, además de la mencionada interacción, se deben mencionar los problemas derivados de las variaciones en la composición que sufren estos componentes y más grave aún, los riesgos de bioseguridad que su empleo implica, debido a la posible contaminación con agentes patógenos (bacterias, micoplasmas y virus) (Bousseau, *et al.* 1998; Müller-Schlösser, 2005). Esto último tiene particular importancia cuando se utiliza un diluyente para semen destinado a su comercio internacional.

Por esta razón es que desde hace algunos años se han desarrollado diluyentes (que ya se encuentran en fase comercial para algunas especies), que tienen como constituyente principal a la lecitina de soja y que carecen de proteínas de origen animal en su formulación. Estos diluyentes que han sido particularmente desarrollados para la conservación de semen de bovino, han comenzado a probarse en otras especies como Cervidos (Ciervo Colorado y Gamo: Zomborszky *et al.*, 2005), equinos

(Aurich *et al.*, 2007), ovinos (Gil *et al.*, 2003 a y b), caninos (Nöthling *et al.*, 2007) y caprinos (Jannett *et al.*, 2005, Paulenz *et al.*, 2005 y Bittencourt *et al.*, 2006).

De esta manera, alguno de los estudios llevados a cabo en nuestro trabajo, no tienen precedentes en la bibliografía consultada, por lo que se intentará explicar lo aquí observado utilizando la información aportada por los estudios mencionados, en los que se utilizó este diluyente y en caprinos. Los resultados de la motilidad individual progresiva observados en nuestro estudio para el tratamiento con lecitina de soja, fueron los más bajos observados en los tratamientos comparados. Un comportamiento similar fue observado por Paulenz *et al.* (2005) en semen caprino refrigerado a dos temperaturas (5 y 20° C) al comparar un diluyente con lecitina de soja con dos medios conteniendo leche descremada, uno comercial y otro no comercial. Algunas de las interpretaciones que podrían darse a este comportamiento del medio con lecitina vegetal podrían ser:

- En el trabajo mencionado (Paulenz *et al.*, 2005), el medio con lecitina vegetal es el único que contiene glicerol. Es conocido que el glicerol suele tener efectos tóxicos sobre los espermatozoides y particularmente cuando el mismo es adicionado a los medios a temperaturas > a 30° C (Colas, 1975). Esto podría ocurrir a pesar que el semen caprino parecería poseer una mayor capacidad para resistir altas concentraciones de glicerol en los medios de dilución (Deka *et al.*, 1986) a diferencia de lo observado en otras especies.

- Otra causa que podría explicar este comportamiento es que las enzimas presentes en el plasma seminal reaccionasen de igual manera con la lecitina vegetal (Paulenz *et al.*, 2005) como lo hacen con la lecitina de la yema de huevo (Corteel, 1975).

- Por último, las enzimas presentes en el plasma seminal (Enzima coagulante de la yema de huevo-EYCE- o Fracción glicoproteica del plasma seminal -BUSgp60-), al igual que muchas enzimas, presentan mayor actividad biológica a mayor temperatura (Ritar *et al.*, 82; Paulenz *et al.*, 2005). Por lo tanto, serían adecuadas las diferencias de comportamiento observadas a las dos temperaturas de refrigeración (Paulenz *et al.*, 2005) o las observadas en nuestro trabajo, donde la

lecitina vegetal fue agregada al semen previo a su enfriamiento. Si hubo reacción con la lecitina vegetal a estas temperaturas, la acción enzimática estaría maximizada.

Efecto del tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido sobre la motilidad individual progresiva evaluada al descongelado (Tiempo 0)

Como fuera descrito por otros autores (Corteel, 1975; Ritar; Salamon, 1991; Ritar, 1993; Ferrari *et al.*, 1998; Lebouef *et al.*, 2000) en el presente estudio se observó una paulatina pérdida de motilidad individual progresiva a partir del momento de congelado y hasta los 6 meses de almacenamiento en nitrógeno líquido (tiempo de duración del presente estudio), independientemente del medio de dilución utilizado y del tratamiento recibido por el semen. Esta observación, difiere de lo mencionado por Cabrera *et al.* (2005), quienes no observaron ninguna pérdida en la motilidad del semen caprino congelado y almacenado durante un período similar.

Esta pérdida de la motilidad individual progresiva es un comportamiento informado con frecuencia en el caprino (Corteel, 1975; Ritar; Salamon, 1991; Ritar, 1993 y Ferrari *et al.*, 1998), y tal vez no debería ser exclusivamente atribuida a la presencia de componentes particulares del plasma seminal (Enzima coagulante de la yema de huevo-EYCE- o Fracción glicoproteica del plasma seminal -BUSgp60-; Corteel, 1975) ya que lo mismo ha sido observado en muestras congeladas con o sin plasma seminal (Ritar; Salamon, 1991).

En nuestro estudio ocurrió algo parecido ya que hubo al menos un tratamiento en el que la congelación se hizo sin plasma seminal (eliminación del plasma seminal) y el comportamiento de este tratamiento en particular fue el mismo que el manifestado en los tratamientos con plasma seminal. Subsiste entonces dilucidar, si lo observado en nuestro experimento se debería a causas propias del congelamiento (estabilización del material biológico congelado) o podría deberse a procesos que son detenidos por la congelación y reiniciados al descongelado, haciéndose estos más evidentes cuanto mayor es el tiempo transcurrido desde la congelación del material. Esta última presunción supondría pensar que persiste mínima actividad biológica a la temperatura de congelación (- 196° C), algo hasta el momento no demostrado.

A pesar de esta pérdida de la motilidad individual progresiva, la fertilidad del semen de caprino congelado/descongelado no se vería afectada por el tiempo de conservación. Esto ha sido observado utilizando diferentes medios de dilución (Citrato de sodio-Glucosa-Glicerol-Yema de huevo, Waide *et al.*, 1977; Tris-Fructosa-Citrato-Yema de huevo, Fougner *et al.*, 1979, ambos mencionados por Lebouef *et al.*, 2000 o Tris-Citrato-1,5% yema de huevo, Ferrari *et al.*, 1998), diferentes vías de la inseminación (laparoscópica, Waide *et al.*, 1977; intrauterina Trans-cervical, Fougner *et al.*, 1979; ambos mencionados por Lebouef *et al.*, 2000 o vía cervical: Ferrari *et al.*, 1998) y a diferente tiempo transcurrido entre el congelado y la inseminación (12 a 36 meses: Fougner *et al.*, 1979; 32 meses, Waide *et al.*, 1977, ambos mencionados por Lebouef *et al.*, 2000 o 48 meses, Ferrari *et al.*, 1998).

Efecto de los tratamientos y del tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido sobre el Vigor evaluado al descongelado (Tiempo 0)

En la evaluación de un semen previo a su uso, el vigor de los espermatozoides es un complemento de la motilidad, y proporciona una idea de la “fuerza o vitalidad” con que los espermatozoides móviles realizan su desplazamiento dentro del campo óptico donde se lleva a cabo la valoración. Posee importancia en el proceso de transporte espermático y la fertilización.

El vigor espermático obtenido en nuestro estudio se vio afectado por la interacción de los tratamientos y el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido. La eliminación del plasma seminal y el uso de altas concentraciones de yema de huevo en el medio de dilución permitieron obtener el mejor vigor después del descongelado del semen. Además, el vigor manifestado por los espermatozoides en este tratamiento tuvo un comportamiento estable, independientemente del tiempo transcurrido desde el congelado. Este comportamiento ya fue observado por otros autores (Corteel, 1975; Ritar; Salamon, 1991; Ritar, 1993; Ferrari *et al.*, 1998) y en conjunto pone en evidencia que la pérdida de vigor observada en los diluyentes con plasma seminal (el de bajo contenido de yema de huevo o el de lecitina vegetal) durante el mismo tiempo de evaluación, afirmarían el papel central que juega la presencia del plasma seminal en su interacción con la yema de huevo (Corteel, 1975) y/o talvez con la lecitina vegetal (Paulenz *et al.*, 2005) sobre este parámetro.

A pesar de lo anteriormente mencionado, es posible observar que el vigor tuvo un comportamiento muy relacionado con la motilidad individual progresiva, ya que cuando esta fue alta, su vigor también fue importante y por el contrario, a una motilidad individual progresiva más baja, el vigor también fue menor.

Efecto de los tratamientos y del tiempo de incubación a 37° C sobre la motilidad individual progresiva y el vigor evaluados luego de dos horas de cultivo (Tiempo 2)

Cuando los espermatozoides son descongelados y puestos en cultivo durante determinado período, ocurren cambios en el medio de cultivo ya que espermatozoides vivos y muertos comparten el mismo ambiente de incubación. Los espermatozoides muertos liberan sustancias con efecto claramente tóxico para los espermatozoides vivos (Shannon; Curson, 1971) conocidas como especies oxígeno reactivas o ROS. Entre ellas encontramos superóxidos, radicales oxidrilo y el peróxido de hidrógeno (Del-Maestro, 1980), la presencia de éstas ha sido estudiada en bovinos (Shannon and Curson, 1982) y ovinos (Upreti *et al.* 1997). Tanto espermatozoides vivos como muertos y en proceso de degeneración, sedimentan en el fondo del tubo, región que presenta la más alta concentración de estos productos tóxicos, que disminuyen el pH del medio y provocan peroxidación de lípidos (Salvador *et al.*, 2006).

Por estas razones esta valoración se encuentra cuestionada, ya que el ambiente del aparato reproductor femenino es absolutamente diferente, debido entre otras cosas a los movimientos ciliares y a la reabsorción realizada por el epitelio celular. A pesar de esto se llevó a cabo esta valoración, con la idea que los espermatozoides menos afectados por la criopreservación también serían capaces de soportar estas condiciones modificadas y que el mejor comportamiento observado se potenciaría en el medio interno del animal.

Luego de transcurridas dos horas de conservación a 37° C, las tendencias de la motilidad individual progresiva observadas entre los tratamientos a tiempo 0 se mantuvieron, siendo el semen menos afectado el diluído con una alta proporción de yema de huevo y la eliminación previa del plasma seminal por medio del lavado. Los comentarios que es posible realizar sobre este aspecto son similares a los ya

mencionados en la determinación de la motilidad individual progresiva al descongelado. Esto también indicaría que durante el período de cultivo, en el medio con bajas proporciones de yema de huevo pero en presencia de plasma seminal, la interacción entre ambos se sigue produciendo a pesar de la baja proporción de yema de huevo.

Como se planteó en varias ocasiones durante esta discusión, es escasa la información encontrada en donde se hayan realizado evaluaciones de diluyente con lecitina vegetal, en particular en caprinos. La motilidad individual progresiva observada en este medio de dilución después de dos horas de cultivo, es la más baja de los tratamientos comparados. Contrariamente, en bovino, la motilidad individual progresiva medida por medio de sistemas computarizados (Sistema Analizador de Motilidad Celular -CMA, Medical Technologies Montreux SA, Clarens/Montreux, Switzerland- o Sistema de Analisis de la Motilidad Espermática Asistido por Computadora -CASA, SM-CMA, Strömberg-Mika, Bad Fielnbach, Germany-) en diluyentes con lecitina vegetal luego de dos horas de conservación a 37° C, se comportó mejor que el tratamiento con yema de huevo (Hinsch et al., 1997; Aires et al., 2003) y en el ovino, esta diferencia se mantuvo aún cuando el periodo de incubación se amplió a seis horas (Gil et al., 2000).

Se debe señalar que en estas dos especies no ha sido descrita interacción entre el plasma seminal y alguno de los constituyentes utilizados en la formulación de diluyentes seminales. Quedaría entonces por dilucidar si este efecto es debido a una acción diferencial entre especies o si es necesario corregir la composición de la formulación del diluyente con lecitina de soja en el caprino a fin de lograr una correcta protección de los espermatozoides, efecto logrado con esta formulación en el bovino.

Todo lo mencionado para la motilidad individual progresiva puede ser repetido en los mismos términos para el **vigor** ya que, observado después de dos horas de incubación a 37° C, el tratamiento con lavado previo y alto contenido de yema de huevo fue el de mayor vigor con respecto a los otros dos diluyentes.

Efecto de los tratamientos sobre la funcionalidad de la membrana plasmática evaluada al descongelado (Tiempo 0)

La **funcionalidad de la membrana plasmática** (test hipoosmótico) es fundamentalmente importante para el proceso de fecundación y en varios de los procesos que la preceden o que forman parte de la misma, como son la capacitación, la reacción acrosómica y la adhesión del espermatozoide a la superficie del ovocito (Jeyendran *et al.*, 1984; Garcia Artiga, 1994).

Uno de los objetivos del agregado de distintas proporciones de yema de huevo o de lecitina de soja a los medios de dilución espermática, es brindar protección a las membranas celulares durante el shock térmico que tiene lugar durante el transcurso del congelado-descongelado (Salisbury; VanDemark, 1964; Holt *et al.*, 1994). Los resultados observados en nuestro estudio respecto de la funcionalidad de la membrana se encuentran en concordancia con lo observado al evaluar la motilidad individual progresiva y el vigor, en donde los espermatozoides conservados en el medio con eliminación de plasma seminal y alto contenido de yema de huevo presentaron un porcentaje más elevado de espermatozoides con la membrana plasmática funcional que aquellos congelados en presencia de plasma seminal.

La falta de diferencia entre los espermatozoides criopreservados en lecitina vegetal o con bajo contenido de yema de huevo (ambos conteniendo plasma seminal) podrían deberse a que:

- En el caso del uso de la lecitina vegetal, tanto la enzima coagulante de la yema de huevo (EYCE) como la fracción glicoproteica del plasma seminal (BUSgp60), presentes en el plasma seminal, reaccionarían con la lecitina de soja (Paulenz *et al.*, 2005) de la misma manera que lo hacen con la lecitina de la yema de huevo (Corteel, 1975),

- En ambos casos, el efecto crioprotector de ambos tipos de lecitinas (tal vez por haberse utilizado en concentraciones muy bajas) haya sido insuficiente para proteger las membranas de los espermatozoides.

Resultados similares fueron observadas por Bittencourt *et al.* (2005) al evaluar semen caprino congelado, efecto que no fue observado en semen caprino refrigerado (Salvador *et al.*, 2006).

No se hallaron antecedentes bibliográficos donde se evaluara la funcionalidad de la membrana de espermatozoides posdescongelado cuando la congelación se hizo en medio de dilución conteniendo lecitina vegetal en caprinos. En cambio existen reportes en bovinos, especie donde no ha sido descrita la interacción del plasma seminal con la yema de huevo, por lo que en semen de toro la concentración de yema de huevo utilizada corrientemente en diluyentes de congelación es del orden del 20%.

En esta especie, sin embargo, cuando se comparó la funcionalidad de la membrana de espermatozoides congelados en diluyentes con lecitina de soja o con Tris-citrato-yema de huevo se observaron comportamientos contradictorios. Por un lado hay autores que no observaron diferencias con el uso de ambos diluyentes (Thun *et al.*, 2002) pero otros encontraron un mayor porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática funcional cuando el medio utilizado contenía lecitina vegetal (Gil *et al.*, 2000). Nuestro trabajo no concuerda con ninguno de estos resultados ya que el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional cuando se utilizó lecitina de soja en el diluyente, fue menor respecto del tratamiento en que se eliminó el plasma seminal y tuvo alto contenido de yema de huevo.

Por lo tanto y a manera de resumen, podríamos decir que las diferencias puestas de manifiesto por la prueba la funcionalidad de la membrana de espermatozoides congelados entre los tratamientos comparados en el presente estudio, podrían ser tomados como un reflejo del grado de protección brindado por los diferentes diluyentes a las membranas plasmáticas de los espermatozoides durante el proceso de congelado.

Efecto de los diluyentes sobre el porcentaje de espermatozoides vivos evaluado al descongelado (Tiempo 0)

La evaluación del **porcentaje de espermatozoides vivos** luego del descongelado, utilizando la coloración vital de eosina-nigrosina, brinda una idea de la cantidad de espermatozoides que resistieron el proceso de congelado-descongelado.

En el presente estudio, el porcentaje de espermatozoides vivos observados inmediatamente después del descongelado fue superior en los diluyentes con lecitina vegetal y en el de alto contenido de yema de huevo pero sin plasma seminal, en relación con el diluyente con plasma seminal y bajas proporciones de yema de huevo.

La aparente contradicción que existe en el semen diluido con lecitina vegetal entre el alto porcentaje de espermatozoides vivos y los bajos porcentajes observados en la motilidad individual progresiva y el vigor podría ser explicada por diferentes razones:

- la lecitina vegetal podría presentar una forma diferente de interactuar con los dominios de la membrana plasmática de la cabeza y el dominio de membrana del flagelo del espermatozoide, esta forma diferente de interacción podría modificar la capacidad de entrada del colorante y otros metabolitos, lo que en consecuencia podría modificar la expresión de la motilidad,
- de ser corroborado el supuesto anterior, sería posible que haya mayor cantidad de espermatozoides vivos pero sin movilidad en el diluyente con lecitina.

Este comportamiento permite preguntarnos si con este tratamiento sería posible obtener aceptables porcentajes de preñez si lo utilizáramos para inseminación artificial cervical. No obstante es sabido que la motilidad espermática es un componente central en el traslado de los espermatozoides desde el sitio donde son depositados (por coito o inseminación artificial) al sitio de fertilización así como para la penetración del ovocito (Scott, 2000). Por lo cual, podría esperarse que la fertilidad en sistemas normales (servicio natural o inseminación artificial) fuese superior en el semen congelado en el medio que permite mayor motilidad.

