



**Estudio de antioxidantes como preservantes de semen caprino para mejorar
los procesos reproductivos controlados.**

Ortega Quezada, María Soledad

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención de Ingeniera en Biotecnología

Torres Arias, Marbel, Ph.D

02 de septiembre de 2021

Document Information

Analyzed document	Ortega Soledad_Trabajo de titulación a Analizar.pdf (D111834002)
Submitted	8/30/2021 3:22:00 PM
Submitted by	
Submitter email	biblioteca@espe.edu.ec
Similarity	2%
Analysis address	ilbbioteca.GDC@analysis.orkund.com



Sources included in the report

SA	Trabajo de Titulación.pdf Document Trabajo de Titulación.pdf (D109472821)		1
W	URL: https://iracbiogen.com/wp-content/uploads/2021/01/Evaluacion-de-semen-bovino-utilizando-medios-comerciales-de-criopreservacion-provincia-de-morona-santiago-Ecuador-Calle-Crespo.pdf Fetched: 5/16/2021 10:43:42 PM		1
SA	TESIS Comparacion de tris dilutpres en la crioconservacion y viabilidad espermatica de semen capeino.Doc Final.docx Document TESIS Comparacion de tris dilutpres en la crioconservacion y viabilidad espermatica de semen capeino.Doc Final.docx (D47911781)		1
W	URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Geometric_series Fetched: 8/30/2021 3:23:00 PM		1
W	URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6408789/ Fetched: 8/30/2021 3:23:00 PM		2
W	URL: https://math.stackexchange.com/questions/3557337/if-fr-rr1r2r3-simplify-fr1-fr-and-use-your-result-to-find Fetched: 8/30/2021 3:23:00 PM		2
W	URL: https://www.slideshare.net/vidallavoratto/evaluacin-de-preservantes-para-salmuera-diciembre-2010 Fetched: 8/30/2021 3:23:00 PM		1
W	URL: https://docplayer.es/81510189-Universidad-mayor-de-san-andres-facultad-de-agronomia-carrera-de-ingenieria-agronomica.html Fetched: 6/14/2021 4:44:00 PM		1



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Estudio de antioxidantes como preservantes de semen caprino para mejorar los procesos reproductivos controlados.**” fue realizado por la señorita **Ortega Quezada, María Soledad** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 24 de agosto del 2021



firmado electrónicamente por:

**MARBEL
TORRES**

.....
Torres Arias, Marbel, PhD

C. C 1802949154



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Ortega Quezada, María Soledad**, con cédula de ciudadanía n°1105993768, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Estudio de antioxidantes como preservantes de semen caprino para mejorar los procesos reproductivos controlados**, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 24 de agosto del 2021

Ortega Quezada, María Soledad

C.C.: 1105993768



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Ortega Quezada, María Soledad**, con cédula de ciudadanía n°1105993768, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Estudio de antioxidantes como preservantes de semen caprino para mejorar los procesos reproductivos controlados**, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 24 de agosto del 2021

Ortega Quezada, María Soledad

C.C.: 1105993768

Dedicatoria

A mis padres Carlos y Luz y a mis hermanos Juan, Yomi y Nadia. Su apoyo incondicional y la motivación que me han brindado en cada paso de mi vida me han permitido superarme a mi misma. Los amo.

-María Soledad Ortega Quezada-

Agradecimientos

Quiero agradecer primeramente a mi familia, el pilar fundamental de mi vida. A mi mamita, por su cariño y amor, por haberme levantado el ánimo cuando más lo necesitaba y siempre guiarme a pesar de la distancia. A mi papito por su amor, sus consejos, por enseñarme a volar alto y por siempre apoyarme en lo que me he propuesto. A mis hermanos Juan Carlos, Yomi y Nadia por ser mi energía y motivación, por hacerme reír siempre con sus ocurrencias y por siempre impulsarme a seguir adelante. Muchas gracias familia son mi más grande inspiración.

A mi directora, Marbel Torres Ph.D., por haberme dado la oportunidad de trabajar junto a ella y guiarme en la elaboración de este trabajo, por darse tiempo para todos nosotros y ayudarnos siempre.

Al Dr. Lenin Aguirre Ph.D., por orientarme también en la elaboración de este proyecto, por su tiempo y permitirme trabajar en el Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

Al Ing. Ramiro Jiménez por autorizar mi estancia en el Centro Binacional de Formación Técnica Zapotepamba y permitirme usar las instalaciones del lugar.

A mi tío, Dr. Benjamín Quezada por sus consejos y apoyo en la realización de este trabajo.

A la Dra. Melania Uchuari y al Dr. Hugo Viñan por su guía para la preparación de reactivos y ayuda en la obtención de muestras.

A mis grandes amigos Cinthya, Carlitos, Nathy, Myri, Naty, Pris y David por siempre haberme motivado no solo en la realización de este proyecto, sino a lo largo de la carrera, los quiero mucho.

Índice de Contenido

Dedicatoria	1
Agradecimientos.....	7
Índice de Contenido	8
Índice de tablas	10
Índice de figuras	11
Listado de Abreviaturas.....	12
Resumen	13
Abstract.....	14
Capítulo I: Introducción.....	15
Antecedentes	15
Justificación e importancia	17
Objetivos Generales y Específicos	20
Objetivo General:.....	20
Objetivos Específicos:	20
Capítulo II: Marco teórico	21
Ganado caprino	21
Ganado caprino en Ecuador	23
Reproducción del ganado caprino	26
Manejo programado de reproducción en caprinos	29
Conservación y análisis seminal	31
Conservantes seminales	34
Agentes antioxidantes	36
Retinol (Vitamina A).....	38
Vitamina C (Ácido ascórbico).....	39
Tocoferol (Vitamina E).....	39
Selenio	40
Célula espermática y agentes antioxidantes en la preservación seminal	40
Capítulo III: Metodología	46
Localización Geográfica	46
Preparación de los animales	46
Toma de muestras	47
Preparación de solución dilutora	48
Tratamientos con los antioxidantes	48
Conservación y análisis de las muestras seminales	50
Color, volumen y pH	51

Concentración seminal	51
Motilidad total y progresiva seminal	52
Viabilidad y morfología seminal	52
Análisis de datos	53
Capítulo IV: Resultados y Discusión.....	55
Evaluación seminal inicial.	55
Evaluación de motilidad seminal total, progresiva y viabilidad seminal.....	61
Capítulo V: Conclusiones.....	74
Capítulo VI: Recomendaciones.....	76
Referencias	77
Anexos.....	87

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Clasificación de las razas caprinas según su producción.....</i>	23
Tabla 2 <i>Características y ubicación del ganado caprino en Ecuador.....</i>	25
Tabla 3 <i>Escala subjetiva para la descripción de la motilidad seminal total</i>	33
Tabla 4 <i>Ventajas y desventajas de componentes de conservantes seminales.....</i>	35
Tabla 5 <i>Sementales seleccionados para la obtención de muestras y las medidas de las características principales.....</i>	47
Tabla 6 <i>Tratamientos empleados en la investigación</i>	49
Tabla 7 <i>Cantidad de antioxidante a usar para un volumen de 2 ml.....</i>	49
Tabla 8 <i>Nomenclatura usada para nombrar cada alícuota a analizar</i>	53
Tabla 9 <i>Valores obtenidos de volumen, pH, concentración, morfología anormal y color por seminal</i>	55
Tabla 10 <i>Valores obtenidos de las anormalidades morfológicas encontradas.....</i>	60
Tabla 11 <i>Valores obtenidos de motilidad total seminal para cada tratamiento según escala subjetiva de Hafez&Hafez.....</i>	68

Índice de figuras

Figura 1. Razas caprinas de mayor importancia comercial.....	22
Figura 2. Principales razas caprinas en Ecuador.....	24
Figura 3. Cabra “Chusca Lojana”	26
Figura 4. Representación esquemática de “Efecto macho”	31
Figura 5. Daños morfológicos de los espermatozoides.	33
Figura 6. Ejemplos de agentes antioxidantes.	37
Figura 7. Estructura del espermatozoide.	41
Figura 8. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las mitocondrias de espermatozoides que conduce a una reducción de la calidad del esperma.....	42
Figura 9. Desequilibrio ROS y Antioxidantes en el semen y sus consecuencias. ...	45
Figura 10. Esquema de la división de la muestra para su posterior análisis con el antioxidante y en los tiempos correspondientes.....	50
Figura 11. Muestra Seminal	51
Figura 12. Tinción Eosina-Nigrosina para viabilidad seminal.....	53
Figura 13. Comparación de los volúmenes y concentración obtenidos por cada seminal	58
Figura 14. Porcentaje de la morfología anormal seminal de cada seminal	59
Figura 15. Anormalidades espermáticas encontradas en las muestras seminales. .	60
Figura 16. Viabilidad, motilidad total y motilidad progresiva seminal iniciales por seminal.....	61
Figura 17. Influencia del tiempo en las variables viabilidad seminal, motilidad total y motilidad progresiva seminal.	63
Figura 18. Efecto de los tratamientos en la viabilidad seminal.....	66
Figura 19. Efecto de los tratamientos en la motilidad seminal total.....	68
Figura 20. Efecto de los tratamientos en la motilidad seminal progresiva.	70

Listado de Abreviaturas

ROS Especies reactivas de oxígeno.

MT Motilidad total.

MP Motilidad progresiva

IA Inseminación artificial

BL Blanco lechoso

Resumen

En este trabajo se analizó el efecto del tiempo y de la adición de 4 antioxidantes, vitamina A (2µg/ml), vitamina E (0,95 µl/ml), vitamina C (8,5 mg/ml) y Selenio (1 µg/ml) en la calidad de semen caprino de la cabra criolla "Chusca Lojana" con el fin de diseñar un protocolo de preservación seminal para mejorar programas de reproducción. Para ello se hizo uso del conservante comercial Triladyl en los tiempos de análisis 0, 6, 12, 24 y 36 h a 5 °C. Se tomaron muestras de 5 caprinos machos y se realizaron tres repeticiones por cada semental, el método de colecta seminal fue mediante electroeyaculación y las variables analizadas fueron el volumen obtenido, la concentración seminal, morfología inicial, la viabilidad total, motilidad total y motilidad progresiva seminal. Los resultados mostraron que en el análisis inicial (t=0h) todas las variables a excepción de la concentración se mantuvieron en los parámetros esperados para los 5 machos. A su vez se encontró que en todos los tratamientos el tiempo influyó a que se diera un declive de los parámetros viabilidad total, motilidad total y motilidad progresiva seminal. En cuanto a la influencia de los antioxidantes, con los tratamientos vitamina E (0,95 µl/ml) y con el Selenio (1 µg/ml) se obtuvieron mejores resultados en los parámetros analizados en comparación a los obtenidos con el grupo control especialmente en la hora 36 post colecta. Debido a ello se concluye que el protocolo para conservación seminal con fines de su uso en programas de reproducción (inseminación artificial) de la cabra criolla "Chusca Lojana" se puede llevar a cabo con temperatura de 5°C, conservante comercial Triladyl (1:10), adición externa de los antioxidantes vitamina E o Selenio por un período de tiempo de 0 a 36h.

Palabras clave

- **PRESERVACIÓN SEMINAL**
- **ANTIOXIDANTES**
- **GANADO CAPRINO**

Abstract

In this work, the effect of time and the addition of 4 antioxidants, vitamin A (2µg / ml), vitamin E (0.95 µl / ml), vitamin C (8.5 mg / ml) and Selenium (1 µg / ml) in the quality of goat semen from the Creole goat "Chusca Lojana" was analyzed, in order to design a seminal preservation protocol to improve breeding programs. The commercial extender Triladyl was used and the analyzes were done at 0, 6, 12, 24 and 36 h at 5 ° C. For this, samples of 5 males caprin were taken and three repetitions were carried out for each animal, the seminal collection method was by electroejaculation and the variables analyzed were the volume obtained, seminal concentration, initial morphology, viability, total motility and progressive motility. The results showed that in the initial analysis (t = 0h) all the variables except for the concentration remained within the expected parameters for the 5 males. Moreover, it was found that in all treatments time influenced a decline in the parameters of viability, total motility and progressive motility. Regarding the influence of antioxidants, with the vitamin E (0.95 µl / ml) and Selenium (1 µg / ml) treatments, better results were obtained in the parameters analyzed compared to those obtained with the control group, especially at hour 36 post collection. Due to this, it is concluded that the protocol for seminal conservation for the purpose of its use in reproduction programs (artificial insemination) of the Creole goat "Chusca Lojana" can be carried out at a temperature of 5 ° C, commercial preservative Triladyl (1: 10), external addition of the antioxidants vitamin E (0.95 µl / ml) or Selenium (1 µg / ml) for a period of time from 0 to 36 hours.

Keywords

- **SEMINAL PRESERVATION**
- **ANTIOXIDANTS**
- **GOAT CATTLE**

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

Actualmente se usan e investigan en cada una de las especies de animales, diversos métodos y técnicas que permitan una óptima preservación seminal, ya sea para un corto tiempo (refrigeración) o para un largo tiempo (congelación), procesos que tienen como finalidad la conservación de especies amenazadas y en peligro de extinción, mejoramiento y preservación de material genético, el mejoramiento de los niveles productivos en los sistemas de manejo, etc (Sun et al., 2020).

De acuerdo con Küçük et al. (2014), se puede aumentar la productividad pecuaria al permitir una exitosa perpetuación de genes deseables mediante la preservación de pajuelas seminales de buena calidad espermática. Existen varios procedimientos de preservación, así como diversos tipos de conservantes de preservación seminal para diferentes especies ya sean bovinos, ovinos, caprinos, equinos, etc., esperando con ello minimizar los efectos perjudiciales a la que los espermatozoides se enfrentan una vez producida la extracción seminal, efectos sobre todo en la movilidad seminal, viabilidad, morfología, membrana plasmática, acrosoma e integridad del ADN (Lieberman et al., 2016).

En la búsqueda de procesos óptimos para la conservación de muestras seminales, Phillips & Lardy, (1940) empiezan a usar la yema de huevo como agente protector de los espermatozoides contra el shock térmico, gracias a los fosfolípidos y lipoproteínas que esta posee. Luego de ello gracias a Salisbury et al., (1941) se logra mejorar el medio adicionando también citrato de sodio, logrando que el semen pueda ser conservado hasta por tres días a 5° C, sin embargo, un mayor éxito se logra al congelar las muestras seminales usando glicerina. Años después, en 1950 en investigaciones realizadas en la Universidad de Cornell se descubren los beneficios de usar antibióticos (penicilina, estreptomycin, polimixina B) en la preservación seminal, fármacos usados aún en la actualidad (Foote & Bratton,

1950). Para 1953, Sherman introduce un método simple para preservar el esperma de humanos, usando glicerol. Se usó esta sustancia junto con enfriamiento lento y almacenamiento con dióxido de carbono sólido como refrigerante. Luego se logró demostrar también que los espermatozoides conservados a bajas temperaturas pueden ser usados luego para fertilizar el óvulo e inducir un desarrollo normal del embrión (Ombelet & Van Robays, 2015).

En la actualidad aún se analizan procedimientos que puedan beneficiar a una óptima preservación seminal, por ejemplo, típicamente el plasma seminal contiene antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, sin embargo su acción de protección contra el estrés oxidativo son significativamente reducidas luego de la dilución en el extensor previo a la preservación, es por ello que se está estudiando también el uso de antioxidantes en el medio para preservación seminal, ya sea para congelación o refrigeración (Mohsen Al-Mutary, 2020). El desarrollo de protocolos en los que se utilizan ciertos antioxidantes puede mejorar la capacidad de los espermatozoides para protegerse contra los efectos oxidativos que se producen durante la preservación del semen. Por tanto, estos mecanismos pueden ayudar a optimizar los resultados en esta rama de la biotecnología animal.