En caprinos, no se encontraron antecedentes respecto a la evaluación posdescongelado del porcentaje de espermatozoides vivos de semen diluido en medio conteniendo lecitina vegetal. Sin embargo, un comportamiento similar al encontrado en nuestro trabajo fue observado en bovinos utilizando coloración vital de tripan blue (Hinsch *et al.*, 1997). Brito *et al.* (2003), no observaron diferencias entre las tinciones vitales tripan blue y eosina-nigrosina en espermatozoides bovinos. Esto nos permitiría hipotetizar que lo descrito en bovinos se manifestaría de forma similar con semen caprino.

Por lo tanto, lo obtenido en nuestro trabajo, admitiría entonces suponer que el medio con lecitina vegetal provee igual protección a la membrana plasmática de la cabeza de los espermatozoides caprinos durante el proceso de congelado-descongelado que el medio sin plasma seminal y alto contenido de yema de huevo. Sin embargo, a pesar de haber una sobrevida similar en ambos casos, la motilidad individual progresiva se ve severamente afectada en el primero de los dos. Esto no sería nada extraño conociendo que ambos procesos tienen mecanismos totalmente diferentes e indicaría que es fundamental la suma de parámetros de importancia, en el momento de realizar un diagnóstico de calidad seminal.

Con respecto a las diferencias observadas entre los medios con yema de huevo, la información obtenida, mayor cantidad de espermatozoides vivos observados en el medio con alto contenido de yema de huevo y sin plasma seminal, resalta la importancia que este componente tiene en la sobrevida de espermatozoides. Por el contrario, cuando el contenido de yema de huevo fue bajo pero se mantuvo el plasma seminal en el medio, la sobrevida fue menor.

El comportamiento observado en el tratamiento sin plasma seminal reafirma nuevamente la necesidad de eliminar el plasma seminal en esta especie antes de hacer la dilución, a fin de evitar su interacción con la yema de huevo y posibilitar una mejor acción protectora de ésta sobre los espermatozoides (Corteel, 1974, 1975, y 1980; Ritar *et al.*, 1982; Memon *et al.*, 1985).

La menor sobrevida de espermatozoides congelados en diluyente con bajo contenido de yema de huevo, si bien disminuiría los efectos negativos de su interacción con el plasma seminal y evitaría el lavado por centrifugación del eyaculado, como fuera postulado por Ritar *et al.* (1982, 1991 y 1993), su cantidad no sería suficiente para brindar una protección adecuada a los espermatozoides aumentando su mortalidad.

Efecto de los tratamientos y del tiempo de conservación en nitrógeno líquido sobre las anomalías espermáticas evaluadas al descongelado (Tiempo 0).

El **porcentaje de anomalías espermáticas** ha mostrado, en estudios realizados en bovinos, estar relacionado con las tasas de concepción y de no retorno (Phillips *et al.*, 2004). La correlación entre espermatozoides normales y fertilidad posterior a una inseminación artificial varía ampliamente (desde $r = 0,06$ a $0,86$ Graham *et al.*, 1980, mencionado por Rodríguez-Martínez, 2003), pudiendo deberse esta variación a la calidad del semen utilizado (cantidad de vivos y muertos, motilidad individual progresiva) (Kuster *et al.*, 2004), al tipo de anomalías observadas (Barth, 1989; Barth *et al.*, 1992; Ostermeier *et al.*, 2001) o a la metodología utilizada para su determinación (Kuster *et al.*, 2004).

En bovinos, es recomendable que el semen tenga niveles superiores al 70% de espermatozoides normales para obtener óptimos valores de fertilidad luego de una inseminación artificial (Barth; Oko, 1989).

En el presente estudio, el porcentaje de espermatozoides normales se encontró afectado por la interacción entre los tratamientos y el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido. Esta interacción nos permitió observar que el diluyente con lecitina vegetal, no modificó la tasa de espermatozoides normales a lo largo de las evaluaciones. Por el contrario ambos tratamientos con yema de huevo, presentaron una tendencia a disminuir la proporción de espermatozoides normales a través de los meses poscongelado.

Con respecto a la tendencia a perder características cualitativas (motilidad, vigor o proporción de espermatozoides vivos) a través del tiempo de conservación en nitrógeno líquido, ya fue observada (Corteel, 1975; Ritar; Salamon, S., 1991; Ferrari *et al.*, 1998). Sin embargo, en machos caprinos de raza Canaria, esta tendencia a perder características cualitativas en el tiempo durante el cual los espermatozoides permanecieron congelados, no ha sido observada (Cabrera *et al.*, 2005).

Respecto a variaciones en la tasa de espermatozoides anormales en el tiempo durante el cual los espermatozoides permanecieron congelados, la bibliografía consultada no presenta información y particularmente con lo ocurrido con el

tratamiento con lecitina de soja, los trabajos consultados no han evaluado esta determinación. Por lo tanto, lo observado en el presente estudio plantea la necesidad de esclarecer si este comportamiento se debería a las cualidades de estos componentes del medio de dilución o a la metodología utilizada para realizar la evaluación de esta determinación (Kuster *et al.*, 2004).

Por otro lado, los porcentajes de espermatozoides normales observados en todos los tratamientos evaluados a tiempo 0 durante los meses en que se realizaron las observaciones, se encontraron por encima del 80%, porcentajes al menos 10 puntos porcentuales por encima del considerado como tolerable para semen congelado de bovino (Barth; Oko, 1989). Si bien esta información no existe para el caprino, si la misma fuese extrapolable entre estas especies, sería esperable obtener porcentajes de fertilidad dentro de lo aceptable para la inseminación artificial cervical con el semen congelado en cualquiera de los diluyentes probados o que la fertilidad obtenida por los tratamientos evaluados no fuera afectada por esta determinación.

Efecto de los tratamientos sobre la integridad del acrosoma evaluado al descongelado (Tiempo 0)

La **integridad del acrosoma** es fundamental para que el espermatozoide pueda atravesar las barreras físicas que lo separan del ovocito y producir la fecundación. Por lo tanto, es muy importante que los medios de dilución protejan adecuadamente esta estructura. El presente estudio permitió determinar que el mayor porcentaje de acrosomas intactos se observó en el tratamiento con lecitina vegetal con respecto a los observados en los tratamientos con yema de huevo lo que es coincidente con la determinación descrita previo a esta. Este comportamiento demostrado por el medio con lecitina vegetal también fue observado con semen caprino refrigerado a 5° C, no ocurriendo lo mismo cuando la temperatura de refrigeración fue de 20° C, donde este tratamiento produjo los menores resultados de los tratamientos evaluados (Paulenz *et al.* 2005). Este comportamiento podría deberse a que las enzimas presentes en el plasma seminal (Enzima coagulante de la yema de huevo-EYCE- y Fracción glicoproteica del plasma seminal-BUSgp60-) poseen mayor actividad a mayor temperatura. Por su parte en bovinos, Aires *et al.* (2003) utilizando una técnica de coloración más compleja (FITC-PSA, L0770, Sigma) al comparar el medio de dilución

con lecitina vegetal con otro con yema de huevo, no observaron diferencias entre ambos. Estos resultados obtenidos confirmarían que el medio con lecitina vegetal, podría brindar una mejor protección a los acrosomas de espermatozoides conservados en él cuando se bajan las temperaturas. También reforzaría la hipótesis que el medio con lecitina vegetal presentaría un nivel de protección o interactúa de manera diferente con los dominios de la membrana plasmática de la cabeza que sobre el dominio de membrana del flagelo del espermatozoide.

En cambio, los tratamientos con yema de huevo mostraron mayores porcentajes de acrosomas dañados, no diferenciándose entre sí. Estos resultados no coincidirían con lo observado en trabajos anteriores donde encontraron diferencias entre medios con yema de huevo (Cabrera *et al.*, 2005; Memon *et al.*, 1985), siendo mayor cantidad de espermatozoides con el acrosoma intacto en el tratamiento con lavado y alto contenido de yema de huevo que la cantidad observada en el tratamiento con bajo contenido de yema de huevo, con o sin plasma seminal.

Por su parte, Memon *et al.* (1985) observaron que la congelación realizada en semen sin plasma seminal y medio con alto contenido de yema de huevo permitió una mayor preservación de acrosomas que el semen conservado en presencia de plasma seminal, en un medio con alto contenido de yema de huevo.

De todas maneras y a pesar de las diferencias entre tratamientos observadas en nuestro estudio, la proporción de espermatozoides con el acrosoma dañado fue extremadamente baja (nunca superó el 2,5%) comparada con la descrita en la bibliografía consultada. Esto indicaría que los medios de dilución utilizados permitieron una adecuada protección de la integridad de los acrosomas durante el proceso de congelado-descongelado.

Efecto del tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido sobre la funcionalidad de la membrana plasmática (test hipoosmótico), el porcentaje de espermatozoides vivos y la integridad del acrosoma (evaluaciones realizadas al momento del descongelado)

No se encontró en la bibliografía consultada trabajos donde se evaluara la **funcionalidad de la membrana plasmática** (test hipoosmótico) y el **porcentaje de acrosomas dañados** a lo largo del tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido desde el momento de congelado.

El conjunto de resultados obtenidos en las variables **espermatozoide vivos**, **espermatozoides normales**, **acrosomas dañados** y **test hipoosmótico** permiten suponer que las membranas plasmáticas se verían menos afectadas por las condiciones que le brindan los diluyentes en el transcurso del tiempo de congelado que, aparentemente, las variables relacionadas con la movilidad espermática.

Cuando se comparan estos resultados con los obtenidos en la **motilidad individual progresiva** y el **vigor**, se ve que los tratamientos y el tiempo de almacenamiento afectaron a ambas. Cabría entonces preguntarse si es física o biológicamente posible que estructuras como las membranas de las mitocondrias, las propias mitocondrias o estructuras del sistema microtubular de la cola del espermatozoide que son de vital importancia para el movimiento del espermatozoide y evaluadas a través de la motilidad individual progresiva y el vigor, se vieran más afectadas que las membrana plasmáticas del espermatozoide, tanto por el proceso de congelado como por el transcurso del tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido.

Esto podría tener su explicación en que los daños ocurridos en los espermatozoides durante el proceso de dilución-descenso térmico-estabilización-congelado-descongelado (Quinn *et al.*, 1969 y 1980; García Artiga, 1994; Amirat *et al.*, 2005) son conservados por la temperatura de congelación, sin magnificarlos a pesar del transcurso del tiempo entre la congelación y los distintos momentos en los que se repitieron las evaluaciones durante este trabajo.

Por otro lado, si las condiciones en las que se produce el descongelado son muy diferentes, éstas se manifiestan en el semen descongelado (Holt *et al.*, 1994). La falta

de alteraciones observadas en las variables **espermatozoides vivos**, **espermatozoides normales**, **acrosomas dañados** y **test hipoosmótico** permiten suponer que las condiciones brindadas al semen durante el descongelado en los distintos momentos en los que se produjeron las evaluaciones fueron muy similares, haciendo mínimas las diferencias en el tiempo.

En base a estos resultados y a la similar composición de las “lecitinas” de soja y de yema de huevo (Anexo N° 3), sumado a que sólo en el caprino se ha registrado interacción de componentes del plasma seminal con la yema de huevo, hecho no reconocido en bovinos y ovinos, es que podríamos especular que la Fosfolipasa A₂ (Anexo N° 3) presente en el plasma seminal de macho caprino no distinguiría el origen de las lecitinas al momento de hidrolizar los glicerofosfolípidos que las componen a ambas. Refuerza esta conjetura, algunas de las características comunes a todas Fosfolipasas A₂ como son la gran homología estructural entre todas ellas y su selectividad catalítica (Valdez Rodriguez *et al.*, 2002).

En el **Experimento 2** se realizó una prueba de la capacidad fertilizante de los espermatozoides sometidos a los diferentes tratamientos realizando una inseminación artificial vía cervical a cabras con la finalidad de determinar si los diluyentes utilizados eran capaces de condicionar fertilidades diferentes. En este estudio se incluyó un grupo inseminado con semen fresco que sirvió de control del factor hembra y del protocolo de sincronización.

Los resultados obtenidos fueron en buena medida bien relacionados con los obtenidos en el experimento 1 ya que el grupo de cabras inseminadas con semen congelado/descongelado diluido en medio con alta proporción de yema de huevo en ausencia de plasma seminal presentó los mayores niveles de fertilidad los que a su vez fueron similares a los obtenidos con el semen fresco. Los porcentajes en estos dos grupos fueron significativamente superiores a los obtenidos en cabras inseminadas con semen diluido con lecitina de soja. El grupo en que el semen se congeló en diluyente con bajos niveles de yema de huevo con plasma seminal, presentó valores intermedios que no difirieron de ninguno de los de los otros grupos.

En nuestro estudio, los resultados de preñez logrados después de una doble inseminación a tiempo fijo a las 48 y 54 hs de retirado el tratamiento de sincronización de celos y utilizando una dosis 50 millones de espermatozoides (en el caso del semen congelado) en cada oportunidad, estuvieron próximos al 30% en los tratamientos conteniendo yema de huevo y en el Control. Estos resultados fueron similares a los observados en otras razas y condiciones (Raza Cachemira: 28,9% Ritar; Ball, 1993; Raza Angora y Cachemira: 34,7 y 34,3 % respectivamente Ritar, 1993; Raza Anglo Nubian y Saanen: 31,2%, Ferrari *et al.*, 1998), e inferiores a los obtenidos en otros casos (Raza Florida: 47,6%, Dorado *et al.*, 2007; Raza Angora: 46,7% Ritar; Salamon, 1983).

En nuestro trabajo, uno de los factores determinantes de estos resultados muy probablemente lo constituya el número de espermatozoides utilizados, ya que en estudios en los que se utilizaron dosis de 200 millones de espermatozoides, los niveles de fertilidad superaron ampliamente a los antes mencionados y a los obtenidos en nuestro caso (Raza Angora y Cachemira: 53,3 y 50,5 % respectivamente, Ritar, 1993; Raza Jamunapari: 80,7% de cabras inseminadas parieron, Chauhan; Anand, 1990). Sin embargo, también existen estudios con esta alta dosis inseminante en que los resultados obtenidos son similares a los obtenidos en nuestro estudio (Raza Cachemira: 38,0% Ritar; Ball, 1993; Raza Angora: 40%, Gibbons, 2002) con una cantidad de espermatozoides de la mitad que en esos casos.

Es evidente que es imposible la comparación estricta entre trabajos ya que además de la dosis inseminante utilizada, también existieron diferencias en los sistemas de criopreservación utilizados, las razas, las condiciones ambientales, el estado de los animales, etc.

Como fuera dicho en el experimento 1, los estudios "*in vitro*" realizados mostraron la superioridad del diluyente con alto contenido de yema de huevo pero sin plasma seminal con respecto a los otros dos evaluados, en aspectos muy relacionados con la aptitud fertilizante del semen tales como la motilidad individual progresiva y el vigor como así también en el estudio de lesión de membranas (test hipoosmótico). A pesar que numerosos autores cuestionan la correspondencia entre las evaluaciones seminales "*in vitro*" y su fertilidad "*in vivo*" (Amann; Hammerstedt, 1993; Berger *et al.*, 1994; Rodríguez-Martines, 2003; Rodríguez-Martinez y Barth, 2007), sin embargo en

nuestro estudio, los resultados obtenidos en ambos sistemas se correspondieron de manera bastante fiel. Basta comparar el tratamiento con lecitina de soja, donde los valores observados “*in vitro*” con respecto a los otros tratamientos fueron muy inferiores como también lo fue la fertilidad lograda después de su uso en inseminación artificial vía cervical.

Con respecto a este último tratamiento, no existen antecedentes en la bibliografía respecto a la evaluación de su fertilidad en caprinos, existiendo escasos estudios realizados en ovinos y en bovinos. En éstos, los niveles de fertilidad observados fueron muy superiores a los obtenidos en nuestro estudio para el medio con lecitina de soja (Ovinos: 21 o 30%, Gil *et al.*, 2003; en Bovinos: 67,6 o 64,5%, Nehring; Rothe, 2003), donde además la cantidad de espermatozoides utilizados para inseminar estuvo también en niveles superiores (al menos el doble).

Cuando comparamos los resultados obtenidos con semen fresco y los obtenidos por los tratamientos con yema de huevo con y sin plasma seminal, se observó que no hubo diferencias. Sin embargo las tasas de preñez con semen fresco fueron inferiores a las citadas después de una inseminación (73,9 %: Lorenzo *et al.*, 1997; 74,2%: Greyling *et al.*, 2000; 52%: Motlomelo *et al.*, 2002; 63,6%: Romano *et al.*, 2004; 53 %: Lehloenya *et al.*, 2005).