Las investigaciones en preservación seminal se han realizado en diferentes especies animales, entre ellas en el ganado caprino. La adaptación de esta especie a entornos rústicos ha permitido que sea un tipo de ganado de suma importancia para el diario vivir de muchas poblaciones rurales de diversas partes del mundo. Según Gioffredo & Petryna, (2010), la leche de cabra tiene un alto valor nutricional especialmente para los niños. Del ganado caprino se puede obtener leche, carne, cuero, abono, fibras, productos muy apreciados en el mundo comercial, y es aprovechado por el ser humano desde que este descubrió la agricultura, hace más de 10.000 años (Simões et al., 2021).

Justificación e importancia

Según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), en las últimas décadas ha ocurrido un aumento importante de la demanda mundial de productos de origen animal, que para el año 2050 se incrementará hasta un 70% Pophiwa et al.,(2020), destaca que entre este grupo de animales se encuentra el ganado caprino, la carne de cabra está ganando popularidad en todo el mundo debido a la creciente demanda de carne magra y nutritiva.

La población caprina se encuentra distribuida alrededor del mundo con un aproximado de mil millones de ejemplares, de los cuales el 98% de la población y el 76% de las razas de cabras, se encuentran en países en desarrollo (Pophiwa et al., 2020), los cuales son manejados generalmente en forma extensiva y en áreas bastante desfavorecidas, debido a ello es importante contar con sistemas de producción adecuados y aplicando tecnologías de fácil adaptación y útiles en el manejo de los mismos. En un sistema de producción, el mejoramiento animal es básico para lograr incrementos productivos sobre la base del potencial genético del animal (Salvatierra & Contreras, 2017). Además de acuerdo con Mojapelo & Lehloenya, (2019), el potencial de reproducción de los animales de granja está principalmente influenciado por la selección de estrategias apropiadas que mejoren el desempeño reproductivo como por ejemplo la inseminación artificial.

Lamentablemente la producción de caprinos en el país no genera divisas como la producción de otros animales (pollo, cerdo o bovinos), por lo que, debido a su poca influencia sobre el PIB nacional, no se han realizado suficientes estudios con ellos (Villacrés, Ortega, & Chávez, 2017). Sin embargo, en algunas localidades de Ecuador (Zapotillo, Macará, Santa Elena, entre otras), el ganado caprino es una fuente de ingresos económicos importantes sobre todo para las familias de escasos

recursos económicos, así como también forma parte de la cultura gastronómica de estas zonas.

Además en las zonas del bosque seco de la provincia, el ganado caprino es de los pocos animales capaces de adaptarse a las condiciones climáticas hostiles de ese ambiente (Román Aguirre, Loarte Tene, & Larrea Silva, 2018). Debido a esto es de suma importancia incrementar el número de investigaciones en el país en referencia a esta especie para mejorar su conservación, reproducción, sanidad y crianza. Para la conservación y reproducción, el uso de la inseminación artificial puede ser una herramienta de gran ayuda, sin embargo, para el almacenamiento a largo plazo, el semen se debería preservar a temperatura ultrabajas en nitrógeno líquido (-196 °C). No obstante, el almacenamiento criogénico es caro e inaccesible para la mayoría de los pequeños criadores de cabras en entornos remotos, como sucede en muchas localidades rurales del país. En estas circunstancias, una posible solución sería el almacenamiento de semen fresco en condiciones óptimas de conservante y temperatura para uso a corto plazo (24-48 h) (Gororo et al., 2019).

La inseminación artificial en caprinos es una alternativa para lograr el beneficio de los sementales valiosos, que son genéticamente superiores. El semen seleccionado puede ser utilizado para inseminación artificial en forma fresca, refrigerada o congelada (Martinez et al., 2008). En este sentido el uso de semen refrigerado es relativamente común en cabras, y las hembras son generalmente inseminadas con semen refrigerado dentro de las primeras 24 h de almacenamiento. Según (Gibbons, Cueto, & Wolff, 2017) el semen de esta especie diluido y puesto en refrigeración a 5°C debe ser usado preferiblemente por períodos de tiempo de hasta las 8-12 horas de conservación, debido a que luego de ello su poder de fecundación comienza a disminuir. Por otro lado, (Sadeghi et al., 2020) analizaron la calidad seminal a 5°C por 48 horas y encontraron que a partir de la hora 24 esta comenzó a caer drásticamente.

Así mismo se han validado protocolos de inseminación artificial que incluyen una o dos inseminaciones durante un período de 24 horas determinado por la aparición del estro (Leboeuf et al., 2008). Según Premrov et al., (2018), los espermatozoides de caprinos son muy susceptibles al shock térmico y el conservante usado es un importante factor en el procesamiento del semen. La yema de huevo y la leche desnatada son los ingredientes más comunes de los diluyentes utilizados para la preservación seminal, gracias a los efectos beneficiosos sobre la viabilidad de los espermatozoides durante el proceso de refrigeración o congelación. Sin embargo, aun con estas técnicas los espermatozoides pueden presentar porcentajes elevados de mortalidad, deformaciones o bajos niveles de motilidad. Además, altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados hacen que la membrana plasmática de los espermatozoides sea muy susceptible al estrés oxidativo y, en particular a la peroxidación lipídica debido a las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Actualmente, no se tienen suficientes datos sobre los efectos de diversos antioxidantes que se pueden utilizar en la conservación del semen de los animales domésticos o especies menores como son los caprinos en periodos cortos de tiempo, este desconocimiento puede ser responsable de los resultados poco satisfactorios obtenidos en algunas especies tras usar los espermatozoides preservados en técnicas de reproducción asistida, como la inseminación artificial y la fecundación *in vitro* (Guerra et al., 2013). Es por esto que realizar este tipo de investigaciones en esta área es de suma importancia para obtener mayores conocimientos en caprinos.

Por lo tanto con este trabajo de investigación se plantea estandarizar un método de preservación de bajo costo para semen caprino con alto porcentaje de viabilidad, permitiendo la conservación del material genético de la cabra criolla (Chusca Lojana) de la zona del bosque seco de la provincia de Loja, animal valioso

para esta zona debido a su elevada capacidad de adaptación y rusticidad, así como también por su relevancia para los pequeños productores dependientes del ganado caprino (Vargas et al., 2016).

Objetivos Generales y Específicos

Objetivo General:

Diseñar un protocolo de preservación seminal en caprinos para mejorar el ciclo reproductivo programado en la zona del bosque seco de la Provincia de Loja.

Objetivos Específicos:

- Determinar el tipo de antioxidante adecuado que prolongue la calidad del semen caprino a temperatura de 5°C.
- Evaluar los diferentes tratamientos mediante una curva de viabilidad seminal.
- Estandarizar el protocolo de manejo reproductivo programado con el uso del semen refrigerado en caprinos.

Capítulo II: Marco teórico

Ganado caprino

La cabra doméstica (*Capra aegagrus hircus*) es una especie perteneciente a los pequeños rumiantes, criada especialmente por su leche, carne, piel y pelaje. A diferencia del ganado vacuno y ovino, las cabras son principalmente animales ramoneadores y tienen una dieta vegetal extremadamente variada que les ha permitido adaptarse a muchos entornos diversos.

Alrededor del mundo hay cerca de un centenar de razas caprinas (De La Rosa, 2011). La adaptación de esta especie a zonas altamente adversas en comparación a otras especies ha permitido que este ganado sea de alta importancia para las zonas, en su mayoría rurales, en las que habitan ya sea para obtención de leche o carne. Las razas caprinas de mayor importancia son: Saanen, Toggenburg, Alpina francesa, Granadina, Angora, Cachemira, Boer, Anglo Nubian, Nubian Americana y la Criolla (cruce de cabras, usadas especialmente en zonas rurales) (Figura 1).

Figura 1

Razas caprinas de mayor importancia comercial.



Nota. Adaptado de Goat Breeds, por Boer Goat Profits Guide, 2018, BGPG (<https://www.boergoatprofitsguide.com/raising-goats-for-profit/>)

A partir de las cabras se puede obtener gran variedad de productos (Tabla 1), ciertas razas son mejores para la producción ya sea de leche, carne o pelaje o incluso algunas pueden tener doble propósito, es por ello que la clasificación de las razas caprinas puede ser dividida según de donde sea su origen o según su aptitud productiva. Entre las razas productoras de leche se encuentran las cabras Toggenburg, Alpina francesa, Granadina, Nubian Americana y Saanen, esta última siendo de las favoritas por lecherías comerciales debido a su alta producción de leche y temperamento tranquilo (Capgenes, 2013). Su leche contiene 13% menos concentración de lactosa y 15% de calcio extra en comparación a la leche vacuna,

además de ser de más fácil digestión. Adicionalmente si bien el contenido de fosfolípidos es similar tanto en cabras como en vacas, en la leche de cabra hay mayor cantidad de esfingomielina, de interés en el desarrollo cognitivo (Bidot, 2017).

Por otro lado, para las cabras de carne destaca la cabra Boer, esta raza es usada ampliamente por su buena producción de carne, gran estructura ósea y músculos bien desarrollados. A diferencia de otras especies (Saanen (65kg), Alpina (80kg)) esta raza puede llegar a pesar 110 a 135 kg, siendo su carne magra y de alta calidad, con poca grasa subcutánea, con valor nutritivo especialmente en proteína, vitaminas y minerales (Rojas & Meneses, 2004).

En cuanto a las cabras Anglo Nubian y Criolla son usadas en su mayoría en doble propósito, el ganado caprino Criollo, se considera en la actualidad un “mosaico genético”, por ser la resultante de numerosos cruzamientos estructurados sobre la base de distintas cabras. Existen ejemplares de distinto tamaño, conformación y pelaje, aunque generalmente se trata de animales eumétricos, de mediana altura en comparación a otras especies (De Gea, 2006).

Tabla 1

Clasificación de las razas caprinas según su producción.

Razas productoras de leche	Razas productoras de carne	Razas de doble aptitud (carne-leche)	Razas productoras de pelaje
<ul style="list-style-type: none"> • Saanen • Toggenburg • Alpina francesa • Granadina • Nubian Americana 	<ul style="list-style-type: none"> • Boer 	<ul style="list-style-type: none"> • Anglo Nubian • Criolla 	<ul style="list-style-type: none"> • Angora • Cachemira

Nota Adaptado de De la Rosa (2011).

Ganado caprino en Ecuador

Las cabras llegaron a América desde España junto con otros animales domésticos hace alrededor de 450 años, adaptándose en América Central para

luego extenderse hacia América del Sur incluyendo al territorio del Ecuador actual. Al mismo tiempo también llegaba ganado caprino desde África, traído también por embarcaciones españolas (Heifer, 2018).

En Ecuador, la población caprina adulta es de 108 714 cabezas, con una distribución de 89 145 cabezas en la Sierra, 19 340 en la Costa y 228 en el resto del país. De esta población, la mayor cantidad de cabras se encuentran en la provincia de Loja con 80 431 cabezas (Vargas et al., 2016), correspondiendo al 73.98% de la población nacional. Las razas que más se encuentran en el país son la Anglo Nubian, Criolla, Boer y Saanen (Tabla 2).

Figura 2

Principales razas caprinas en Ecuador.



Nota. a) Cabra Anglo-Nubian, b) Cabra Boer, c) Cabra Saanen, d) Cabra Criolla.

Adaptado de *Goats*, 2021, Breeds List (<https://www.breedsl.com/category/goats>).

En la región de la Sierra se encuentran todas estas razas, en la costa las Anglo Nubian y la Criolla mientras que en las regiones Oriente e Insular solo se encuentra la raza Criolla (Pesántez & Hernández, 2014).

Tabla 2

Características y ubicación del ganado caprino en Ecuador

Raza	Características y ubicación en el Ecuador
Anglo Nubian	Se ubica en las regiones costa y sierra del país. Posee un peso de 60 a 70 kg , de doble propósito (carne y leche) con una producción en el país de peso de carne a la canal de 30kg y de 1L/día de leche. Su reproducción se da durante todo el año.
Boer	Se ubica mayoritariamente en la región Sierra. Posee un peso de 110 a 135 kg, En cuanto a su carne, el rendimiento de esta puede variar entre 40,10% a los 10 kg de peso vivo y 52,4 % a los 41 kg de peso vivo.
Saanen	Ubicada en la región sierra. Mantiene un peso de 60 a 80 kg y es de propósito lechero. Produce alrededor de 2Lde leche al día.
Criolla	Las cabras criollas se encuentran distribuidas en todas las regiones del país. Suelen ser de doble propósito, tanto de carne como de leche. Las características fenotípicas de los caprinos criollos del Ecuador son superiores en las provincias de Loja e Imbabura. La oferta de faenamiento de ganado caprino que se registra en la provincia de Loja, es de alrededor de 570,23 t/año y el promedio nacional de leche por animal es de 0,8 L

Nota. Adaptado de Vargas et al. (2016), Pesántez & Hernández (2014).

De acuerdo con Aguirre-Riofrio et al., (2020) en la provincia de Loja se ha adaptado la cabra criolla denominada “Chusca Lojana” (Figura 3), en la región del bosque seco donde las condiciones ambientales son cálidas y secas, con escasa vegetación y recursos naturales limitado. Esta cabra pertenece al grupo genético de los Criollos Americanos, descendientes de las poblaciones Ibéricas traídas al continente americano en el tiempo de la colonización.

La actual cabra criolla americana, según Mellado, (1997), debe su conformación más a la selección natural que por selección dirigida. Estos animales lograron adaptarse a las diferentes regiones del continente americano por lo que se convirtieron en razas criollas reconocidas y bien aclimatadas.

Figura 3*Cabra “Chusca Lojana”*

Nota. Adaptado de “Caracterización genética de la Cabra “Chusca” de Ecuador y sus relaciones con otras razas caprinas.” (p.10), por Aguirre et al., 2019, *Federación Iberoamericana de Razas Criollas*.

Reproducción del ganado caprino

xLa reproducción es un proceso crucial de las especies para que se logre una renovación biológica. En el ámbito económico una alta eficiencia reproductiva es requisito indispensable tanto en la producción ganadera de lácteos como de cárnicos, pelaje, etc. Bertot Valdés et al. (2018), mencionan que existe una gran variedad de indicadores para evaluar la eficiencia reproductiva.

En el caso del ganado caprino su actividad reproductiva está ligada a factores ambientales. Entre estos podemos mencionar el fotoperíodo, nutrición, factores hormonales, medio social del hato así como también condiciones de estrés. En este sentido vale destacar que en el caso de las razas criollas de origen tropical y subtropical se presenta actividad sexual a lo largo de todo el año, aumentando la concentración de estos durante la época de abundancia de alimento natural (Cueto et al., 2017).

El inicio de la maduración sexual de esta especie se da en edades variables (4-6 meses) estando relacionado también con el peso del animal. En el macho, su pubertad llega cuando éste exhibe comportamientos sexuales que conducen al apareamiento, y un eyaculado que contiene espermatozoides vivos y viables para fecundar a las hembras (Mojapelo & Lehloenya, 2019). La actividad sexual del macho cabrío va a depender de sus niveles de testosterona, que suele incrementar ampliamente al acercarse la estación de monta (época de mayor alimento natural).