Con respecto al primer punto, las razones de la baja fertilidad con semen fresco pueden haberse debido a varios factores:

- El estudio de fertilidad fue realizado en un establecimiento privado en el cual las condiciones experimentales no estaban totalmente controladas,
- El estado corporal de las cabras utilizadas en el tratamiento era regular y este factor puede incidir de forma marcada en los resultados (Gonzales de Bulnes *et al.*, 1999; Cueto *et al.*, 2000; Kusinas *et al.*; 2001),
- Se trataba de cabras en ordeño lo cual también, según los niveles de producción, puede ser un factor determinante del nivel de preñez obtenido (Gonzales *et al.*, 1990),

- Parte de las cabras utilizadas en el presente estudio recibieron tratamientos de inducción y sincronización del celo con utilización de eCG durante los años precedentes. Como el establecimiento no posee registros de estos tratamientos, esto impidió individualizar los animales tratados previamente como para no incluirlos en el presente estudio. Ha sido demostrado, y particularmente en cabras, que tratamientos repetidos con eCG, inducen la formación de respuesta inmune humoral específica contra dicha hormona afectando negativamente la fertilidad después de la IATF (Roy *et al.*, 1999; Drion *et al.*, 2001). Lo antedicho se produce ya que se retrasa la ocurrencia del celo, el pico de hormona luteinizante se encuentra ausente o desplazado y por consiguiente el momento de ovulación no es sincronizado afectándose la fertilidad (Roy *et al.*, 1999; Drion *et al.*, 2001),
- Otro factor importante es la cantidad total de espermatozoides depositados en el cervix (Ritar, 1993). Ya que se determinó que al pasar de 60 a 120 millones de espermatozoides totales/dosis inseminante era posible obtener una mejora de 10 a 13 puntos porcentuales de fertilidad a favor de la mayor concentración (Ritar, 1993). Por su parte en el ovino, la cantidad mínima de espermatozoides necesarios para obtener tasas de preñez aceptables, aún con semen fresco, varía entre autores, pero se puede decir que debería estar por encima de los 180 millones de espermatozoides totales/dosis inseminante (McPie *et al.*, 2000; Paulenz *et al.*, 2002),
- En el presente estudio, en ningún caso fue posible atravesar al cervix de las cabras y es conocido que el lugar de deposición del semen tiene incidencia en la tasa de preñez obtenida (Ritar; Salamon, 1983; Ritar *et al.*, 1990; Gibbons, 2002; Salvador *et al.*, 2005).

Si tenemos entonces en cuenta que la fertilidad en este estudio pudo estar afectada por uno o varios de los factores antes mencionados manifestándose con una baja tasa de preñez con el semen fresco, lo mismo seguramente ha actuado con los tratamientos con semen congelado. Por ello es posible especular que en condiciones más controladas de manejo de las hembras y de la inseminación, ambos tipos de resultados podrían ser mejorados (con semen fresco y congelado). Si esto fuese así, es posible esperar que con los tratamientos con yema de huevo, con o sin plasma

seminal, sea posible obtener tasas de preñez más elevadas y por lo tanto consideradas aceptables para su uso productivo. En este caso, la metodología de elección sería la que emplea las bajas concentraciones de yema de huevo sin eliminación del plasma seminal evitándose así la mayor cantidad de manipulaciones que significa la centrifugación del eyaculado para la eliminación del mismo.

Con respecto a la lecitina de soja, aunque no se ha encontrado información publicada de fertilidad con semen congelado de caprinos en este medio, Baldasarre y Karatzas (2004) hacen referencia en su trabajo a haber obtenido al menos iguales tasas de fertilidad durante la fertilización “*in vitro*” realizada tanto con semen congelado en medio con lecitina vegetal como con yema de huevo (resultados no publicados por los autores). En función de ello, se deberían realizar nuevos estudios con otros productos comerciales que contienen lecitina de soja en su formulación para mejorar la información generada con este componente o eventualmente utilizarlo en proporciones diferentes a la utilizada en nuestro caso.

En el **Experimento 3** se realizó la evaluación del efecto del agregado de plasma seminal después del descongelado del semen, su relación con la raza de donde provino el mismo (Saanen y Criollo) y los tratamientos que se utilizaron para su congelación. Como la significancia estadística del efecto de los tratamientos ya fue ampliamente discutida en el experimento 1 y los resultados en el experimento 3 fueron similares a los del primero, en la discusión que sigue no se agregaran más comentarios en lo referido a los diluyentes. Las evaluaciones que aquí se discuten son aquellas relacionadas con la valoración de las características del semen posdescongelado, cuando en este momento le fue agregado plasma seminal al material en evaluación.

Efecto del agregado Posdescongelado de Plasma Seminal y del efecto Raza sobre los parámetros seminales evaluados

En el ovino, se logró a través del agregado posdescongelado de plasma seminal homólogo a espermatozoides congelados/descongelados, una reversión del proceso de capacitación iniciado prematuramente por el proceso de criopreservación (Maxwell *et al.*, 1999; Mortimer; Maxwell, 2004). Por este mismo medio, fue logrado obtener una

mejora significativa de la motilidad (Domínguez *et al.*, 2007; Bernardini, 2008) y tasas de gestación similares a las obtenidas con semen fresco en inseminación cervical utilizando espermatozoides congelados/descongelados (Maxwell *et al.*, 1999, McPhie *et al.*, 2000).

En el presente trabajo no fueron observados efectos del agregado del plasma seminal ni efecto de la raza a tiempo 0 sobre la **Motilidad Individual Progresiva**, el **Vigor**, la **Funcionalidad de la Membrana Plasmática** y la **cantidad de espermatozoides vivos**. Con respecto al efecto de la adición del plasma seminal, es poco esperable que en el momento 0 se observe alguna consecuencia sobre estos parámetros ya que es necesario un cierto tiempo para que el mismo tenga algún efecto sobre ellos. Este efecto postergado de la acción del plasma seminal fue reportado por otros autores en caprinos (La Falci *et al.*, 2002) y en ovinos (Domínguez *et al.*, 2008; Bernardini, 2008).

En el presente estudio, la adición de plasma seminal después del descongelado disminuyó la cantidad de **espermatozoides vivos** y desmejoró la **funcionalidad de la membrana plasmática (Test hipoosmótico)** respecto a lo observado en el semen que no fue suplementado con plasma seminal posdescongelado. Este comportamiento no fue encontrado en ovinos por Domínguez *et al.* (2008) ni por Bernardini (2008).

En particular, en cuanto al **porcentaje de espermatozoides vivos** luego del descongelado a tiempo 0 se observó una interacción entre raza y tratamiento, donde el diluyente con alto porcentaje de yema de huevo permitió una mayor sobrevivencia posdescongelado en el semen de raza Saanen. Los otros diluyentes de esta misma raza y los evaluados en la raza Criollo, tuvieron respuestas similares entre sí para este parámetro.

Sin redundar en los conceptos vertidos en el experimento 1 para las diferencias manifestadas por los tratamientos de dilución comparados, es necesario acercarse a una explicación que intente interpretar el efecto diferente según la raza para un mismo procedimiento.

La bibliografía consultada no reporta comparaciones entre razas realizadas en forma simultánea como fue efectuado en el presente estudio. Sin embargo, en la información consultada se observó un comportamiento diferente entre razas ante el

uso de un mismo tipo de procedimiento: aquel en que se elimina el plasma seminal (lavado o no lavado de los espermatozoides). Nos parece adecuado aclarar al respecto, que muchos de estos trabajos no son comparables directamente entre si ya que en la mayoría de los casos no es posible establecer el estado fisiológico de los machos en estudio, además los mismos se desarrollaron a distintas latitudes, etc. pero es llamativo como el efecto racial se manifiesta en ellos.

El analisis de esta bibliografía llevaría a suponer que existen razas en donde la actividad o la presencia de las enzimas que interactúan con la yema de huevo está ausente o disminuida (Raza Canaria: Cabrera *et al.*, 2005; raza Jamunapari: Chauhan *et al.*, 1990; Raza Boer: Tuli *et al.*, 1994; Raza Saanen: Azerêdo *et al.*, 2001) o por el contrario, otras razas donde éstas se encuentran y/o presentan una mayor concentración o actividad (No especifican Raza: Corteel, 1975; Raza Angora: Ritar; Salamon, 1982 y 1991; Raza Verata: Pintado *et al.*, 1991; Raza Saanen: La Falci *et al.*, 2002, Raza Florida: Dorado *et al.*, 2007).

También ha sido demostrado que la presencia de estas enzimas y su actividad varía a lo largo de las estaciones reproductivas (La Falci *et al.*, 2002). Si esto es observable respecto de un procedimiento, es factible pensar como se observó en el presente estudio, que lo mismo podría ocurrir respecto de las razas y los tratamientos de dilución que recibe el semen.

Con respecto a la proporción de **espermatozoides normales**, se observó efecto de interacción de la raza y el agregado de plasma seminal. La proporción de espermatozoides normales en el semen de la raza Criollo disminuyó cuando al semen descongelado se le adicionó plasma seminal. Este comportamiento diferencial según razas, por un lado contradice lo observado a tiempo 0 sobre la **Motilidad Individual Progresiva**, el **Vigor**, la **Funcionalidad de la Membrana Plasmática** y la **cantidad de espermatozoides vivos**, donde no se observó efecto inmediato del agregado de plasma seminal, se contradice con reportes anteriores donde para observar efecto del agregado de plasma seminal poscongelado fueron necesarios entre 30 y 60 minutos para manifestar su actividad en caprinos (La Falci *et al.*, 2002) y en ovinos (Domínguez *et al.*, 2008; Bernardini, 2008). Y por otro lado, reforzaría la hipótesis planteada en el porcentaje de espermatozoides vivos, teniendo en cuenta las observaciones indicadas.

De todas maneras, los altos porcentajes de espermatozoides normales observados en ambas razas evaluadas al igual que lo observado en el experimento 1, fueron superiores a los recomendados como mínimos para el bovino a fin de asegurarse una fertilidad normal en caso de ser utilizado el semen congelado/descongelado en inseminación artificial (Barth; Oko, 1989).

El porcentaje de espermatozoides con **acrosoma dañado** posdescongelado se vio afectado por la interacción de la raza y la adición de plasma seminal, no observándose efecto de ninguna variable simple. Esta valoración se llevó adelante luego de transcurridos 15 minutos del agregado de plasma seminal posdescongelado. En la raza Criollo, disminuyó de forma significativa la cantidad de espermatozoides con el acrosoma dañado, en cambio en la raza Saanen este efecto se observó de forma menos marcada. Este efecto casi inmediato del agregado de plasma seminal en ambas razas, no fue observado por otros autores (La Falci *et al.*, 2002; Domínguez *et al.*, 2008; Bernardini, 2008) quienes necesitaron de mayor tiempo de acción del plasma seminal para ver efectos. Si bien es cierto que transcurrieron al momento de realizar las determinaciones al menos 15 min, es posible que este tiempo fuese suficiente para ejercer efecto en algunos de los parámetros observados pero no en otros, como se manifiesta en el presente trabajo.

Esta información probaría que el agregado de plasma seminal de caprinos posdescongelado sería capaz de neutralizar los cambios similares a la capacitación que sufren los espermatozoides criopreservados (Watson, 1995), como ocurre en ovinos (Maxwell *et al.*, 1999; Mortimer *et al.*, 2004) donde ciertas proteínas del plasma seminal son capaces de lograrlo. Existiría también la posibilidad de que algunas razas o individuos tuvieran esta capacidad más marcada que otros de la misma manera que ocurre con la mayor o menor congelabilidad del semen que se observa entre razas e individuos.

Efecto del agregado de plasma seminal posdescongelado y de la raza sobre la motilidad individual progresiva y el vigor evaluados después de dos horas de cultivo a 37° C.

Sobre la **Motilidad Individual Progresiva**, se observó un efecto de interacción entre raza y agregado de plasma seminal sobre espermatozoides congelados/descongelados de caprinos luego de 2 horas de incubación en baño maría a 37° C. El aumento de motilidad individual progresiva observada en la raza Criollo cuando se le agregó plasma seminal fue significativamente mayor que el observado en la raza Saanen.

El efecto observado a tiempo 2 y la falta del mismo a tiempo 0, luego del agregado de plasma seminal, es coincidente con lo observado por otros autores (La Falci *et al.*, 2002; Domínguez *et al.*, 2008; Bernardini, 2008) y muestra que es necesario que pase cierto tiempo para que la interacción de las proteínas con los espermatozoides se haga manifiesta. Esta observación sin embargo, contradice lo observado por algunos autores (Ritar; Salamon, 1991; Ritar; Ball, 1993; La Falci *et al.*, 2002), quienes encontraron que a medida que transcurría el tiempo de incubación había pérdida de motilidad, justificando estas observaciones en la presencia y actividad de las enzimas (Enzima coagulante de la yema de huevo-EYCE- y Fracción glicoproteica del plasma seminal-BUSgp60-) que interactúan con el plasma seminal, con efecto deletéreo sobre los espermatozoides (La Falci *et al.*, 2002; C; Ritar; Salamon, 1991; Ritar; Ball, 1993).

Es necesario aclarar que sólo en el trabajo de La Falci *et al.* (2003) se realizó agregado de plasma seminal luego del lavado de los eyaculados para eliminar el plasma seminal, en cambio en los trabajos de Ritar; Salamon (1991) y Ritar; Ball (1993) sólo se realizó lavado del semen con el objetivo de extraer el plasma seminal.

Por otra parte existe una pérdida de motilidad y vigor, normal y natural en los espermatozoides de todas las especies durante el transcurso del tiempo de incubación a 37° C como ya se mencionara anteriormente, lo que se busca demostrar en el presente trabajo es el efecto diferencial de los tratamientos aplicados.

Coincidentemente con lo ocurrido con la motilidad individual progresiva, el **vigor** fue significativamente mayor, después de dos horas de incubación en la muestra

coincubada con el plasma seminal en relación con la muestra incubada sin plasma seminal. A su vez, esta manifestación también fue más marcada en la raza Criollo con respecto a la Saanen. En la raza Criollo, en donde este efecto parece más marcado, el plasma seminal sería capaz de neutralizar los cambios de tipo capacitación que sufren los espermatozoides criopreservados (Watson, 1995), como ocurre en ovinos (Maxwell *et al.*, 1999; Mortimer *et al.*, 2004). Respecto de la raza Saanen, no fue observado este efecto en la muestra con agregado de plasma seminal.

Por otro lado, si bien en este trabajo no se realizaron correlaciones entre variables, se pudo observar a lo largo del mismo que tanto la motilidad individual progresiva como el vigor se manifestaron de manera análoga.

Tanto en caprinos como en ovinos, los estudios sobre el efecto del plasma seminal en el mejoramiento de la calidad espermática han tenido gran repercusión. Mientras que en caprinos, los estudios se dirigieron al lavado del semen para la extracción del plasma seminal obteniendo como respuesta a esta manipulación una mejora en la crioconservación (Corteel, 1974, 1975 y 1980; Ritar *et al.*, 1982; Memon *et al.*, 1985), un incremento en el porcentaje de espermatozoides móviles, no sólo antes (Corteel, 1974) sino después del congelado (Corteel, 1974, 1975 y 1980; Ritar *et al.*, 1982; Memon *et al.*, 1985), donde además mantuvo la integridad del acrosoma (Memon *et al.*, 1985). Mejoras, que como ya se mencionara en varias oportunidades, se debieron a la extracción con el plasma seminal de enzimas presentes en él (Roy, 1957; Pellicier-Rubio *et al.*, 1997 y 1998; Sias *et al.*, 2005).

En cambio los estudios en ovinos, tuvieron una orientación absolutamente opuesta, es decir se trabajó sobre el agregado de plasma seminal al medio de conservación o descongelado, donde el efecto de esta manipulación sobre espermatozoides frescos (Ashworth *et al.*, 1994), expuestos a choque térmico por frío (Barrios *et al.*, 2000; Barrios *et al.*, 2005) y congelado/descongelado (Maxwell *et al.*, 1999; Mortimer; Maxwell, 2004; Dominguez *et al.*, 2007; 2008) mejoraron la motilidad, la viabilidad y el estado del acrosoma de éstos. Más recientemente se reportó la influencia de ciertos componentes del plasma seminal con actividad decapacitante y estabilizante de la membrana plasmática (Ashworth *et al.*, 1994) como así también, de mejoras en la tasa de preñez en inseminación artificial cervical con semen congelado/descongelado luego del agregado de plasma seminal (Maxwell *et al.*, 1999; McPhie *et al.*, 2000).

En el ovino, este efecto crioprotector del plasma seminal que se produce no sólo al agregarlo en forma completo (Maxwell *et al.*, 1999; Mortimer; Maxwell, 2004) sino cuando se agregan algunas de sus fracciones (Barrios *et al.*, 2000; 2003); tanto antes (Barrios *et al.*, 2005) como después de someter a los espermatozoide al estrés térmico por frío (Barrios *et al.*, 2000) es atribuida a la presencia de ciertas proteínas en el plasma seminal (Barrios *et al.*, 2000 y 2003; Bernardini, 2008; Dominguez *et al.*, 2007; 2008) pero no debería descartarse la participación en este efecto de otras sustancias que componen tan compleja solución.

En el presente estudio, la adición de plasma seminal a espermatozoides congelado/descongelado de macho caprino mejoró significativamente la motilidad y el vigor luego de dos horas de incubación a 37° C, no determinándose en este momento su efecto sobre la integridad (espermatozoides vivos) ni la funcionalidad de la membrana o el estado del acrosoma. Efecto que no fuera observado en semen de caprinos congelado/descongelado luego del agregado de fracciones proteicas de plasma seminal (La Falci *et al.*, 2002).

Es llamativo y a la vez prometedor que se produjera esta mejora cuando es una característica que se pierde en presencia de plasma seminal (Corteel, 1974; 1975 y 1980; Ritar *et al.*, 1982; Nunes *et al.*, 1982; Memon *et al.*, 1985) y que condujo a su eliminación previo al procesamiento. Por lo cual, no debería descartarse en caprinos, la presencia en el plasma seminal de sustancias (proteínas u otras) capaces de neutralizar los cambios similares a la capacitación que sufren los espermatozoides criopreservados (Watson, 1995), como se describe para el ovino luego del agregado del plasma seminal (Maxwell *et al.*, 1999; Mortimer *et al.*, 2004; Dominguez *et al.*, 2007 y 2008; Bernardini, 2008).