En un estudio de investigación realizado en la raza Angora se determinó que en un total de 180 extracciones seminales de 14 machos adultos, se obtuvieron valores de volumen de entre 0,4 a 1,8 mL, con un valor medio de 0,8 mL. La concentración espermática se mostró inversa al volumen del eyaculado, presentando un rango entre los 2000 a 4300 millones de espermatozoides/mL, con una media de 3200 millones de espermatozoides/mL (Abad, Gibbons, & Cueto, 2000). En programas de inseminación artificial y/o conservación de semen es recomendable coleccionar las muestras seminales en la estación reproductiva, tomando en cuenta la libido y las características seminales que cada raza exhiba para un determinado sistema de producción, esto es: latitud, temperatura, nutrición, entre otros (Livi-Marcatoma, 2015).

Así mismo, el éxito de un programa de inseminación artificial depende del manejo adecuado de la recolección, almacenamiento y uso del semen. Los

espermatozoides de los mamíferos son muy sensibles a las fluctuaciones de temperatura con diferencias de especies e individuos. Por ejemplo, el semen equino debe mantenerse a 37°C antes de la dilución. Se sabe que los espermatozoides de jabalí son muy susceptibles al choque por frío, especialmente cuando se almacenan por debajo de los 15°C (Boe-Hansen & Satake, 2019). Para la cabra se describen diferentes temperaturas de manipulación de los espermatozoides después de la recolección, que varían de 30°C a 37°C. En general, el semen se conserva a 18-22°C o 37°C hasta que se agrega un conservante (Hahn, Failing, & Wehrend, 2019). Una vez que se agrega el extensor, el semen de cabra es almacenado a varias temperaturas, algunas que oscilan entre 2 y 15°C y principalmente a 5°C, utilizando varios dilutores como citrato de sodio-yema, citrato de sodio-fructosa-yema, leche (entera, desnatada o reconstituida) con o sin yema de huevo (El-Battawy, 2019).

En algunos estudios se ha encontrado que al almacenar espermatozoides de cabra en conservante Neoseminan a 4°C durante 8-15 días se ha logrado mantener su capacidad fertilizante durante 6 días (Hahn et al., 2019). Además, demostraron que los espermatozoides de cabra han retenido su capacidad fertilizante durante al menos 8 días de almacenamiento a 5°C en diluyente de yema y ácido cítrico Tris-fructosa. Por otro lado, se ha encontrado una mejora en la viabilidad de los espermatozoides durante el almacenamiento de 12 días (5°C) cuando se incluyó glutatión peroxidasa (100 y 200 mM) en el conservante a base de Tris (Shi et al., 2020). Adicionalmente El-Battawy (2019), reporta que al adicionar melatonina (20 µg) se indujo acciones fisiológicas notables y profundas que mejoraron la calidad del semen de cabra en almacenamiento a 5°C por siete días.

Por otro lado en las hembras caprinas al igual que otros mamíferos, muestran períodos de actividad sexual (estro) que se alteran con períodos de refractariedad sexual (diestro) (González-Flores et al., 2017). El ciclo estral consta de todos los aspectos morfológicos y cambios fisiológicos en los ovarios y el tracto genital que

conducen a la expresión del estro (fase de receptividad hacia los machos) y la ovulación y la preparación de los genitales tracto para la cópula, fecundación e implantación embrionaria (Fatet, Pellicer-Rubio & Leboeuf, 2011).

Manejo programado de reproducción en caprinos

Los factores más importantes que afectan la productividad y la rentabilidad de la industria en cabras son el rendimiento de reproducción y la eficiencia de producción. El manejo reproductivo de las cabras debe apuntar a lograr una tasa de reproducción superior al 90%, más de un cabrito por parto con una tasa de supervivencia superior al 90% hasta el destete (Mellado, 2020). La reproducción de las cabras está influenciada principalmente por el estado nutricional, el potencial genético, las condiciones ambientales, el fotoperíodo y el estado de salud. Además, Abad, et al. (2000), señalan que se dispone de prácticas de manejo reproductivo para influir en estos factores; por lo tanto, existe un amplio margen para aumentar la eficiencia reproductiva de las cabras tanto en condiciones extensivas como intensivas, de manera que se debe establecer una estrategia que asegure el éxito de la concepción, preñez y lactación.

Para el caso de las cabras de zonas tropicales, las razas caprinas suelen mostrar actividad sexual durante todo el año, con baja variación estacional en esta. La preñez suele ocurrir durante cada mes del año, estando la tasa de fertilidad relacionada a la disposición de alimento. Así mismo las cabras post parto suelen reiniciar la actividad sexual en cortos períodos de tiempo pudiendo depender el número de crías y la época del parto. Es por ello que en condiciones de monta natural estas cabras pueden mantener un ritmo reproductivo de tres períodos de preñez cada dos años (Urrutia, Rosales, Ávila, & Manjarres, 2016).

Entre las técnicas de importancia para la reproducción animal programada son la sincronización del período de estro de las hembras, inseminación artificial y la

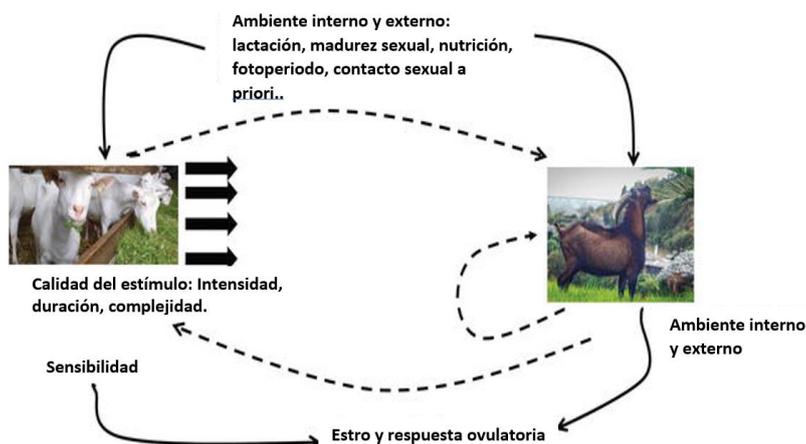
transferencia de embriones. La sincronización del estro permite el uso eficiente de los procedimientos de inseminación artificial y transferencia de embriones (ET). Adicional las ventajas son la simplificación de la crianza de los cabritos; el control de las enfermedades de transmisión sexual; producción de hatos uniformes de animales para el sacrificio; la disponibilidad continua de leche, carne y pelaje (Mellado, 2020).

La duración del estro en las cabras es bastante variable de 24 a 48 h y la ovulación podría ocurrir entre 9 y 37 h después del inicio del comportamiento del estro, en cabras que se encuentran en zonas tropicales se ha observado el potencial de tener hijos durante todo el año, aunque factores ambientales (disponibilidad de forraje y cambios de temperatura) tienen una fuerte influencia que a menudo no permite que estos potenciales se expresen plenamente (Fatet et al., 2011).

Existen tres técnicas usadas mayoritariamente para la sincronización del estro, estas son tratamiento hormonal, tratamiento fotoperiódico y el llamado efecto macho (Figura 4). Los tratamientos hormonales son basados en progestágenos, gonadotropina coriónica equina y/o prostaglandinas; esta técnica se ha establecido por más de cuatro décadas y ha permitido sincronización del estro y la ovulación durante la temporada de reproducción y no reproducción (Abecia, Forcada, & González-Bulnes, 2011).

Figura 4

Representación esquemática de "Efecto macho"



Nota. Adaptado de "Reproduction in Goats" (p.94), por Sánchez et al., 2017, *Goat Science*.

En cuanto al fotoperíodo, (exposición a la luz solar) este es usado en cabras de regiones templadas y subtropicales, en donde según la estación del año puede haber cambios importantes de duración de luz solar (prolongación o reducción a las 12h esperadas). Es por ello que los tratamientos de fotoperíodo se basan en la alternancia de exposición a la luz en periodos largos y cortos. Por otro lado, la técnica denominada "efecto macho" es una técnica para estimular la actividad sexual en cabras con anovulación estacional. La respuesta al efecto masculino varía dentro de las razas a través del período anestro estacional, y entre las razas de diferentes orígenes de latitud (Fatet et al., 2011).

Conservación y análisis seminal

La recolección, conservación y transporte de semen facilitan el intercambio de material genético entre rebaños de cabras y animales reproductores a través de escalas físicas y temporales. La capacidad de preservar la integridad y funcionalidad del semen durante cierto tiempo es fundamental para los programas de cría de ganado artificial (Gororo et al., 2019).

Es así como el objetivo del análisis del semen es la valoración de la calidad del eyaculado y a través de éste, relacionarlo con la calidad como reproductor del macho (Vera & Ricarte, 2015). En el semen de ganado se suelen analizar características morfológicas y funcionales: volumen, color, olor, pH, concentración, motilidad masal, motilidad individual, porcentaje de formas anormales y porcentaje de acrosomías (Ureña, 2018).

El volumen de eyaculado promedio se suele medir directamente en la graduación del tubo recolector, siendo considerados normales aquellos mayores o iguales a 0,5 ml (Vera & Ricarte, 2015). Por otro lado, para las características organolépticas se ha observado que el semen suele presentar un color blancuzco o blanco lechoso o levemente amarillento. El olor es peculiar y puede ser variable en cada animal, con un aroma muy intenso. El pH del semen suele ser de alrededor 7 a 7,5 (Liu et al., 2016).

En cuanto a los valores funciones y morfológicos tenemos a la concentración espermática, esta puede variar entre 1 a 10×10^9 espermatozoides/mL y se determina usando la cámara de Neubauer. Se toma en cuenta también la motilidad total y progresiva; la motilidad total es el porcentaje de espermatozoides que presentan movimiento, ya sea este rectilíneo, en su propio eje o circular. Para determinar los resultados de esta variable se puede utilizar una escala subjetiva de 0 a 5 (Tabla 3) o se puede realizar un análisis en porcentaje. La motilidad progresiva individual por otro lado, es el porcentaje de espermatozoides con movimiento, pero en sentido rectilíneo (Murphy et al., 2017).

Con respecto a la morfología, se han clasificado defectos espermáticos de distintas características (Figura 5), entre ellas tenemos anomalías de cabeza, acrosoma, cola dividida en pieza intermedia y en cuello, cola enrollada, cola doblada, cabeza desprendida, gota citoplasmática (Ebrahim, 2011).

Tabla 3

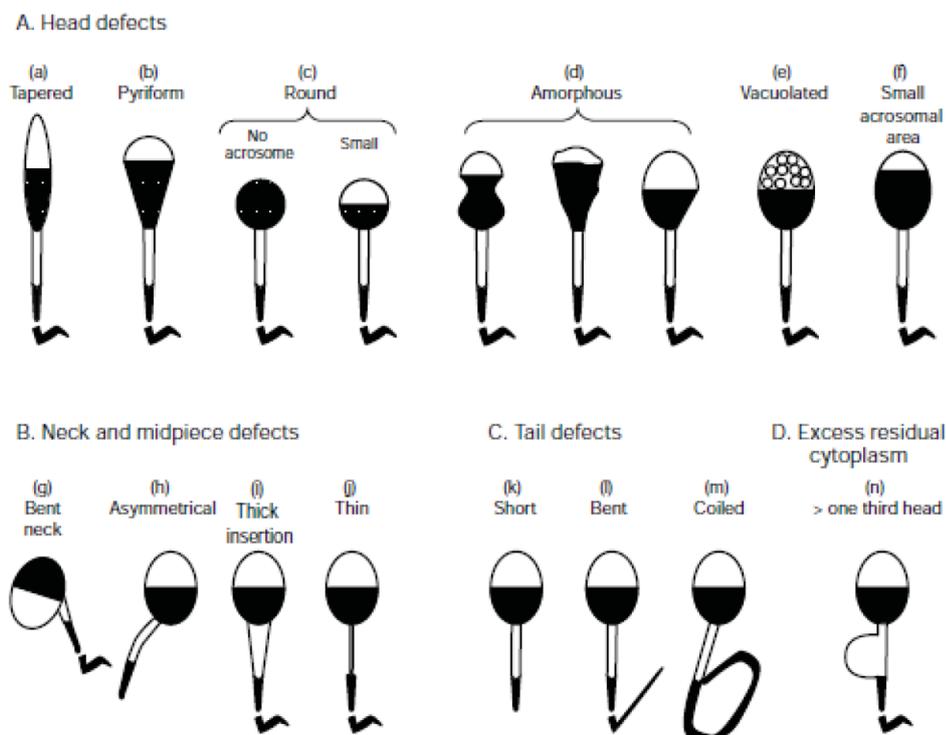
Escala subjetiva para la descripción de la motilidad seminal total.

Valor	Clase	Descripción	Porcentaje %
5	Muy buena	Onda de movimientos muy rápidos	>90% de espermatozoides móviles.
4	Buena	Movimientos vigorosos, pero las ondas no son tan rápidas.	Movilidad de espermatozoides entre el 70 y 90%
3	Regular	Solo aparecen ondas de movimiento lento.	Espermatozoides entre el 40 y 69% presentan movilidad.
2	Pobre	No aparecen ondas, aunque hay movimiento de espermatozoides.	Solo se observa movimiento de un porcentaje entre 20 a 40% de espermatozoides
1	Muy pobre	Presentan movimientos débiles.	Movilidad mayor a 0% y menor al 20% de espermatozoides
0	Muertos	Ausencia de movimiento.	0% de movilidad.

Nota Adaptado de Hafez & Hafez (2004).

Figura 5

Daños morfológicos de los espermatozoides.



Nota. Adaptado de "Técnicas de Evaluación de Semen" (p.20), por A. Brufman, 2020, FBIOyF.

Conservantes seminales

Son dilutores como un medio químico que se utiliza para la preservación, extensión y protección de los espermatozoides contra diversos golpes durante el procesamiento, almacenamiento y transporte utilizado para la inseminación artificial. La calidad de un buen conservante para la preservación seminal es suministrar a los espermatozoides fuentes de energía, proteger a los espermatozoides de daños bioquímicos, físicos y mantener un entorno adecuado para que los espermatozoides sobrevivan durante la preservación (Raheja, 2018).

El conservante de acuerdo con Rehman (2013) tiene un papel vital en la preservación de los espermatozoides y sus parámetros de calidad, como viabilidad, motilidad, integridad de la membrana y del acrosoma, etc. (glicerina, yema de huevo, lecitina de soja, leche) (Tabla 4), proporcionan energía (fructosa) y garantizan el entorno libre de microbios, es decir, antibióticos (estreptomicina, penicilina, polimixina B).

Debe además englobar estas propiedades: ser una solución isotónica (280-310 mOsm/kg), tener capacidad tampón (regular el pH), protección contra el frío, fuente de energía (metabolismo del esperma), control de la contaminación microbiana, protección durante la congelación y descongelación y capaz de preservar la fertilidad de los espermatozoides. Dependiendo del período de uso de semen posterior a la recolección para inseminación artificial, la conservación del semen se realiza en dos formas, en forma líquida (3-5 días) y en forma congelada (años) (Soren, Singh, & Kumar, 2017). El almacenamiento de semen a temperatura de refrigeración es posible desde el descubrimiento de la yema de huevo como aditivo beneficioso y el fosfato como tampón primario. Posteriormente, el uso de citrato como tampón mejora el período de supervivencia de los espermatozoides a 5°C (Kato & Nagao, 2015). Además de la yema de huevo, también se utiliza leche entera homogeneizada, leche desnatada fresca o reconstituida y leche de coco para

preservar la fertilidad de los espermatozoides. Entre varios tampones (Tris (trisaminometano), TES (ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico), MES (ácido 2-(Nmorfolino)etanosulfónico), HEPES ((ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etanosulfónico) y PIPES (ácido piperazin-N,N'-bis(2-etanosulfónico)), los conservantes basados en Tris se utilizan ampliamente para el almacenamiento de semen líquido/congelado. Los bicarbonatos y el citrato de sodio son otros tampones inestables a la temperatura que se utilizan y, en contraste con estos, Tris, TES y Hepes son más estables a altas temperaturas y otras condiciones ambientales (Raheja, 2018).