Por lo tanto, como la motilidad espermática puede considerarse no sólo como una manifestación de competencia funcional del espermatozoide (Scott, 2000) sino como un indicador de la fertilidad masculina, por su importancia en la migración espermática en el tracto genital femenino y en la interacción gamética durante la fertilización (Robayo *et al.*, 2008). Es que estas características adquieren mayor relevancia en aquellas especies donde en la monta natural, el semen es depositado en fondo de vagina y los espermatozoides deben progresar a través del mucus cervical para

alcanzar el útero. Si bien existen otros factores involucrados en el transporte espermático (actividad muscular de la vagina, cérvix y útero, estructura del mucus cervical, presencia de criptas cervicales, etc.), la ausencia de motilidad espermática no le daría oportunidad al espermatozoide de alcanzar el sitio de fertilización en el momento oportuno.

Cuando se aplican biotécnicas reproductivas, como la inseminación artificial o la fertilización *in vitro*, la importancia de la motilidad espermática dependerá de la técnica a implementar como también de la especie animal destinada a tal fin. En lo que respecta a la especie ovina, la motilidad espermática pierde importancia cuando el semen es depositado dentro del útero luego de emplear la técnica de inseminación artificial laparoscópica (Clifton, 1995; Maxwell *et al.*, 1999; McPhie *et al.*, 2000).

Sin embargo, como se comentara en la revisión bibliográfica, la aplicación de esta técnica a gran escala está limitada por su costo y la necesidad de personal entrenado. Por el contrario, cuando se emplea la IA cervical, la motilidad espermática es uno de los principales factores que afectará el resultado reproductivo.

Como los resultados del presente estudio demostraron que la adición de plasma seminal al medio luego del descongelado mejoró la motilidad y el vigor y si bien en este estudio, la fertilidad de estos tratamientos no fue evaluada, esta mejora en la motilidad podría favorecer la llegada de estos espermatozoides al sitio de fertilización cuando son introducidos por la vía cervical en cabras inseminadas, pudiendo de esta manera incrementarse así la tasa de preñez como fuera observado en ovinos (Maxwell *et al.*, 1999; McPhie *et al.*, 2000), logro que podría ser atribuido sobre todo a la mejora de la motilidad espermática por efecto del agregado de plasma seminal.

6. CONCLUSIONES

El semen caprino congelado en diluyente sin proteína animal no presenta mayor calidad espermática “*in vitro*” ni mayor fertilidad “*in vivo*”, que el semen congelado en diluyentes conteniendo yema de huevo en su formulación,

El semen caprino conservado en nitrógeno líquido durante los seis meses de almacenamiento pierde algunas características que hacen a su calidad. Mientras que la motilidad y el vigor desmejoran, la funcionalidad de la membrana plasmática, la presencia de espermatozoides vivos, de espermatozoides sin alteraciones de conformación y con el acrosoma dañado no se ven alteradas,

Luego de 15 minutos, el agregado de plasma seminal posdescongelado no altera el patrón de comportamiento de motilidad y vigor, sin embargo disminuye la cantidad de espermatozoides vivos, desmejora la funcionalidad de la membrana plasmática y disminuye la presencia de espermatozoides con el acrosoma dañado. En cambio, el plasma seminal homólogo de raza Criollo luego de 2 horas de incubación a 37° C mejora la motilidad y el vigor de los espermatozoides, mientras que en la raza Saanen no produce mejora de estas características.

La raza no tiene efecto sobre la calidad espermática “*in vitro*” del semen congelado-descongelado.

6.1. RECOMENDACIONES A PARTIR DE LOS RESULTADOS

Experimento 1:

- Todo parece indicar que la alternativa más apropiada para evitar la interacción del plasma seminal con la yema de huevo y posibilitar de esta manera una mejor acción protectora de ésta sobre los espermatozoides, es eliminar el plasma seminal por medio del lavado de los eyaculados,
- La menor sobrevida de espermatozoides en el tratamiento con plasma seminal y bajo contenido de yema de huevo parece indicar que esta baja proporción del agente protector no sería suficiente para brindar una protección adecuada a los espermatozoides o que aún con estas pequeñas

cantidades no se evitaría la interacción del plasma seminal con la yema de huevo o ambas en conjunto,

- Los medios comerciales con lecitina de soja fueron desarrollados atendiendo las necesidades particulares de los espermatozoides bovinos, comenzándose a utilizar en distintas especies con resultados variables. Es posible que deban sufrir ajustes en su formulación o en su forma de uso para atender las particularidades de algunas especies, como es el caso del caprino,

- Quedaría aún por dilucidar si las alteraciones que provocan una pérdida paulatina de la motilidad individual progresiva y del vigor espermático dentro de los 6 meses posteriores al congelado no tienen su ubicación en las mitocondrias alojadas en la pieza intermedia o en alteraciones en el sistema de microtúbulos de la cola del espermatozoide, que en ambos casos serían capaces de producir esta manifestación,

- Se desprende de la bibliografía consultada que la presencia del plasma seminal tiene un comportamiento diferente en distintas razas. Se debería conocer también: 1) si este comportamiento se debe a una actividad o concentración diferente de las enzimas en cada una de ellas; 2) si su actividad, como observaron La Falci *et al.* (2002), se ve afectada por las estaciones en todas las razas o 3) si estos cambios en su actividad o concentración pueden variar con la dieta recibida por los animales,

Experimento 2:

- Con respecto al medio conteniendo lecitina de soja se deberían continuar con nuevos estudios donde se varíen las proporciones del contenido en lecitina de soja en su formulación,

- Deberían ser tenidos en cuenta, a la hora de planificar un experimento de fertilidad "*in vivo*", los factores que influyen en la manifestación final de la fertilidad a fin de evitar la manifestación de otros efectos sobre esta variable que lleven a conclusiones con un contenido de error en las mismas,

Experimento 3:

- Se desprende de los resultados “*in vitro*” que el efecto del agregado de plasma seminal poscongelado presenta un comportamiento diferente en las razas evaluadas, información no encontrada en la bibliografía consultada, por lo que sería necesario aportar información del comportamiento de otras razas evaluadas simultáneamente, teniendo presente si factores como la alimentación o la estacionalidad influyen sobre esta actividad,
- Incrementar los estudios a fin de determinar la/s sustancia/s componentes del plasma seminal caprino responsable/s de mejorar la motilidad y el vigor luego de dos horas de incubación a 37° C y del agregado de plasma seminal posdescongelado,
- Determinar por medio de la inseminación por vía cervical en cabras si la mejora observada “*in vitro*” se traduce en una mejora de la tasa de preñez, como fuera observada en ovinos (Maxwell *et al.*, 1999; McPhie *et al.*, 2000).

7.- BIBLIOGRAFÍA.

- AAMDAL, J.; LYGSET, O.; FOSUM, K.** 1965. "Toxic effect of lysolecithin on sperm. A Preliminary Report". *Nordisk Veterinary Medicin*, 17:633-634.
- ABÓGALA, E. M.-E.; TERADA, T.** 2004. "Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa". *Theriogenology*, 64: 1160-1172.
- AGRAZ GARCÍA, A. A.** 1981. "Cria y explotación de la cabra en América Latina". Hemisferio Sur S. A., Buenos Aires, Argentina. 482 p.
- AIRES, V. A.; HINSCH, K-D.; MULLER-SCHOLESSER, F.; BOGNER, K.; MULLER-SCHOLESSER, S.; HINSCH, E.** 2003. "*In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen". *Theriogenology*, 60: 269-279.
- AISEN, E.** 2004. "Reproducción Ovina y Caprina". Inter-Médica, Buenos Aires, Argentina. 216p.
- ÁLVAREZ RAMÍREZ, L.; DUCOING WATTY, A. E.; ZARCO QUINTERO, L. A. Y TRUJILLO GARCÍA, A. M.** 1999. "Conducta Estral, Concentración de LH y Función Lútea en Cabras en Anestro Estacional Inducidas a Ciclar Mediante el Contacto con Cabras en Anestro". *Veterinaria México*, 30 (1): 25-31.
- AMANN, R. P. and HAMMERSTED, R. H.** 1993. "In vitro evaluation of sperm quality: An opinion". *Journal of Andrology*, 14(6): 397-406.
- AHMAD, A. and NOAKES, E. D.** 1996. "Sexual maturity in British breeds of goat kids". *British Veterinary Journal*, 152: 93-103.
- AL-GHALBAN, A. M.; TABBAA, M.; KRIDL, R.** 2004. "Factors affecting semen characteristic and scrotal circumference in Damascus bucks". *Small Ruminant Research*, 53: 141-149.
- AMIN, M. R.; TEOLIHIRE, M. R.; YUSUF, T. L.; SITUMORANG, P. Z. and PURWANTARA, B.** 2000. "Effect of bovine seminal plasma substitution and various extenders on quality of swamp buffalo frozen semen". *Proceedings of 14th International Congress on Animal Reproduction*. Stockholm, Sweden. 1-6 of July. 2: 144.
- AMIRAT, L.; ANTON, M.; TAINTURIER, D.; CHATAGNON, G.; BATTUT, I. and COURTENS, J. L.** 2005. "Modification of bull spermatozoa induced by three extenders : Biociphos, Low density Lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing". *Reproduction*, 129:535-543.
- ARIYARATNA, H. B. S.; GUNAWARDANA, V. K.** 1997. "Morphology and morphometry of ovarian follicles in the goat". *Small Ruminant Research*, 26: 123-129.

- ASHWORTH, P. J. C.; HARRISON, R. A. P.; MILLER, N. G. A.; PLUMMER, J. M. and WATSON, P. F.** 1994. "Survival of ram spermatozoa at high dilution: Protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma". *Reproduction, Fertility and Development*, 6: 173-180.
- AURICH, C.; SEEBER, P. and MÜLLER-SCHLÖSSER, F.** 2007. "Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5° C". *Reproduction in Domestic Animal*, 42: 445-448.
- AUSTIN, C. R.** 1951. "Observation on the penetration of the sperm into de mammalian egg". *Australian Journal of Scientific Research Service B.*, 4: 581.
- BAAS, J. W.; MOLAN, P. C.; SHANNON, P.** 1983. "Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa". *Journal of Reproduction and Fertility*, 68: 275-280.
- BAKER, T. G.** 1982. "Oogenesis and ovulation" in: Austin, C. R. and Short, R. V. Eds. "Reproduction in mammals: Book1: Germ cells and fertilization, 2nd ed.". Cambridge University Press, U.K. p.: 17-45.
- BARKAWI, A. H.; ELSAYED, E. H.; ASHOUR, G.; SHEHATA, E.** 2006. "Seasonal changes in semen characteristic, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats". *Small Ruminant Research*, 66: 209-213.
- BARRIOS, B.; PEREZ-PÉ, M. G.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T. and CEBRIAN-PEREZ, J. A.** 2000. "Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane". *Biology of Reproduction*, 63: 1531-1537.
- BARRIOS, B.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; MUIÑO-BLANCO, T. and CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.** 2005. "Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock". *Journal of Andrology*, 26(4): 539-549.
- BARTH, A. D. and OKO, R. J.** 1989. "Abnormal morphology of bovine spermatozoa". Iowa State University Press/AMES; Iowa, USA. First ed.. 296 p.
- BARTH, A. D.** 1989. "Abaxial tail attachment of bovine spermatozoa and its effect on fertility". *Canadian Veterinary Journal*, 30: 656-662.
- BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A.; BO, G. A. and MAPLETOFT, R. J.** 1992. "Effect of narrow sperm head shape on fertility in cattle". *Canadian Veterinary Journal*, 33: 33-39.
- BEDOTTI, D.; GOMEZ CASTRO, A. G.; SANCHEZ RODRIGUEZ, M y MARTOS PEINADO, J.** 2003. "Características Reproductivas de la cabra Colorada Pampeana". *Archivos de Zootecnia*, 52: 371-377.
- BEDFORD, J. M.** 1983. "Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals". *Biology of Reproduction*, 28: 108-120.

- BEDFORD, J. M.** 1975. "Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis". In: R. O. Greep and E. B. Astwood (ed.) "Handbook of Fisiology", Vol. V, Section 7, "Endocrinology: Male Reproductive System". American Physiological Society. Washintong, D. C., USA.
- BERGER, T.; DROBNIS, E. Z.; FOLEY, L.; METZLER, J. K. and HORTON, M.** 1994. "Evaluation of relative fertility of criopreserved goat sperm". Theriogenology, 41: 711-717.
- BERNARDINI, A.** 2008. "Estudio de los factores que mejoran la habilidad fertilizante de los espermatozoides ovinos crioconservados". Tesis de grado para optar por el título de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. 58 p.
- BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L.; FERREIRA SANTOS, A. D.; CHALHOUB, M.; GONZALES ALVEZ, S. G.; VASCONCELOS, M. F.; SALDAÑA LEANDRO, E. E. y GUIMARÃES, J. D.** 2005. "Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino". Ciencia Animal Brasileira, 6(3): 213-218.
- BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; VASCONCELOS, M. F.; ALVES, S. G. C.; BISCARDE, C. E. A.; BRANDÃO, A. C.; OBA, E.** 2006. "Effects of EDTA, Equex STM paste and the Soybean lecithin on the post-thawing gota spermatozoa viability". Acta Scientiae Veterinariae, 34(1): 321.
- BJÓRND AHL, L.; SÖDERLUND, I.; JOHANSSON, S.; MOHAMMADIEH, M.; POURIAN, M. R. and KVIST, U.** 2004. "Why the WHO Recommendations for Eosin-Nigrosin Staining Techniques for Human Sperm Vitality Assessment Must Change". Journal of Andrology, 25 (5): 671-678.
- BLACKSHAW, A. W. and SALISBURY, G. W.** 1957. "Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. II. Cold-shock and its prevention". Journal of Dairy Science, 40: 1099-1106.
- BONVILLANI, A.; POEY, V.; PETRYNA, A.; MORANDINI, M.; GRIVEL, D.; FREIRE, V.; MONTOYA, O.; PENA BLANCO, F. y de GEA, G.** 2004. "Evaluación de la canal en cabritos criollos y Anglo Nubian. Resultados preliminares". Actas de resúmenes del Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Agencia Córdoba Ciencia, Córdoba. En CD.
- BOUÉ, F.; BLAIS, J. and SULLIVAN, R.** 1996. "Surface localization of p34h, an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa". Biology of Reproduction, 54: 1009-1017.
- BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J. P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUERIN, B.; CAMUS, A. and LECHAT, M.** 1998. "Comparison of bacteriological quality of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents". Theriogenology, 50: 699-706.

- BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D.; BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P. L.; KASTELIC, J. P.** 2003. "Comparision of method to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate". *Theriogenology*, 60: 1539-1551.
- BUKAR, M. M.; AMIN, J. D.; SIVACHELVAN, M. N.; RIBADU, A. Y.** 2006. "Posnatal histological development of ovaries and uterus and the attainment of puberty in famale kid goats". *Small Ruminant Research*, 65: 200-208.
- BYSKOV, A. G.** 1982. "Primordial germ cells and regulation of meiosis" en: Austin, C. R. and Short, R. V. Eds. "Reproduction in mammals: Book1: Germ cells and fertilization, 2nd Edition". Cambridge University Press, UK, p.: 1-16.
- BYSKOV, A. G. and HØYER, P. E.** 1994. "Embryology of mammalian gonads and ducts" in: Knobil, E and Nelly, J. D. Eds. "The physiology of reproduction, 2nd Edition: Volume 1". Raven Press, New York, USA, p.: 487-540.
- CABRERA, F., GONZALES, F., BATISTA, M., CALERO, P., MEDRANO, A. and GRACIA, A.** 2005. "The Effect of Removal of Seminal Plasma, Egg Yolk Level and Season on Sperm Freezability of Canary Buck (*Capra hircus*)". *Reproduction of Domestic Animals*, 40: 191-195.
- CAHIL, L. P.; MARIANA, J. C.; MAULÉON, P.** 1979. "Total Follicular population in ewes of high and low ovulation rates". *Journal of Reproduction and Fertility*, 55: 27-36.
- CAPOTE, J.; TEJERA, A.; AMILLS, M.; ARGÜELLO, A.; FRESNO, M. Y LÓPEZ, J. L.** 2004. "Influencia histórica y actual de los genotipos canarios en la población caprina americana". *Animal Genetic Resources Information (FAO)*, 35: 49-60.
- CHAGRA DIB, E. P.; VERA, T. A. y LEGUIZA, H. D.** 1998. "Incidencia de distintos factores sobre los pesos al nacimiento y el crecimiento de cabritos de tipo criollo regional". *Revista Argentina de Producción Animal*, 18 (1):11-12.
- CHAGRA DIB, E. P.; LEGUIZA, H. D.; VERA, T. A. y VALDIVIA, C.** 2005. "Factores que inciden en el consumo de leche y crecimiento de los cabritos criollos biotipo regional". XIX° Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Tampico, México, *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 13(1):184-185.
- CHANG, M. C.** 1951. "Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes". *Nature (London)* 168: 697.
- CHAUHAN, M. S. and ANAND, S. R.** 1990. "Effect of egg yolk lipids on the freezing of goats semen". *Theriogenolody*, 34(5): 1003-1013.
- CARBALLADA, R.; ESPONDA, P.** 1998. "Binding of seminal vesicle proteins to the plasma membrane of rat spermatozoa *in vivo* and *in vitro*". *International Journal of Andrology* 21: 19-28.