Tabla 4

Ventajas y desventajas de componentes de conservantes seminales

Conservante	Ventajas	Desventajas
Yema de huevo	Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la yema de huevo protegen a los espermatozoides contra daños durante el almacenamiento, enfriamiento y congelación.	La enzima coagulante de la yema de huevo (EYCE) puede ser dañina para los espermatozoides
Leche descremada	Las caseínas de la leche disminuyen la unión de las proteínas plasmáticas seminales a los espermatozoides y reducen la pérdida de lípidos de los espermatozoides, al tiempo que mantienen la movilidad y viabilidad de los espermatozoides durante el almacenamiento.	Riesgo de contaminación con microorganismos por ser un producto de origen animal.
Lectina de soya	Ácidos grasos como el ácido palmítico, oleico y esteárico pueden conferir estabilidad estructural a las células espermáticas.	Altas concentraciones de lectina incrementan la viscosidad de los diluyentes lo que podría ocasionar reducción en la fertilización.

Nota. Adaptado de Yodmingkwan et al. (2016), Chelucci et al. (2014).

La mayoría de los dilutores usados para el semen de rumiantes tanto fresco como congelado, están compuestos de Tris-glucosa, yema de huevo y glicerol (Gororo et al., 2019), aunque también se usa con frecuencia dilutor de leche en polvo descremada. Adicionalmente varios investigadores sugieren que el ácido Tris-cítrico es el tampón más satisfactorio para los espermatozoides de cabra (Sharma & Sood, 2020). Sin embargo, algunos autores (Bispo et al., 2011; Sun et al., 2020;

Tabarez, García, & Palomo, 2017) destacan el uso de lectina de soya (2%) en lugar de yema de huevo o uso de un porcentaje reducido de yema (2,5%).

En cuanto a marcas comerciales, entre los conservantes para semen caprino más usados se pueden citar OviXcell, OviPlus, AndroMed, Triladyl, estos dos últimos se pueden usar también para otro tipo de rumiantes (Silva & Hernández, 2015). Todas estas marcas provienen de empresas extranjeras (IMV Tech-Francia , Minitube-Alemania) por lo que en el país si bien se puede adquirir estos productos mediante intermediarios, los costos suelen ser elevados (OviXcell,AndroMed). Debido a ello su uso, en especial en zonas rurales, es limitado. La marca más accesible por su valor económico y buenos resultados es el diluyente Triladyl (Maroto, 2020).

Agentes antioxidantes

Los antioxidantes son las sustancias que inhiben la oxidación. Además, según Neha (2019), se les reconoce como "captadores de radicales libres", ya que forman especies reactivas menores a través de los radicales. El estrés oxidativo está relacionado con el aumento de la aparición de radicales libres o debido a la disminución de la concentración de antioxidantes.

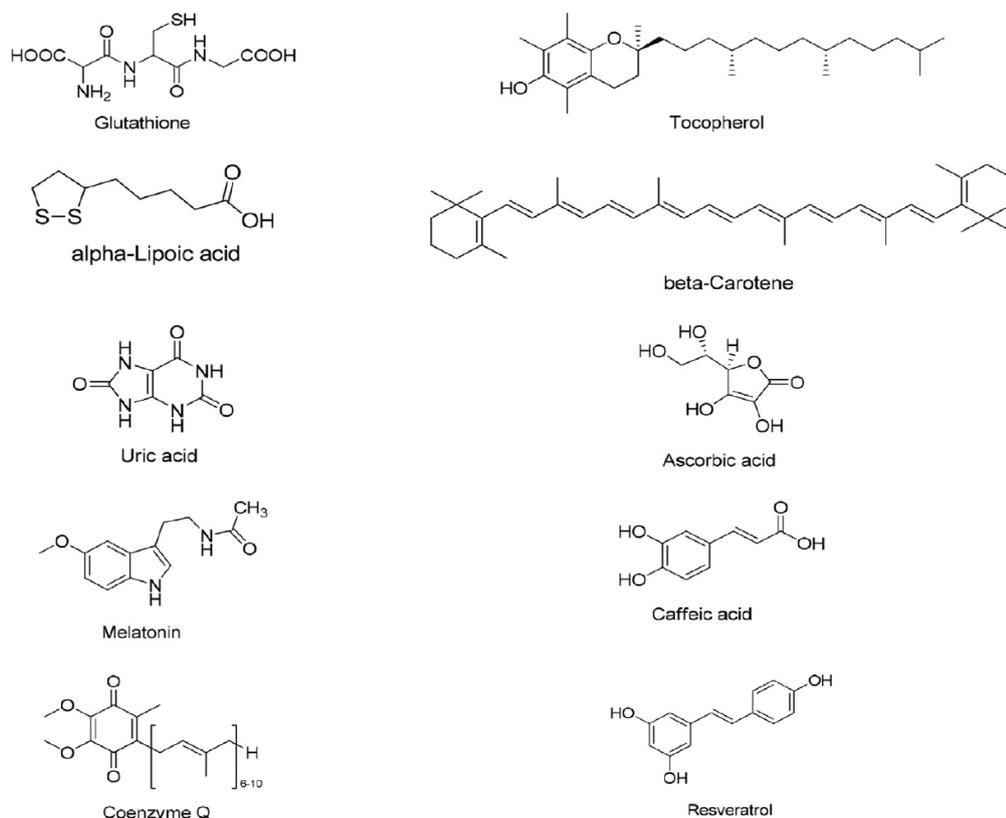
Los antioxidantes abundan en las fuentes dietéticas naturales y el consumo de antioxidantes tiene muchos beneficios potenciales para la salud (Kan Yeung et al., 2019). De acuerdo con el mismo autor según el origen, los antioxidantes se clasifican en dos tipos: antioxidantes exógenos y endógenos.

Los antioxidantes (Figura 6) juegan un papel crucial en la conservación de las mejores funciones celulares. Se han encontrado una gran cantidad de antioxidantes tanto naturales como sintéticos. Los antioxidantes endógenos pueden ser enzimáticos o no enzimáticos (Bouayed & Bohn, 2010). Los antioxidantes enzimáticos endógenos consisten en glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y

catalasa, mientras que los antioxidantes no enzimáticos son ácido úrico, ácido lipoico, bilirrubina, glutatión y melatonina. Los antioxidantes exógenos son carotenoides, vitamina E, A y C, flavonoides naturales u otros compuestos diferentes. La vitamina C es un antioxidante soluble en agua que actúa junto con la vitamina E para proteger los lípidos de la peroxidación. Los antioxidantes sintéticos son antioxidantes centrados en el petróleo que se componen de hidroxitolueno butilado (BHT), galato de octilo (OG), hidroxianisol butilado (BHA), galato de propilo (PG) y terc-butilhidroquinona (TBHQ). TBHQ (terc-butilhidroquinona) se utiliza para preservar la floración, la importancia nutricional, el sabor y el color del producto alimenticio (Kan Yeung et al., 2019).

Figura 6

Ejemplos de agentes antioxidantes.



Nota. Adaptado de “Medicinal prospects of antioxidants: A review.” (p. 690), por Neha et al. 2019, *European Journal of Medicinal Chemistry*.

Según Mut-Salud (2016), los antioxidantes pueden intervenir en la protección de sustancias biológicas de la siguiente manera:

- Inhibiendo la creación de nuevos radicales (superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), Se, Cu, Zn).
- Atrapar radicales libres para evadir reacción en cadena (vitaminas A, E y C, carotenoides).
- Restaurar el deterioro afectado por los radicales libres (lipasas, proteasas).