- CORTEEL, J. M.** 1981. "Collection, procesing and artificial insemination of goat semen". In: Gall, C (ed), Goat Production. Gall C. ed., Academic Press, Inc., London, p.: 171-191.
- CORTEEL, J. M.** 1980. "Effets du plasma seminal sur la survie et la fertilité des spermatozoïdes conservés *in vitro*". Reproduction Nutrition and Development, 20(4A): 1111-1123.
- CORTEEL, J. M.** 1975. "Effet du "lavage" sur la conservation des spermatozoïodes de bouc à basse température". Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 15: 525-528.
- CORTEEL, J. M.** 1974. "Viabilité des spermatozoïodes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma seminal : Effet du glucose". Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. , 14(4B): 741-745.
- COLAS, G.** 1975. "Effect to initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen". Journal of Reproduction Fertility, 42: 277-285.
- CLARK, E. N.; CORRON, M. E.; FLORMAN, H. M.** 1993. "Caltrin, the calcium transport regulatory peptide of spermatozoa, modulate acrosomal exocytosis in response to the egg's zona pellucida". Journal of Biological Chemistry, 268: 5309-5316.
- CLIFTON, G. R.** 1995. "Evaluación de la fertilidad de ovejas inseminadas por vía intrauterina con semen congelado/descongelado de diferentes calidades". Trabajo de tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al título de MAGISTER SCIENTIAE. Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Mar del Plata, Balcarce, Argentina. 73 p.
- CROSS, N. L.** 1993. "Multiple effects of seminal plasma on the acrosome reaction of human sperm". Molecular Reproduction Development, 35:316-323.
- CUETO, M., GIBBONS, A., ALBERIO, R., TADDEO, H. and GONZALES-BULNES, A.** 2006. "Timing of emergence of ovulatory follicles in polioovulatory goats". Animal Reproduction Science, 91: 275-284.
- CUETO, M.; GIBBONS, A.; ABAD, M.** 2000. "Reproducción en Caprinos". Centro Regional Patagonia Norte-INTA EEA Bariloche. CT N° 396, 34 p.
- CURRY, M. R.** 2000. "Cryopreservation of semen from domestic livestock". Reviews of Reproduction, 5: 46-52.
- CURRY, M. R.; WATSON, P. F.** 1995. "Sperm structure and function", In: Grudzinskas, J. G.; Yovich, J. L. (eds): Gametes: The Spermatozoon. Cambridge, Cambridge University Press, p.:45-69.
- DARIN-BENETT, A.; POULOS, A. and WHITE, I. G.** 1973. "The effect of cold shock and freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull and boar spermatozoa. Australian Journal of Biological Science, 26: 1409-1420.

- DAYENOFF, P.; R. CACERES.; H. CARRIZO y H. BOLAÑO.** 1993. "Peso al naciementoy crecimiento del cabrito tipo criollo regional". Primeras Jornadas de Producción Caprina. UNRC. Actas de Resúmenes, p.: 24-27.
- de CASTRO, T.; RUBIANES, E.; MENCHACA, A. and RIVERO, A.** 1999. "Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats". *Theriogenology*, 52: 399-411.
- de GEA, G.** 2000. "La Cabra Criolla de las Sierras de los Comechingones, Córdoba, Argentina". Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. 47 p.
- de GEA, G.; PETRYNA, A. M.; MELLANO, A.; BONVILLANI, A. y TURIELO, A.** 2005. "El Ganado caprino en la Argentina". Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. 200 p.
- de GEA, G. S. y MONDINO, G. C.** 1998. "Epoca, sexo y tipo de parto sobre el peso al nacimiento y velocidad de crecimiento de cabritos criollos". *Revista Argentina de Producción Animal*, 18 (1):359-360.
- DE LAMARINDE, E.; GAGNON, C.** 1984. "Origin of a motility inhibitors within the male reproductive tract". *Journal of Andrology*, 5: 269-276.
- DE MARÍA, L; VIND, J.; OXENBØLL, K. M.; SVENDENSEN, A.; PATKAR, S.** 2007. "Phospholipases and their industrial applications". *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 74: 290-300.
- DEKA, B. C. and RAO, A. R.** 1986. "Effect of glycerol level in Tris-Based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen". *Theriogenology*, 26: 231-238.
- DELGADILLO, J. A.** 2004 a. "Capitulo 1: Caracteres anatómicos y funcionales del sistema reproductor del Macho". En: Aisen, E. G. "Reproducción Ovina y Caprina". Inter-médica. Buenos aires, Argentina, p.:1-10.
- DELGADILLO, J. A.; CORTEZ, M. E.; DUARTE, G.; CHEMINEAU, P.; MALPAUX, B.** 2004 b. "Evidence that the photoperiod controls the annual changes intestosterone secretion, testicular and body weight in subtropical male goats". *Reproduction, Nutrition and Developments*, 44: 183-193.
- DELGADILLO, J. A.; LEBOEUF, B. and CHEMINEAU, P.** 1992. "Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks". *Small Ruminant Research*, 9(1): 47-59.
- DEL-MAESTRO, R. F.** 1980. "An approach to free radicals in medicinal and biology". *Acta Physiological Scandinavika*, 592: 153-168.
- DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P.** 1992. "Major protein of bovine seminal plasma exhibit novel interaction with phospholipids". *Journal of Biological Chemistry*, 267:10149-55.

- DICKSON-URDANETA, L.; TORRES-HERNÁNDEZ, G.; BECERRIL-PÉREZ, C.; GONZÁLEZ-COSSIO, F.; OSORIO-ARCE, M.; GARCÍA-BETANCOURT, O.** 2000. "Comparison of Alpine and Nubian goats for some reproductive traits under dry tropical conditions". *Small Ruminant Research*, 36: 91-95.
- DOMINGO, E.; ZIMERMAN, M.; RAIMAN, R. y LANARI, M. R.** 2005. "Caracterización de las canales de chivitos criollos neuquinos". *Revista Argentina de Producción Animal*, 28 (1): 370-371.
- DOMÍNGUEZ, M.; FALCINELLI, A.; HOZBOR, F.; SÁNCHEZ, E.; CESARI, A.; ALBERIO, R.** 2008. "Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm". *Theriogenology*, 69:564-573.
- DOMÍNGUEZ, M. P.** 2007. "Efecto del plasma seminal sobre la motilidad, viabilidad, funcionalidad de membrana y el estado del acrosoma de espermatozoides congelados/descongelados de ovino". Trabajo de tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al título de MAGISTER SCIENTIAE. Programa de Posgrado en Ciencias Agrarias, Área de Producción y Sanidad Animal, Facultad de Ciencias Agrarias – Universidad Nacional de Mar del Plata. 113 p.
- DORADO, J.; RODRIGUEZ, I.; HIDALGO, M.; PEREZ, C.; CORRAL, S.; SANZ, J. y SANCHEZ, M.** 2003. "Estudio del efecto de la estación sobre la calidad del esperma del macho Cabrio de raza Florida". XXXVIII Jornadas Científicas y VII Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Badajoz, España. 25 al 27 de Septiembre, p.: 165-168.
- DOT, H. M., HARRISON, R. A. P. and FOSTER, G. C. A.** 1979. "The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma". *Journal of Reproduction and Fertility*, 62: 113-124.
- DRIANCOURT, M-A; GOUGEON, A.; MONNIAUX, D.; ROYERE, D.; THIBAUT, CH.** 2001. "Chapitre 15: Folliculogenese et ovulation". En: Thibault, Ch. et Lavasseur, M-C. (Coordonnateurs). "La Reproduction chez les Mammiferes et L'Home". 2^a Edition. Ellipses Edition Marketing S.A. Paris, France, p.: 316-347.
- DRIANCOURT, M-A; GOUGEON, A.; MONNIAUX, D.; ROYERE, D.; THIBAUT, CH.** 1991. "Chapitre 15: La Fonction Ovarienne". En: Thibault, Ch. et Lavasseur, M-C. (Coordonnateurs). "La Reproduction chez les Mammiferes et L'Home". Ellipses Edition Marketing S.A. Paris, France, p.: 273-298.
- DRION, P.; FURTOSS, V.; BARIL, G.; MANFREDI, E.; BOUVIER, F.; POUGNARD J-L.; BERNELAS, D.; CAUGNON, P.; MCNAMARA, E. M.; REMY, B.; SULON, J.; BECKERS, J-F.; BODIN, L.; LEBOUF, B.** 2001. "Four years of induction/synchronization of estrus in dairy goats: effect on evolution of eCG binding rate in relation with the parameters of reproduction". *Reproduction, Nutrition and Development*, 41: 401-412.
- EDDY, E. M. and O'BRIEN, D. A.** 1994. "The Spermatozoon". In: Knobil E., Neill, J. (eds.). "The Physiology of Reproduction, 2nd edition". New York: Raven Press, p.: 29-78.

- ERICKSON, B. H.** 1966. "Development and senescence of the postnatal bovine ovary". *Journal of Animal Science*, 25: 800-805.
- ESTEVA-HERNANDEZ, A. J.** 1976. "Effet de la Cowperectomie et du lavage sur la congélabilité des spermatozoïdes de bouc". D.E.A. Univ. P. et M. Curie, Paris VI.
- EVANS, G. and MAXWELL, W. M. C.** 1990. "S. Salamon Inseminación Artificial de Ovejas y cabras". Acribia, Zaragoza, España, 192 p.
- EVANS, G.; MCPHIE, C. and MAXWELL, W. M. C.** 2000. "The effect of seminal plasma on motility and membrane status of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa". *Proceeding of 14th International Congress on Animal Reproduction*. Stockholm, Sweden. 1-6 of July. 2: 74.
- FERRARI, S.; LEINZ F.; BERNABE, V. H.** 1998. "Inseminação Artificial em cabras com sêmen congelado: Resultados preliminares". *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 35(5): 223-224.
- FERREIRA SANTOS, A. D.; ALVES TORRES, C. A.; FERREIRA DA FONSECA, J.; BORGES, A. M.; GUIMARÃES, J. D.; DA COSTA, E. P.; ROVAY, H.** 2006. "Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes sometidos ao manejo de fotoperíodo artificial". *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(5): 1934-1942.
- FIGUEIRÊDO FREITAS, V. J. y RUBIANES, E.** 2004. "Capítulo 7: Preparación de las hembras. Detección y Control del estro y la Ovulación". En: Aisen, E. G. (Ed. y Autor). "Reproducción Ovina y Caprina". Inter-Médica, Argentina, p.: 87-98.
- FRIGERIO, K. L.; ROSSANIGO, C.** 2000. "Productivity of goat in an intensive system of exploitation". *Proceedings of VII^o International Conference on Goats*. Tours, France. 15-21 of May. Tome I: 357-359.
- FLESCH, M. F.; GADELLA, B. M.** 2000. "Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1469:197-235.
- FLORMAN, H. M.; FIRST, N. L.** 1988. "Regulation of acrosomal exocytosis. II. The zona pellucida induce acrosome reaction of bovine spermatozoa is controlled by extrinsic positive regulatory elements". *Development Biology*, 128: 464-473.
- FOOTE, R. H.; BROKEN, C. C.; KAPROTH, M. T.,** 2002. "Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants". *Animal Reproduction Science*, 71: 13-23.
- GARCÍA ARTIGA, C.** 1994. "Test de Endósmosis en Ovino". VII Jornadas de Reproducción Animal. Murcia, España. Actas de resúmenes: 77-81.
- GARCIA, M. A.; GRAHAM, E. F.** 1987. "Effect of low-molecular-weight fractions (LMWF) from milk, egg yolk and seminal plasma on freezability of bovine spermatozoa". *Cryobiology*, 24: 429-436.

- GARCIA, M. A.; GRAHAM, E. F.** 1987. "Dialysis of bovine semen and its effect on fresh and freeze-thawed spermatozoa". *Cryobiology*, 24: 446-454.
- GAUTHIER, M.; SZYNGIEL, B. and KEEFER, C.** 1998. "Onset of sexual maturity and semen production in Nigerian Dwarf (*Capra hircus*) Bucks". *Theriogenology*, 49(1): 347.
- GRAHAM, J. K.** 1994. "Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and the bull during cryopreservation process". *Theriogenology*, 41: 1151-1162.
- GREENWALD, G. S. and ROY, S. K.** 1994. "Follicular development and its control" in: Knobil, E and Nelly, J. D. Eds. "The physiology of reproduction, 2nd Edition: Volume 1". Raven Press, New Cork, U. S. A., p.: 629-724.
- GREENWALD, G. S. and MOOR, R. M.** 1989. "Isolation and Preliminary characterization of pig primordial follicles". *Journal of Reproduction and Fertility*, 87: 561-571.
- GIBBONS, A.** 2002. "Inseminación artificial con semen congelado en cabras de raza Angora". *Taurus*, 16: 24-32.
- GILLAN, L.; MAXWELL W. M. C. and EVANS, G.** 2004. "Preservation and evaluation of semen for artificial insemination". *Reproduction, Fertility and development*, 16: 447-454.
- GIL, J.; LUMDEHEIM, N.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.** 2003. "Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen". *Theriogenology*, 59: 1241-1255.
- GIL, J.; RODRÍGUEZ-IRAZOQUI, M.; LUMDEHEIM, N.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.** 2003. "Fertility of ram semen frozen in Bioxcell and used for cervical artificial insemination". *Theriogenology*, 59: 1157-1170.
- GIL, J.; JANUSKAUKAS, A.; HAARD, MCH.; HAARD, MGM.; JOHANISSON, A.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.** 2000. "Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus[®] and Triladyl[®]". *Reproduction of Domestic Animals*, 35: 69-77.
- GINTHER, O. J. and KOT, K.** 1994. "Follicular dynamics during the ovulatory season in goats". *Theriogenology*, 42: 987-1001.
- GONZALEZ, C.; GOICOCHEA, J.; PEROZO, F. y MADRID, N.** 1990. "Influencia del anestro posparto, lactación y amamantamiento sobre la eficiencia de los tratamientos de sincronización del celo en ovejas y cabras". *Revista de Agronomía (LUZ)*, 7: 245-253.
- GONZÁLEZ DE BULNES, A.; OSORO, K. y LÓPEZ SEBASTIÁN, A.** 1999. "Factores condicionantes de la respuesta del ganado caprino a la sincronización de celos mediante Progestagenos y PMSG". *Archivos de Zootecnia*, 48: 231-234.

- GUTHRIE, H. D.; MAXWELL, W. M. C. and JOHNSON, L. A.** 2000. "The effect of seminal plasma and dilution rate on motility and viability of frozen-thawed boar sperm". Proceedings of 14th International Congress on Animal Reproduction. Stockholm, Sweden. 1-6 of July, 2: 143.
- HAFEZ, E. S. E.** 1989. "Reproducción e Inseminación Artificial en Animales". Nueva Inter-Americana S. A., 5° Ed. En Español (5° Ed. en Ingles). Mexico, DF, Mexico. 694 p.
- HAFEZ, E. S. E. y HAFEZ, B.** 2002. "Reproducción e Inseminación Artificial en Animales". McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. A., 7° Ed. En Español (7° Ed. en Ingles). Mexico, DF, Mexico. 519 p.
- HARPER, M. J. K.** 1994. "Gamete and zygote transport". In: Knobil, E., Neill, J.D. Eds., The Physiology of Reproduction. 2nd ed. Raven Press, New York, p. 123-187.
- HARRISON, R. A. P. and WHITE, I. G.** 1972. "Glycolytic enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull, boar and ram and their leakage after cold shock". Journal of Reproduction and Fertility, 30: 105-115.
- HARRISON, R. A. P.** 1996. "Capacitación mechanisms and the role of capacitation as seen in eutherian mammals". Reproduction, Fertility and Developments, 8:581-594.
- HINKOVSKA, V.; DIMITROV, G. P.; KOUMANOV, K. D.** 1986. "Phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram spermatozoa plasma membranes". International Journal of Biochemistry, 18:1115-1121.
- HINSCH, E.; HINSCH, K-D.; BOEHM, J. G.; SCHILL, W-B.; MULLER-SCHLOESSER, F.** 1997. "Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg yolk free and egg yolk containing extenders". Reproduction in Domestic Animals, 32: 143-149.
- HOLT, W. V.** 2000. "Basic aspect of frozen storage of semen". Animal Reproduction Science, 62:3-22.
- HOLT, W. V. and NORTH, R. D.** 1994. "Effect of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa". Biology of Reproduction, 51: 414-424.
- HOLT, W. V.** 1980. "Surface-bound sialic acid on ram and bull spermatozoa: deposition during epididymal transit and stability during washing". Biology of Reproduction, 23: 847-857.
- IWAMOTTO, T., TANAKA, H., OSADA, T., SHINAGAWA, T., OSAMURA, Y. and GAGNON, C.** 1993. "Origing of sperm motility inhibitors from boar seminal plasma. Molecular Reproduction Development, 36: 475-481.
- JANETT F.; FUSCHINI E.; KEO S.; THUN R.** 2005. "Comparison of AndroMed® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of buck semen". Reproduction in Domestic Animimals, 40: 356 (abstract).

- JONES, R.C. and FOOTE, R.H.** 1972. "Non-dialyzable skim milk in diluents for ram and bull semen". *Journal of Dairy Science*, 55: 856-861.
- JONES, R. C.; MARTIN I. C. A.** 1973. "The effect of dilution, egg yolk and cooling to 5°C in the ultrastructure of ram spermatozoa". *Journal of Reproduction and Fertility*, 35: 311-320.
- JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; GRABO, B. G. and ZANEVELD, L. J.** 1984. "Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics". *Journal of Reproduction and Fertility*, 70: 219-228.
- KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S. and KARATZAS, G.** 1999. "Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece". *Theriogenology*, 53: 1285-1293.
- KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A.** 1993. "Fertility associated proteins in Holstein bull seminal plasma". *Biology of Reproduction*, 49: 1202-07.
- KOLB, E.** 1987. "XVI: Fisiología de la Reproducción". En: Kolb, E. "Fisiología Veterinaria", Tomo II. Acribia. Zaragoza, España, p.: 744-769.
- KUSINA, N. T.; CHINUWO, T.; HAMUDIKUWANDA, H.; NDLOVU, L. R.; MUZANENHAMO, S.** 2001. "Effect of different dietary energy level intakes on efficiency of estrus synchronization and fertility in Mashona goat does". *Small Ruminant Research*, 39: 283-288.
- KUSTER, C. E.; SINGER, R. S. and ALTHOUSE, G. C.** 2004. "Determining sample size for the morphological assessment of sperm". *Theriogenology*, 61: 691-703.
- LADHA, S.** 1998. "Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon". *Journal of Membrane Biological*, 165: 1-10.
- LA FALCI, V. S. N.; TORTORELLA, J. L.; RODRIGUES, J. L.; BRANDELLI, A.** 2002. "Seasonal variation of goat seminal plasma proteins". *Theriogenology*, 57: 1035-1048.
- LANARI, M. R.; DOMINGO, E. y PÉREZ CENTENO, M. J.** 2005. "El Sistema Rural de la Cabra Criolla Neuquina en el Norte de la Patagonia". En: "Aspectos sociales, culturales y económicos de la cría de animales autóctonos en Iberoamérica. (Suplemento VI Simposio Iberoamericano sobre conservación y utilización de recursos zoogenéticos) CYTED, Programa XII-H Biodiversidad, Ed. Pérezgrovas, R., p.: 7-12.
- LANARI, M. R.; PÉREZ CENTENO, M. J.; DOMINGO, E. y ROBLES, C.** 2000. "Caracterización de Caprinos Criollos del Norte de Neuquén, (Patagonia, Argentina)". V° Congreso Iberoamericano de Razas Autoctonas y Criollas. La Habana, Cuba. Noviembre. En CD.
- LANARI, M. R.** 2004. "Variación y diferenciación genética y fenotípica de la cabra criolla neuquina en relación con su sistema rural campesino". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Centro Reg. Universidad de Bariloche - Universidad Nacional Del Comahue. 260 p.

- LAND, R. B.** 1970. "Number of oocytes present at birth in the ovaries of pure and Finnish Landrace cross Blackface and Welsh sheep". *Journal of Reproduction and Fertilization*, 21: 517-521.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B. and SALAMON, S.** 2000. "Production and storage of goat semen for artificial insemination". *Animal Reproduction Science*, 62: 113-141.
- LEGUIZA, H. D.; CHAGRA DIB, E. P. y VERA, T. A.** 2001. "Factores que inciden en el rendimiento de la canal de cabritos criollos, en un sistema extensivo de producción en La Rioja, Argentina". 17° Reunión Latinoamericana de Producción Animal. Acta 17 Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal. La Habana, Cuba. 20 – 23 Noviembre. Actas de resúmenes: 1706-1708.
- LEGUIZA, H. D.; CHAGRA DIB, E. P. y VERA, T. A.** 2001. "Rendimiento de la canal de cabritos criollos biotipo regional en un sistema extensivo de producción de los Llanos de La Rioja". *Revista Argentina de Producción Animal*, 21 (1): 266-267.
- LEHLOENYA, K. C.; GREYLING, J. P. C.; SCHWALBACH, L. M. J.** 2005. "Reproductive performance of South African indigenous goats following oestrous synchronisation and AI". *Small Ruminant Research*, 57: 115–120.
- LORENZO, A.; FRESNO, A.; DARMANIN, N.; MOLINA, A.; RAMOS, R.** 1997. "Estudio del comportamiento reproductivo y calidad seminal de los machos y de la fertilidad mediante inseminación artificial en la Agrupación Caprina Canaria". 22° Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Puerto de la Cruz, Tenerife (España), 6-8 Oct. , Actas de Resúmenes: 307-318.
- LUCCI, C. M.; AMORIN, C. A.; RODRIGUEZ, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R.; BÁO, S. N.; SILVA, J. V. R.; GONÇALVES, P. B. D.** 1999. "Study of preantral population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages". *Animal Reproduction Science*, 56: 223-236.
- LUCCI, C. M.; SILVA, R. V.; CARVALHO, C. A.; FIGUEIREDO, R.; BÁO, N.** 2001. "Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles". *Small Ruminant Research*, 41: 61-69.
- MANN, T. and LUTWAK-MANN, C.** 1955. "Biochemical changes underlying the phenomenon of cold shock in spermatozoa". *Arch. Sci. Biol.*, 93: 578-588.
- MANN, T. and LUTWAK-MANN, C.** 1981. "Male reproductive function and semen". Springer, Berlin, p.: 495.
- MARTIN, G. B. and WALKDEN-BROWN, S. W.** 1995. "Nutritional influence on reproduction in mature male sheep and goats". *Journal of Reproduction and Fertility*, 49: 437-449.
- MARCHESI, V. T.** 1985. "Stabilizing infrastructure of cell membranes". *Annual Review of Cell Biology* 1: 531-561.

- MAUBECIN, R.** 1973. "La explotación del ganado caprino en la República Argentina". Información Técnica N° 55, INTA EEA Manfredi, Córdoba. 35 p.
- MAXWELL, W. M. C. and JOHNSON, L. A.** 1999a. "Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma". *Theriogenology* 52: 1353-1362.
- MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G.; MORTIMER, S. T.; GILLAN, L.; GELLATLY, E. S.; MCPHIE, C. A.** 1999b. "Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma". *Reproduction, Fertility and Development*, 11: 123-126.
- MAXWELL, W. M. C.; WELCH, G. R. and JOHNSON, L. A.** 1997. "Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma". *Reproduction, Fertility and Development*, 8: 1165-1178.
- MAXWELL, W.M.C; WATSON, P.F.** 1996. "Recent progress in the preservation of ram semen". *Animal Reproduction Science*, 42: 55-65.
- MAXWELL, W. M. C. and SALAMON, S.** 1993. "Liquid storage of ram semen: a Review". *Reproduction, Fertility and Development*, 5: 613-638.
- MAZUR, P.; LEIBO, S.P.; FARRANT, J.; CHU, E. H. Y. ; HANNA, M. G. JR. ; SMITH, L. H.,** 1970. "Interaction of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cell". In: Wolstenholme, G. E. W.; O'Connor, M. (Eds.), "The Frozen Cell", Churchill, London, U.K., p.: 69-88.
- MAZUR, P.** 1984. "Freezing of living cell: Mechanism and implication". *American Journal of Physiology*, 247: C125-C142.
- MCPHIE, C.; EVANS, G. and MAXWELL, W.M.C.** 2000. "Effect of supplementation of fresh and frozen-thawed semen with seminal plasma on fertility of ewes after cervical and intrauterine insemination". In: 14th International Congress on Animal Reproduction - Stockholm, 2: 78 (abstract).
- MEMON, M. A.; BRETZLAFF, K. N. and RANDALL, S. O.** 1985. "Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa". *American Journal of Veterinary Research*, 46 (2): 473-475.
- MENCHACA, A. and RUBIANES, E.** 2002. "Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and follicular dynamics in goats". *Theriogenology*, 57: 1411-1419.
- MENDOZA, G.; WHITE, I. G. and CHOW, P.** 1989. "Studies of chemical components of angora goat seminal plasma". *Theriogenology*, 32 (3): 455-466.
- MILLER, D. J.; WINER, M. A. ; AX, R. L.** 1990. "Heparin binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin". *Biology of Reproduction*, 42: 899-915.

- MIYAMOTO, A.; UMEZU, M.; HAMANO, K.; MASAKI, J.** 1987. "Seasonal changes in inhibin activity in seminal plasma and serum concentrations of FSH, LH and testosterone in the male goat (*Capra hircus*)". *Theriogenology*, 28(1): 67-76.
- MITA, M.; YASUMASU, I.; NAKAMURA, M.** 1995. "Endogenous substrate for energy metabolism and ultrastructural correlates in spermatozoa of the sea urchin *Diadema setosum*". *Molecular Reproduction Development*, 40: 103-109.
- MOORE, H. D. M.; HIBBIT, K. G.** 1977. "Fertility of boar spermatozoa after freezing in the absence of seminal vesicular proteins". *Journal of Reproduction and Fertility*, 50: 349-352.
- MORELLO, H. H. y CHEMINEAU, P.** 2004. "Capítulo 2: Caracteres anatómicos y funcionales del sistema reproductor de la hembra". En: Aisen, E. G. 2004. "Reproducción Ovina y Caprina". Inter-médica, Buenos Aires, Argentina, p.:11-24.
- MORTIMER, D.** 2000. "Sperm Preparation Methods". *Journal of Andrology*, 21(3): 357-366.
- MORTIMER, S. T. and MAXWELL, W. M. C.** 2004. "Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa". *Reproduction*, 127: 285-291.
- MOTLOMELO, K. C.; GREYLING, J. P. C.; SCHWALBACH, L. M. J.** 2002. "Synchronisation of oestrus in goats: the use of different progestagen treatments". *Small Ruminant Research*, 45: 45-49
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINURIER, D. and ANTON, M.** 2002. "Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen". *Theriogenology*, 57: 1695-1706.
- MÜLLER, K.; LABBÉB, C. and ZACHOWSKI, A.** 1994. "Phospholipid transverse asymmetry in trout spermatozoa plasma membrana". *Biochimica et Biophysica Acta- Biomembranes*, 1192: 21-26.
- MÜLLER, K.; POMORSKI, T.; MÜLLER, P. and HERRMANN, A.** 1999. "Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment". *Journal of Cell Science*, 112: 11-20.
- MÜLLER-SCHLÖSSER, F.** 2005. "Avances con el uso de diluyentes libres de yema de huevo en la congelación de semen Bovino". *Actas de resúmenes 6° Simposio Internacional de Reproducción Animal*, 24 al 26 de Junio. Córdoba, Argentina, p.: 317-324.
- NEHRING H., ROTHE, L.** 2003. "Insemination of cryopreserved bull semen portions with reduced sperm numbers after dilution with two egg yolk-free extenders". *Proceedings 15° European A.I. Vets Meeting, Budapest (Hungary)*, 8-11 October. Cattle session: 14-23.

- NÖTHLING, J. O.; GERBER, D.; COLENBRANDER, B.; MAAIKE DIJKSTRA; TYNKE BAKKER; DE CRAMER, K.** 2007. "The effect of homologous prostatic fluid on motility and morphology of dog epididymal spermatozoa extended and frozen in Biladyl with Equex STM paste or Andromed". *Theriogenology*, 67: 264-275.
- NUNES, J.; CORTEEL, J. M.; COMBARNOUS, Y.; BARIL, G.** 1982. "Role du plasma seminal dans la survie in vitro des spermatozoids de bouc". *Reproduction, Nutrition and Development*, 22: 611-620.
- NUR, Z.; DOGAN, I.; GUNAY, U. and SOYLU, K.** 2005. "Relationships between sperm membrane integrity and other semen quality characteristics of the semen of Saanen goat bucks". *Bull Vet. Inst. Pulawy*, 49:183-187.
- OLSON, G. E.; WINFREY, V. P.** 1991. "A comparison of mammalian sperm membranes", In: Dunbar, B. S.; O'Rand, M. G. (eds). "A Comparative Overview of Mammalian Fertilization". New York, USA. Plenum Press, p.: 51-62.
- O'SHEA, T. and WALES, R. G.** 1966. "Effect of casein, Lecithin, Glycerol and storage at 5° C on diluted ram and bull semen". *Australian Journal of Biological Science*, 19: 871-882.
- OLDS-CLARKE, P.** 1990. "Variation in the quality of sperm motility and its relationship to capacitation". *Proc. of the International Symposium on Fertilization in Mammals*, In: Bavister, B.D.; Cummins, J. and Roldan, E.R.S., eds. "Fertilization in mammals". Serono Symposia, Norwell, Massachusetts, USA, p.: 91-99.
- OSTERMEIER, G. C.; SARGEANT, G. A. ; YANDELL, B. S. ; EVENSON, D. P. and PARRISH, J. J.** 2001. "Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape". *Journal of Andrology*, 22: 595-603.
- PADILLA, A. W. and FOOTE, R. H.** 1991. "Extender and centrifugation effect on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa". *Journal of Animal Science*, 69: 3308-3313.
- PALACIOS, L. E. and WANG, T.** 2005. "Egg-Yolk lipids fractionation and lecithin characterization". *JAOCS*, 82 (8): 571-578.
- PARKS, J. E. and GRAM, J. K.** 1992. "Effects of criopreservation procedure on sperm membranes". *Theriogenology*, 38: 209-222.
- PAULENZ, H.; SOLTUM, K.; ÅDNØY, T.; ANDERSEN BERG, K.; SÖDERQUIST, L.** 2005. "Effect of different extenders on sperm viability of back semen stored at room temperature (Technical note)". *Small Ruminant Research*, 59: 889-94.
- PAULENZ, H.; ÅDNØY, T.; FOSSEN, O. H.; SÖDERQUIST, L.; ANDERSEN BERG, K.** 2002. "Effect of deposition site and sperm number on the fertility of sheep inseminated with liquid semen". *The Veterinary Record*, 9: 299-302.
- PAZ, R. G.** 2002. "Sistemas de producción campesinos caprinos de Santiago del Estero: proyección y desafíos para el desarrollo del sector". *FUNDAPAZ*. Santiago del Estero, Argentina. 318 p.

- PELLICER-RUBIO, M-T. and CAMBARNOUS, Y.** 1998. "Deterioration of Goats Spermatozoa in Skimmed Milk-based Extenders as a Result of Oleic Acid Released by the Bulbourethral Lipase BUSgp60". *Journal of Reproduction and Fertility*, 112: 95-105.
- PELLICER-RUBIO, M-T.; MAGALLON, T. and COMBARNOUS, Y.** 1997. "Deterioration of goat sperm Viability is due to a Bulbourethral 60kD Glycoprotein with Triglyceride Lipase Activity". *Biology of Reproduction*, 57: 1023-1031.
- PEREZ, B.; MATEOS, E.** 1996. "Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malaguefia breeds". *Small Ruminant Research* 23: 23-28.
- PEREZ, L. J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A.; MOSES, D.; BALDASARRE, H.** 1996. "Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation *in vitro* as assessed by chlortetracycline assay". *Theriogenology*, 46: 131-140.
- PHILLIPS, N. J.; MCGOWAN, M. R.; JOHNSTON, S. D.; MAYER, D. G.** 2004. "Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires". *Animal Reproduction Science*, 81: 47-61.
- PHILLIPS, P. H.** 1939. "Preservation of bull semen". *Journal of Biological Chemical*, 139: 415.
- POOLE, A. R.; HOWELL, J. I. and LUCY, J. A.** 1970. "Lysolecithin and cell fusion". *Nature*, 227: 810-813.
- POULOS, A.; VOGLMAYR, J. K.; WHITE, I.G.** 1973. "Phospholipid changes in spermatozoa during passage through the genital tract of the bull". *Biochimica et Biophysica Acta*, 306: 194-202.
- PURDY, P. H.** 2006. "A review on goats sperm cryopreservation". *Small Ruminant Research*, 63: 215-225.
- QUINN, P.; KERIN, J. F. and WARNERS, G. M** 1985. "Improved pregnancy rate in human IVF with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid". *Fertility and Sterility*, 44: 493-498.
- QUINN, P. J.; CHOW, P. Y. W. and WHITE, I. G.** 1980. "Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site". *Journal of Reproduction and Fertility*, 60: 403-407.
- QUINN, P. J.; WHITE, I. G. and CLELAND, K. W.** 1969. "Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing". *Journal of Reproduction and Fertility*, 18: 209-220.
- QUINN, P. J. and WHITE, I. G.** 1968. "The effect of pH, cations and protective agents on the susceptibility of ram spermatozoa to cold shock". *Experimental Cellular Research*, 49: 31-39.
- RABASA, A. E.; FERNANDEZ, J. L.; SALDAÑO, S. A.; HOLGADO, F. D. y POLI, M. A.** 2002. "Producción lechera de cabras criollas serranas y saanen-criollas (F1).

- 1 Cantidad de leche producida". *Revista Argentina de Producción Animal*, 22(1): 244-245.
- RANA, A. P. S.; MISRA, S.; MAJUMDER, G.C.; GHOSH, A.** 1993. "Phospholipid Asymmetry of Goat Sperm Plasma Membrane during Epididymal Maturation". *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, 1210 (1-2): 1-7.
- RESTALL, B. J.** 1992. "Seasonal Variations in Reproductive Activity in Australian Goats". *Animal Reproduction Science*, 27: 305-318.
- REVIDATTI, M. A.** 2008. "Recursos Zoogeneticos en la Argentina". IX simposio Iberoamericano sobre conservación y Utilización de Recursos Zoogeneticos. 10 al 12 de Diciembre. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. *Memorias*, Tomo I: 35-47.
- RITAR, A. J.** 1993. "Control of ovulation, Storage of semen and artificial insemination of fibre-producing goats in Australia: a review". *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 33: 807-820.
- RITAR, A. J. and BALL, P. D.** 1993. "The effect of freezing-thawing of goat and sheep semen at a high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination". *Animal Reproduction Science*, 31: 249-262.
- RITAR, A. J.; MENDOZA, G.; SALAMON, S. and WHITE I. G.** 1992. "Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (*Capra hircus*)". *Journal of Reproduction and Fertility*, 95: 97-102.
- RITAR, A. J. and SALAMON, S.** 1991. "Effect of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora Goat spermatozoa". *Small Ruminant Research*, 4: 29-37.
- RITAR, A. J.; BALL, P. D.; O'MAY, P. J.** 1990a. "Artificial insemination of Cashmere goat: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females". *Reproduction Fertility and Development*, 2: 377-384.
- RITAR, A. J.; BALL, P. D.; O'MAY, P. J.** 1990b. "Examination of methods for the deep freezing of goats semen". *Reproduction, Fertility and Development*, 2: 27-34.
- RITAR, A. J. and SALAMON, S.** 1983. "Fertility of frozen-thawed semen of the Angora Goats". *Australian Journal of Biological Science*, 36: 49-59.
- RITAR, A. J.; SALAMON, S.** 1982. "Effect of seminal plasma and its removal and egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen thawed spermatozoa of Angora goats". *Australian Journal of Biological Science*, 35: 305-312.
- RIVERA, G. M.; ALANIS, G. A.; CHAVES, M. A.; FERRERO, S. B. and MORELLO, H. H.** 2003. "Seasonality of estrus and Ovulation in Creole Goats of Argentina". *Small Ruminant Research*, 48: 109-117.

- ROBAYO, I.; MONTENEGRO, V.; VALDES, C. and COX, J. F.** 2008. "CASA Assessment of Kinematic Parameters of Ram Spermatozoa and their Relationship to Migration Efficiency in Ruminant Cervical Mucus". *Reproduction in Domestic Animals*, 43(4): 393-399.
- ROCA, J.; MARTINEZ, E.; VAZQUEZ, J.** 1993. "Seasonal variation in fructose and citric acid in seminal plasma of Murciano-Granadina goats". *Small Ruminant Research*, 10 (3): 219-226.
- ROCA, J.; MARTINEZ, E.; SANCHEZ VALVERDE, M. A.; RUIZ, S. and VAZQUEZ, J.** 1992. "Seasonal variations of semen quality in male goats: study of sperm abnormalities". *Theriogenology*, 38: 115-125.
- ROCA, J.; MARTINEZ, E.; VAZQUEZ, J.; RUIZ, S. and COY, P.** 1991. "Influence of Season on Testicle Size and Libido in Male Goats from the Mediterranean Area". *Animal Productions*, 52: 317-321.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.** 2003. "Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia?". *Reproduction in Domestic Animals*, 38: 312-318.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. and BARTH, A. D.** 2007. "*In vitro* evaluation of sperm quality related to *in vivo* function and fertility". In: *Reproduction in Domestic Ruminants VI*, Ed.: Juengel, J. L.; Murray, J. F. and Smith, M. F. Nottingham University Press, p.: 39-54.
- ROLDAN, D. L.; POLI, M. A.; FERNANDEZ, J. L.; y RABASA, A. E.** 2002. "Producción lechera de cabras criollas serranas y saanen-criollas (F1). 2 Calidad de leche". *Revista Argentina de Producción Animales*, 22 (1): 245-246.
- ROLDAN, E. R. S.; FRAGIO, C.** 1993. "Phospholipase A2 activation and subsequent exocytosis in the Ca²⁺/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa". *Journal of Biological Chemical*, 268: 13962-970.
- ROMANO, J. E.** 2004. "Synchronization of estrus using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the breeding season in Nubian goats". *Small Ruminant Research* 55: 15-19
- ROSSANIGO, C. E.; FRIGERIO, K. L. y SILVA COLOMER, J.** 1995. "La Cabra Criolla Sanluisenseña". *Información Técnica* N° 135. EEA San Luís, Centro Regional La Pampa-San Luís, 21 p.
- ROSSANIGO, C.; FRIGERIO, K.; COLOMER, S.** 1996. "Evaluación del crecimiento, rendimiento y calidad de la carne del cabrito criollo sanluisenseño". *Revista Argentina de Producción Animal*, 16 (1): 3-4.
- ROSSI, M.** 2007. "Use of Lecithin and Lecithin fractions". In: Huopalabti, R.; Lopez Fandiño, R.; Anton M. and Schade, R. (Eds.) "*Bioactive Egg Compounds*". Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, p.: 229-239.
- ROY, A.** 1957. "Egg yolk-Coagulating Enzyme in the Semen and Cowper's Gland of the Goat". *Nature*, 179: 318-319.

- ROY, F.; MAUREL, M-C.; COMBES, B.; VAIMAN, D, CRIBIU, E. P.; LANTIER, I.; PROBEL, T.; DELÉNTANG, F.; COMBARNOUS, Y. and GUILLOU, F.** 1999. "The negative effect of repeated equine chorionic gonadotropin treatment on subsequent fertility in Alpine goats is due to a Humoral Immune response involving the major histocompatibility complex". *Biology of Reproduction*, 60: 805-813.
- RUBIANES, E.; MENCHACA, A.** 2003. "The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats". *Animal Reproduction Science*, 78: 271-287.
- RUBIANES, E.** 2000. "Avances en el Conocimiento de la Fisiología Ovárica de Los pequeños Rumiantes y su Aplicación para el Manejo Reproductivo". *Actas de Fisiología*, 6: 93-103.
- SALISBURY, G. W. and VANDEMARK, N. L.** 1945. "Stimulation of livability and glycolysis by addition of glucose to the egg yolk citrate diluents for ejaculated semen". *American Journal of Phisiology*, 143: 692-697.
- SALISBURY, G. W. y VANDEMARK, N. L.** 1964. "Fisiologia de la Reproduccion e inseminacion artificial de los Bovidos". *Acribia*, Zaragoza, España, 707 p.
- SALING, P. M.** 1989. "Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the eggs". In: Milligan, S.R. (ed.), *Oxford reviews of Reproductive Biology*. Oxford University Press, New York, USA, p.: 339-388.
- SALAMON, S. and MAXWELL, W. C. M.** 2000. "Storage of ram semen". *Animal Reproduction Science*, 62: 77-111.
- SALVADOR, I.; YÁÑIZ, J.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P.; GÓMEZ, E. A.; SILVESTRE, M. A.** 2006. "Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5° C". *Theriogenology*, 66: 974-981.
- SALVADOR, I.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P.; BERNACER, J.; GÓMEZ, E. A. AND SILVESTRE, M. A.** 2005. "Factors Affecting Pregnancy Rate in Artificial Insemination with Frozen Semen During Non-Breeding Season in Murciano–Granadina Goats: a Field Assay". *Reproduction in Domestic Animal*, 40: 526–529.
- SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P. and ROCHE, J. F.** 1988. "Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers". *Journal of Reproduction and Fertility*, 83: 663-671.
- SAWYER, D. E. and BROWN, D. B.** 1995. "The use on an *in vitro* sperm activation assay to detect chemical induced damage of human sperm nuclei". *Reproductive Toxicology*, 9: 351-357.
- SCOTT, M. A.** 2000. "A glimpse at sperm function *in vivo* sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract". *Animal Reproduction Science*, 60-61: 337–348
- SCOTT, T. W.; VOGLMAYR, J. K.; SETCHELL, B. P.** 1967. "Lipids composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa". *Biochemical Journal*, 102: 456-461.

- SCHMEHL, M. K., ANDERSON, S. P., VAZQUEZ, I. A. and GRAHAM, E. F.** 1986. "The effect of dialysis of extended ram semen prior to freezing on post-thaw survival and fertility". *Cryobiology*, 23: 406-414.
- SCHWARZ, T.; WIERZCHOS, E.** 2000. "Relationship between FSH and ovarian follicular dynamics in goats during estrous cycle". *Theriogenology*, 53: 381 (abstract).
- SHANNON, P. and CURSON, B.** 1982. "Kinetics of aromatic L-amino acid oxidase from dead bovine spermatozoa and the effect of catalase on fertility of diluted bovine semen stored at 5 degrees C and ambient temperatures". *Journal of Reproduction and Fertility*, 64: 463-467.
- SHANNON, P. and CURSON, B.** 1971. "Toxic effect and action of dead sperm on diluted bovin semen". *Journal of Dairy Science*, 55 (5): 614-620.
- SHELTON, M.** 1978. "Reproduction and Breeding of Goats ". *Journal of Dairy Science*. 61 (7): 994-1010.
- SHIVAJI, S.; BHARGAVA, P. M.** 1987. "Antifertility factors of mammalian seminal fluids". *Bioessays*, 7:13-17.
- SIAS, B.; FERRATO, F.; PELLICIER-RUBIO, M-T.; FORGERIT, Y.; GUILLOUET, P.; LEBOUF, B. and CARRIÈRE, F.** 2005. "Cloning and seasonal secretion of pancreatic lipase-related protein 2 present in goats seminal plasma". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1686: 169-180.
- SINGER, S. J. and NICHOLSON, G. L.** 1972. "The fluid mosaic model of structure of cell membranes". *Science*, 175: 720-731.
- SIRIOS, J. and FORTUNE, J. E.** 1988. "Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography". *Biology of Reproduction*, 39: 308-317.
- SMITH, A. U.** 1954. "Effects of low temperature on living cells and tissues". In: Harris, R. J. (Ed.). "Biological Applications of Freezing and Drying". New York, USA. Academic Press Inc., p.: 1-62.
- THERIEN, I; BLEAU, S. G. and MANJUNATH, P.** 1995. "Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin". *Biology of Reproduction* 52: 1372-1379.
- TODINI, L.; MALFATTI, A.; TERZANO, G. M.; BORGHESE, A.; PIZILLO, M.; DEBENEDETTI, A.** 2007. "Seasonality of plasma testosterone in male of four mediterranean goats breeds and three different climatic condition". *Theriogenology*, 67: 627-631.
- TRON, J. de L.** 1986. "Capitulo 5: Reproducción". En: Arbiza Aguirre, S. I. (Ed.). "Producción de Caprinos". AGT Editor S.A., Mexico, D.F., p.: 183-234.
- THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F.** 2002. "Comparación of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen". *Theriogenology*, 57: 1087-1094.

- TULSIANI, D. R. ; SKUDLAREK, M. D.; HOLLAND, M. K. and ORGEBIN-CRIST, M. C.** 1993. "Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation". *Biology of Reproduction*, 48: 417–428.
- UPRETI, G. C.; HALL, E. L.; KOPPEN, S. D.; OLIVER, J. E. and VISHWANATH, R.** 1999. "Studies on the measurements of phospholipase A₂ (PLA₂) and PLA₂ inhibitor activities in ram semen". *Animal Reproduction Science*, 56: 107-121.
- UPRETI, G. C.; JENSEN, K.; OLIVER, J. E.; DUGANZICH, D. M.; MUNDAY, R.; SMITH, J. F.** 1997. "Motility of ram spermatozoa during storage in a chemical-defined diluent containing antioxidants". *Animal Reproduction Science*, 48: 269-278.
- URREGO, R.; RÍOS, A.; OLIVERA ÁNGEL, M.; CAMARGO, O.** 2008. "Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos". *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21:19-26
- VALDÉS RODRÍGUEZ, Y. C.; BILBAO DÍAZ, M.; LEÓN ÁLVAREZ, J. L. y MERCHÁN GONZÁLEZ, F.** 2002. "Origen e importancia de la fosfolipasa A₂ de secreción". *Revista Cubana de Farmacia*, 36(2): 121-128.
- VALDIVIA, C.** 2003. "Efecto de la suplementación invernal con fruto de algarrobo y heno de alfalfa sobre la producción de leche de cabras criollas y el crecimiento de los cabritos lechales". Seminario de titulación de Ingeniería de Recursos Raturales para Zonas Áridas. Universidad Nacional de La Rioja, sede Chamental. Carrera: Ingeniería de Recursos Raturales para Zonas Áridas. 46 p.
- VERA, T. A.; LEGUIZA, H. D. y CHAGRA DIB, E. P.** 2008. "Circunferencia escrotal de caprinos criollos en los Llanos de La Rioja: efecto de la estacion". 1° Jornadas internacionales del Instituto de investigación y Tecnología en Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinaria, UBA. 24 al 26 de Septiembre de 2008. Actas de resúmenes, p.: 76.
- VERA, T. A.; CHAGRA DIB, E. P.; LEGUIZA, H. D. and FERRANDO C. A.** 2004a. "Effects of body weight, age and photoperiod on scrotal circumference in criollo argentino male goats". Presentación como Póster en el Simposio de Reproducción de Pequeños Rumiantes, en Colonia del Sacramento, Uruguay, 5 al 6 de agosto.
- VERA, T. A.; CHAGRA DIB, E. P.; LEGUIZA, H. D.; BRIZUELA, R. y VALDIVIA, C. L.** 2004 b. "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, T. A.; BRIZUELA, R.; LEGUIZA, H. D.; CHAGRA DIB, E. P.** 2003a. "Primeros estudios de la calidad seminal de machos caprinos criollos biotipo regional Riojano". 5° Simposio Internacional de Reproducción Animal, Huerta Grande, Córdoba, Argentina. 27-29 de Junio. Actas de resúmenes, p.: 440.
- VERA, T. A.; CHAGRA DIB, E. P.; LEGUIZA, H. D. y VALDIVIA, C. L.** 2003b. "Desempeño reproductivo de cabras criollas biotipo riojano con servicio en las cuatro estaciones del año". *Revista Argentina de Producción Animal*, 23 (1): 268-269.

- VERA, T. A.; CHAGRA DIB, E. P. y LEGUIZA, H. D.** 2002 a. "Evolución de la circunferencia escrotal en caprinos criollos biotipo regional, en los Llanos de La Rioja". *Revista Argentina de Producción Animal*, 22 (1): 271-272.
- VERA, T. A.; CHAGRA DIB, E. P. y LEGUIZA, H. D.** 2002 b. "Influencia de la época del año sobre los valores de circunferencia escrotal de machos caprinos criollos biotipo regional en los Llanos de La Rioja". *Revista Argentina de Producción Animal*, 22 (1): 272-273.
- VISCONTI, P. E.; GALANTINOHOMER, H.; MOORE, G. D., BAILEY, J. L.; NING, X. P.; FORNES, M.; KOPF, G. S.** 1998. "The molecular basis of sperm capacitation". *Journal of Andrology*, 19: 242-248.
- VOS, J. P.; LOPEZ-CARDOZO, M.; GADELLA, B. M.** 1994. "Metabolic and functional aspects of sulfogalactolipids". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1211: 125-149.
- WABEL, C.** 1998. "Intruduction". In: *Disertation in Universität Erlangen, Nürnberg: "Influence of lecithin on estructure and stability of parenteral fat emulsions"*. <http://www2.chemie.uni-erlangen.de/services/dissonline/data/dissertation/Christoph_Wabel/html/chapter1.html#TopOfPage> [Consulta: 16 de Noviembre de 2008]. p.:1-25.
- WALES, R. G.; WHITE, I. G.** 1959. "The susceptibility of spermatozoa to temperature shock". *Journal of Endocrinology*, 19: 211-220.
- WALKDEN-BROWN, S. W., RESTALL, B. J. and HENNIAWATI** 1993. "The Male Effect in the Australian Cashmere Goats. 1. Ovarian and Behavioural Response of Seasonally Anovulatory Does Following the Introduction of Bucks". *Animal Reproduction Science*, 32: 41-53.
- WATSON, P. F. and MARTIN, I. C. A.** 1972. "A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa". *Journal of Reproduction and Fertility*, 28: 99-101.
- WATSON, P. F.** 1981. "The effect of cold shock on sperm cell membranes". In: Morris, G.J., Clarke, A. (eds.), "Effect of low temperatures on biological membranes". Academic Press, London, U.K., p.: 189-218.
- WATSON, P. F.** 1995. "Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function". *Reproduction, Fertility and Development*, 7: 871-891.
- WOLF, J. P.; FENEUX, D.; DUCOT, B.; RODRIGUES, D.; JOUANNET, P.** 1995. "Influence of sperm movement parameters on human sperm-oolemma fusion". *Journal of Reproduction and Fertility* 105: 185-192.
- WOLF, D. E.; MAYNARD, V. M.; MCKINNON, C. A. and MELCHIOR, D. L.** 1990. "Lipid domains in the ram sperm plasma membrane demonstrated by differential scanning calorimetry". *Cell Biology*, 87: 6893-6896.

- WOLF, D. E.; HAGOPIAN, S. S. and ISHIJIMA, S.** 1986. "Changes in Sperm Plasma Membrane Lipid Diffusibility after Hyperactivation during In Vitro Capacitation in the Mouse". *The Journal of Cell Biology*, 102: 1372-1377.
- WILLET, E. L. and SALISBURY, G. W.** 1942. "The effect of various diluents, cooling rate, temperature of storage, and others factors, on the livability of spermatozoa in stored of bull semen". *Cornell University Agr. Expt. Sta. Men. p.*: 249.
- YANAGIMACHI, R.** 1994a. "Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity". *Zygote*, 3: 371-372.
- YANAGIMACHI, R.** 1994b. "Mammalian fertilization". In: Knobil E, Neill J (eds.). *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition. Raven Press. New York, USA, p.:189-317.
- ZEDER, M. and HESSE, B.** 2000. "The initial domestication of goats (*Capra Hircus*) in Zagros Mountains 10,000 years ago". *Science*, 287: 2254-57.
- ZOMBORSZKY, Z.; NAGY, S.; NÁNÁSSY, L.; SZABARI, M.; BODÓ, S.** 2005. "Experiences in deer sperm cryopreservation under practical conditions-A pilot study". *Animal Reproduction Science*, 90: 185-190.

8.-APENDICE

Apendice I

SOLUCIONES

1.1. Preparación de la solución de citrato de sodio 2,92%

La solución de citrato de sodio se preparó el día anterior a ser utilizada y se descartó el sobrante como se detalla a continuación: se pesó 2,92 g de citrato de sodio (Sodium Citrate® Mallincrodt 0754) mezclándose con agua ultra pura c.s.p. 100 ml (Barnstead/ultraline®, modelo D 11931, USA). Una vez homogeneizada la solución, se filtró utilizando un filtro para jeringa de 0,2 µm (Micro Clear® MC 030/02) a un recipiente esterilizado donde permaneció en este recipiente en heladera a 4° C hasta su utilización (Tabla XVII).

Tabla XVII: Componentes de la solución de citrato de sodio 2,92%

Componente	Cantidad (gr)
Citrato de Sodio (Sodium Citrate® Mallincrodt 0754)	2,92
Agua Ultra Pura (Barnstead/ultraline®, modelo D 11931, USA)	100 ml (c.s.p.)

1.2. Preparación de la coloración supravital de eosina-nigrosina

Para la determinación del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos se utilizó la coloración supravital de eosina-nigrosina (2%) descrita por Watson (1990).

Se disolvió 2,94 g de Citrato de Sodio (Sodium Citrate® Mallincrodt 0754), 1 g de eosina (Eosin Y disodium salt ® Sigma E-32617) y 2 g de nigrosina (Nigrosin water soluble ® Sigma N4754) en 100 ml de agua ultra pura (Barnstead/ultraline®, modelo D 11931, USA), en agitador mecánico a 30° C, se ajusta el pH a 6,75 con solución concentrada de ácido cítrico. Se deja reposar a 4° C por 24 h, se entibia a 20° C, se mide y corrige nuevamente el pH si es necesario. Se deja reposar en heladera hasta

que tome temperatura de 4° C y se filtra. Se debe conservar en heladera, convenientemente envasada en frascos chicos y de vidrio opaco (Tabla XVIII).

Tabla XVIII: Componentes de la coloración supravital de eosina-nigrosina (2%)

Componente	Cantidad (gr)
Citrato de Sodio (Sodium Citrate® Mallincrodt 0754)	2,94
Nigrosina (Nigrosin water soluble ® Sigma N4754)	2
Eosina (Eosin Y disodium salt ® Sigma E-32617)	1
Agua Ultra Pura (Barnstead/ultraline ®, modelo D 11931, USA)	100 ml (c.s.p.)

1.3. Solución fisiológica formolada 1%

La preparación de la solución de dilución para el conteo de espermatozoides se logró mezclando 10 ml de solución de formol al 38% (SIGMA® Formaldehyde solution F8775) en 1000 ml de solución fisiológica de ClNa 0,9%. La misma permaneció en envase de vidrio a temperatura ambiente hasta su uso (Tabla XIX).

Tabla XIX: Componentes de la solución formolada 1%

Componente	Cantidad (ml)
Solución de Formol al 38% (Formaldehyde solution ® SIGMA F8775)	1
Solución fisiológica de ClNa 0,9%.	1000

1.4. Preparación de la solución de Tris-Lavado

Siguiendo el protocolo de Cabrera *et al.* (2005) se utilizó como solución de lavado de los espermatozoides la solución madre de TRIS preparada para la dilución seminal, sin agregarle glicerol ni yema de huevo.

La solución se logró mezclando 2,422 g de TRIS (Trizma Base ® SIGMA T1410), 1,34 g de Ácido Cítrico (Citric acid monohydrate ® SIGMA C7129), 1,00 g de Fructosa (D (-) Fructose ® SIGMA F3510), 100.000 UI de Penicilina G ((Benzylpenicilin) Sodium Salt ® SIGMA P3032), 100 mg de Estreptomina (Estreptomicyn sulfate Salt ®

Sigma S9137) en c.s.p. 100 ml de Agua Ultra Pura (Barnstead/ultraline ®, modelo D 11931, USA) (Tabla XX).

Tabla XX: Componentes de la solución de lavado de los espermatozoides (100 ml)

Componente	Cantidad (gr)
TRIS [Hydroxymethyl] Amino-Methane 99,9%] (Trizma Base ® SIGMA T1410)	2,422
Ácido Cítrico (Citric acid monohydrate ® SIGMA C7129)	1,34
Fructosa (D (-) Fructose ® SIGMA F3510)	1,00
Penicilina G ((Benzylpenicilin) Sodium Salt ® SIGMA P3032)	0,060
Estreptomicina (Estreptomicyn sulfate Salt ® Sigma S9137)	0,100
Agua Ultra Pura (Barnstead/ultraline ®, modelo D 11931, USA)	100 ml (c.s.p.)

1.5. Preparación de los diluyentes seminales

Se utilizaron tres diluyentes para congelación de semen caprino. Dos diluyentes de Tris, modificados de los utilizados por Islam *et al.* (2006) y un diluyente comercial sintético libre de yema de huevo.

La solución madre de ambos diluyentes de Tris se logró mezclando 2,422 g de TRIS, 1,34 g de Ácido Cítrico, 1,00 g de Fructosa, 100.000 UI de Penicilina G, 100 mg de Estreptomicina y 5 ml de glicerol. La diferencia entre los diluyentes radicó en el contenido de yema de huevo, por lo tanto, en el caso de Tris con contenido de 2% de yema de huevo, la fórmula se completó con el agregado de 2 ml de yema de huevo y 93 ml de agua ultra pura (Tabla XXI). En cambio, el diluyente de Tris con contenido de 12% de yema de huevo, la fórmula se completó con el agregado de 12 ml de yema de huevo y 83 ml de agua ultra pura (Tabla XXII).

El diluyente comercial sintético utilizado, Bioxcell® (IMV Technologies, Francia), se constituyó según las recomendaciones del fabricante (Tabla XXIII).

Tabla XXI: Componentes del diluyente para congelación Tris 2 % de yema de huevo (100 ml)

Componente	Cantidad (gr)
TRIS [Hydroxymethyl] Amino-Methane 99,9%] (Trizma Base ® SIGMA T1410)	2,422
Ácido Cítrico (Citric acid monohydrate ® SIGMA C7129)	1,34
Fructosa (D (-) Fructose ® SIGMA F3510)	1,00
Penicilina G ((Benzylpenicilin) Sodium Salt ® SIGMA P3032)	0,060
Estreptomocina (Estreptgomicyn sulfate Salt ® Sigma S9137)	0,100
Glicerol 99% (Glycerol ® Sigma G2025)	5 ml
Yema de huevo	2 ml
Agua Ultra Pura (Barnstead/ultraline ®, modelo D 11931, USA)	93 ml

Tabla XXII: Componentes del diluyente para congelación Tris 12 % de yema de huevo (100 ml)

Componente	Cantidad (gr)
TRIS [Hydroxymethyl] Amino-Methane 99,9%] (Trizma Base ® SIGMA T1410)	2,422
Ácido Cítrico (Citric acid monohydrate ® SIGMA C7129)	1,34
Fructosa (D (-) Fructose ® SIGMA F3510)	1,00
Penicilina G ((Benzylpenicilin) Sodium Salt ® SIGMA P3032)	0,060
Estreptomocina (Estreptgomicyn sulfate Salt ® Sigma S9137)	0,100
Glicerol 99% (Glycerol ® Sigma G2025)	5 ml
Yema de huevo	12 ml
Agua Ultra Pura (Barnstead/ultraline ®, modelo D 11931, USA)	83 ml

Tabla XXIII: Componentes del diluyente para congelación Bioxcell® (100 ml)

Componente	Cantidad (ml)
Bioxcell QSF® (IMV Technologies, Francia 006584)	20
Agua Ultra Pura (Barnstead/ultraline ®, modelo D 11931, USA)	80

1.6. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ENDÓSMOSIS O HIPOOSMÓTICA Y SOLUCIÓN DE HOS STOP

La solución de Hos Test se constituyó siguiendo el protocolo de Paulenz *et al.* (2002).

La misma se logró mezclando 0,49 g de citrato de sodio y 0,90 g de fructosa en 100 ml de agua ultra pura. Se controlaba la osmolaridad (varió entre 98 y 105 mOsm/L) y si era necesario se ajustó el pH entre 6,8-7,1 con solución concentrada de ácido cítrico. Una vez homogeneizada la solución se filtró a un recipiente esterilizado a través de filtro para jeringa de 0,2 μm (Micro Clear® MC 030/02), permaneciendo en este recipiente en heladera a 4° C hasta su utilización (Tabla XXIV).

Tabla XXIV: Componentes de la solución de endósmosis o hipoosmótica

Componente	Cantidad (gr)
Citrato de Sodio (Sodium Citrate® Mallinckrodt 0754)	0,49
Fructosa (D (-) Fructose® SIGMA F3510)	0,90
Agua Ultra Pura (Barnstead/ultraline®, modelo D 11931, USA)	100 ml (c.s.p.)

La solución para estabilizar las membranas o solución Hos stop se constituyó agregando a un ml de la solución hipoosmótica madre el 3% de formol al 38% (SIGMA® Formaldehyde solution F8775). La misma permaneció en ependorff en heladera a 5° C hasta su uso (Tabla XXV).

Tabla XXV: Componentes de la solución de Hos Formol 3%

Componente	Cantidad (ml)
Solución de Hos Test	1
Solución de Formol al 38% (Formaldehyde solution® SIGMA F8775)	3 μl

Apendice II

LECITINA DE SOJA, DE YEMA DE HUEVO Y FOSFOLIPASAS

- Lecitina de huevo y lecitina de soja:

Como la mayoría de los autores se refieren a la “lecitina” como un compuesto en singular, es la denominación que predomina. Pero técnicamente, debería emplearse el plural “lecitinas”, ya que se trata de un conjunto de compuestos y no uno solo de ellos.

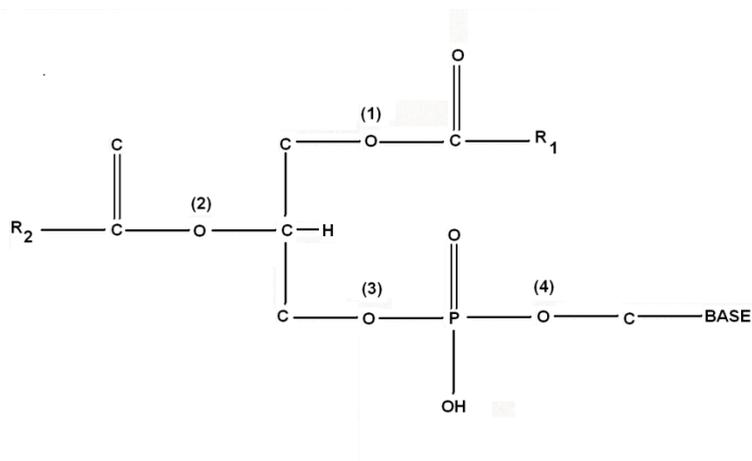
Las lecitinas, componen la fracción fosfatídica de los lípidos de la yema de huevo y aceites de numerosas semillas vegetales (ej.: soja). El término “lecitina” es utilizado también como sinónimo de “fosfatidilcolina”, la fracción fosfatídica más importante aislada de la yema de huevo y la soja (Rossi, 2007). El cuadro XXVI muestra la composición de fosfolípidos encontrada en las lecitinas de dos de las fuentes más importantes, la yema de huevo y la soja (Tabla XXVI).

Tabla XXVI: Composición relativa (%) de fosfolípidos encontrada en las lecitinas de la yema de huevo y la soja (*a* Kuksis, 1985 y *b* Weber 1985, citados por Rossi, 2007; Wabel, 1998).

Componente	%	
	Yema de Huevo <i>a</i>	Soja <i>b</i>
Fosfatidilcolina	66-76	33
Fosfatidiletanolamina	15-24	14,1
Fosfatidilserina	1	0,4
Fosfatidilinosito	-	16,8
Acido Fosfatídico	-	6,4
Lisofosfatidilcolina	3-6	0,9
Lisofosfatidiletanolamina	3-6	0,2
Esfingomielina	3-6	-

La estructura del glicerofosfolípido es como se muestra a continuación (Figura XIX), donde en el carbono 3, éste se une a una “BASE”, normalmente un alcohol, la cabeza polar (hidrofílica) de los fosfolípidos, en los R₁ y R₂ se enlazan los ácidos grasos.

Figura XIX: Estructura básica de los glicerofosfolípidos (Wabel, 1998; Valdés Rodríguez *et al.*, 2002; De María *et al.*, 2007; Rossi, 2007).



El alcohol que se une a la “BASE” es el que define el nombre del fosfolípido, por Ej.: si se une a una colina el fosfolípido se llamara fosfatidilcolina o lisofosfatidilcolina; si se une una etanolamina el fosfolípido se llamará fosfatidiletanolamina o lisofosfatidiletanolamina o si se une a un inositol el fosfolípido se llamara fosfatidilinositol (Rossi, 2007).

Pero lo que diferencia la composición del fosfolípido que encontramos en la yema de huevo o en la soja son los ácidos grasos que se unen a los carbonos 1 y 2 por un enlace éster (R₁ y R₂) por ej.: normalmente en la posición R₁ se une un ácido graso saturado (palmítico o esteárico), en cambio en la posición R₂ se encuentra normalmente un ácido graso insaturado (oleico, linoleico, linolénico, araquidónico; Rossi, 2007).

Considerando la composición relativa de ácidos grasos en los fosfolípidos constitutivos de la yema de huevo y de la soja, el largo de cadena dominante en ambas lecitinas son los de 16 y 18 carbonos (Tabla XXVII; Palacios; Wang, 2005; Rossi, 2007).

Tabla XXVII: Composición relativa de ácidos grasos en los fosfolípidos de la yema de huevo y de la soja (Wabel, 1998; Palacios *et al.*, 2005).

		%					
Fosfolípidos		Palmítico (C16:0)	Esteárico (C18:0)	Oleico (C18:1)	Linoleico (C18:2)	Linolénico (C18:3)	Araquidónico (C20:4)
Soja	Fosfatidilcolina	11,2	11,9	8,6	58,6	9,9	-
	Fosfatidil-etanolamina	16,0	8,3	6,8	57,3	11,7	-
	Fosfatidilinositol	22,2	19,3	6,1	43,4	9,3	-
Yema de huevo	Fosfatidilcolina	31,6-43,6	11,6-17,3	27,5-31,4	5,3-16,2	0,1-1,0	2,7-4,3
	Fosfatidil-etanolamina	16,7-33,4	24,3-31,5	15,0-27,6	5,4-11,2	-	12,5-15,8

- Fosfolipasas:

Las fosfolipasas son un grupo de enzimas muy distribuidas en la naturaleza y los organismos superiores las utilizan en un sinnúmero de reacciones. Existen dos grandes clases de fosfolipasas A_2 (FLA₂), las fosfolipasas A_2 intracelulares o citosólicas, de peso molecular elevado (40 a 85 KDa) y las fosfolipasas A_2 de secreción, de peso molecular bajo (13 a 18 KDa) (Valdés Rodríguez *et al.*, 2002; De María *et al.*, 2007). Esta clasificación y el peso molecular característico para cada clase de fosfolipasa A_2 , coincide con la fosfolipasa A_2 descrita en el caprino cuyo origen es la glándula bulbouretral (Pellecir-Rubio *et al.*, 1997 y 1998, Sias *et al.*, 2005).

Las fosfolipasas reaccionan con los glicerofosfolípidos, hidrolizando los grupos acilo esterificados en las posiciones sn-1 (Fosfolipasa A_1) y sn-2 (Fosfolipasa A_2) (Figura XX; Valdés Rodríguez, *et al.*, 2002; De María *et al.*, 2007). Aunque, la mayoría de los estudios sobre fosfolipasa han sido realizados utilizando como sustrato la 3-sn-fosfatidilcolina (lecitina), otras fosfolipasas responden de modo similar si las condiciones de hidrólisis se ajustan a las necesidades de la reacción.

Como muestra la Figura XX, se puede observar que estas enzimas hidrolizan las cuatro funciones éster señaladas en la misma (1, 2, 3 y 4). A esta capacidad de hidrolizar estos enlaces éster, le deben su nombre: "Fosfolipasa" y según sobre cual de estos enlaces éster actúan, será su denominación en A_1 , A_2 ; C o D.

et al., 2007). El lisofosfolípido es el compuesto tóxico de esta degradación (Wabel, 1998; De María *et al.*, 2007).

Por su parte, los lisofosfolípidos ó lisofosfolipasas tienen una especificidad muy pronunciada por el enlace sn-1 y catalizan la hidrólisis de los ácidos grasos de los sustratos en el siguiente orden: oleico > esteárico > palmítico > mirístico (Valdez Rodríguez *et al.*, 2002), casi todos presentes en la composición relativa de ácidos grasos que conforman los fosfolípidos o lecitinas, tanto de la yema de huevo como de la soja. Presencia que juntamente con la fosfolipasa A₂, incrementaría los efectos nocivos sobre los espermatozoides.