Además, se sabe que las vitaminas C (ácido ascórbico, AA), A (carotenoides y retinoides) y E (tocoferol) actúan como antioxidantes al retrasar o inhibir la oxidación y reducir la concentración de radicales libres en el cuerpo.

Retinol (Vitamina A)

La vitamina A es un micronutriente esencial necesario para el crecimiento normal, la diferenciación epitelial, el desarrollo fetal, la morfogénesis de vertebrados, la espermatogénesis y la visión nocturna. La vitamina A también tiene un papel importante en la regulación de la función inmunológica. (Sherman, 2020). Esta vitamina es capaz de mantener el equilibrio celular entre las moléculas antioxidantes y pro-oxidantes neutralizando radicales libres de oxígeno y nitrógeno, tiene la capacidad de reducir la formación de radicales libres, proteger las estructuras celulares y mantener la homeostasis celular (de Carvalho Melo-Cavalcante et al., 2019). En algunas investigaciones se utilizó diversas concentraciones de este antioxidante enfocado en preservación seminal, se han utilizado cantidades desde los 6 μM (Maya-Soriano et al., 2013) a inclusive 50, 100y 200 μM (Maya-Soriano, Taberner, Sabés-Alsina, Piles, & Lopez-Bejar, 2015).

Vitamina C (Ácido ascórbico)

La vitamina C es necesaria para muchas reacciones metabólicas importantes en todos los animales y se sintetiza en casi todos ellos (el ser humano es una excepción) (Enstrom, 2016). Esta vitamina se la denomina antioxidante excepcional, ello debido a sus propiedades redox como agente reductor. El ácido ascórbico proporciona electrones para las enzimas, para los compuestos químicos que son oxidantes o para otros aceptores de electrones en los sistemas biológicos. Además de su potencial redox, otras propiedades del ascorbato lo convierten en un excelente donante de electrones en sistemas biológicos (Czyzowska, 2016).

Debido a su actividad antioxidante, diversas cantidades de esta vitamina han sido testeadas para probar su eficacia en la preservación seminal, ya sea a temperatura de refrigeración como temperatura ambiente y en distintas especies animales (Moradi et al., 2020) Algunas concentraciones usadas han sido 5, 10, 25, 40, and 50 $\mu\text{g/mL}$, 0.45, 0.9, and 1.8 g/L para animales de granja como toros, carneros, cabritos, caballos (J et al., 2014) (P. Kumar et al., 2019) (Allai et al., 2018).

Tocoferol (Vitamina E)

La vitamina E es una vitamina soluble en grasa natural, producida por plantas, y es esencial para los seres humanos por su actividad antioxidante y protección de la membrana celular, así como por otras funciones en la modulación de la transducción de señales (Guz-Mark & Shamir, 2020). Este antioxidante liposoluble elimina los radicales peroxilo y pone fin a la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). En las membranas celulares protege la estructura celular contra el daño de los radicales libres y los productos de la oxidación de lípidos (Meydani, 1995). Se cree que la función de la vitamina E en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) está involucrada en la desaceleración de la destrucción celular y los procesos de envejecimiento (Guz-Mark & Shamir, 2020).

Por la importancia de esta vitamina se la usó en distintas investigaciones ya sea como Trolox (análogo de la vitamina E o α -tocoferol. Entre ellas para preservación de semen de ovinos en congelación, con concentraciones desde 50 a 100 μ M (Allai et al., 2018), también para preservación de semen equino (0,5, 1 y 2 mM) (Vasconcelos et al., 2013), semen caprino con concentraciones de 30, 60 and 120 nmol/ml (Soares et al., 2015).

Selenio

El selenio es un elemento no metálico que fue descubierto por Berzelius en 1817. El selenio funciona como componente de más de 30 selenoproteínas, de ellas 25 las encontramos en humanos (Berger, 2016). Estas selenoproteínas tienen una serie de funciones, incluida la defensa antioxidante y el metabolismo redox (GPxs, tioredoxina reductasas), metabolismo tiroideo (yodotironina desyodasas), función inmune, función reproductiva y actividades de almacenamiento y transporte (SEPP). Algunas de las funciones de la selenoproteína tienen implicaciones clínicamente importantes en enfermedades como cáncer y enfermedad tiroidea autoinmune (NIH, 2019). De las selenoproteínas, la selenoproteína R (SEPR), también conocida como metionina-R sulfóxido reductasa, participa en la función antioxidante, regulación de la actividad enzimática y la señalización celular, y puede proteger el cerebro del daño oxidativo (Thomson, 2012).

La actividad antioxidante de este elemento ha impulsado investigaciones para su uso en la preservación seminal. Se ha usado concentraciones de 2 μ g/ml para semen de búfalo, 5 μ g/ml en semen de jabalí y 1 μ g/ml para semen de gallo (Łukaszewicz et al., 2020).

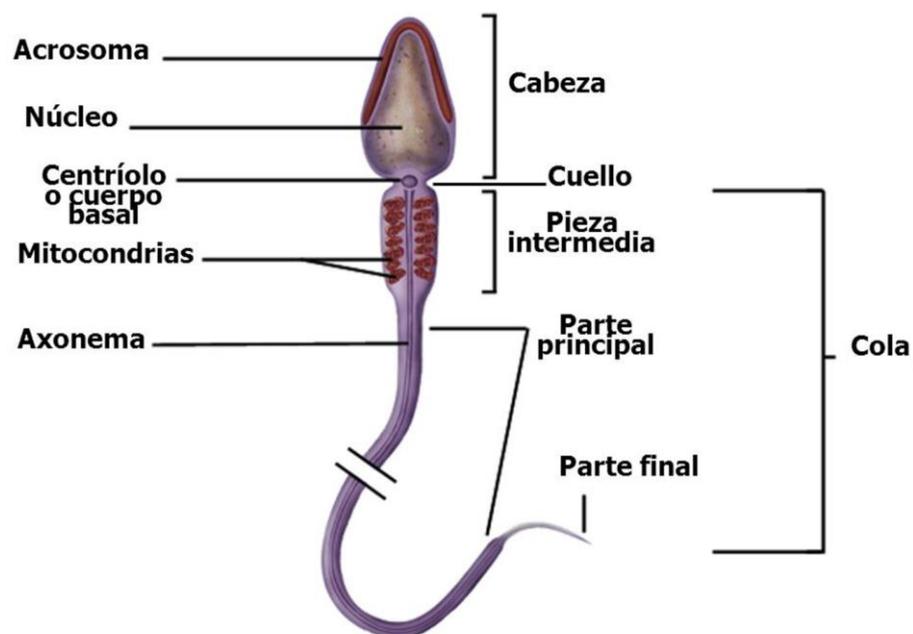
Célula espermática y agentes antioxidantes en la preservación seminal

Los espermatozoides llevan el genoma nuclear haploide paternal y su función principal es llegar al ovocito y participar en la fertilización, proporcionando ADN

transportado por el espermatozoide y activando el ovocito (Roldan & Teves, 2020). El espermatozoide se puede dividir en dos compartimentos principales morfológicamente distintos, la cabeza y la cola (Figura 7). La cabeza se puede subdividir en la región acrosómica y el núcleo. La región acrosómica incluye la vesícula acrosómica secretora y la membrana plasmática que recubre el acrosoma. El flagelo a menudo se denomina "central eléctrica" o "motor" del espermatozoide (Gerton & Vadnais, 2018). Esta estructura produce energía por glucólisis y fosforilación oxidativa que es utilizada por la maquinaria móvil en la cola para impulsar los espermatozoides a través del tracto reproductivo femenino. Todo el espermatozoide está recubierto por la membrana plasmática (Gerton & Vadnais, 2018).

Figura 7

Estructura del espermatozoide.



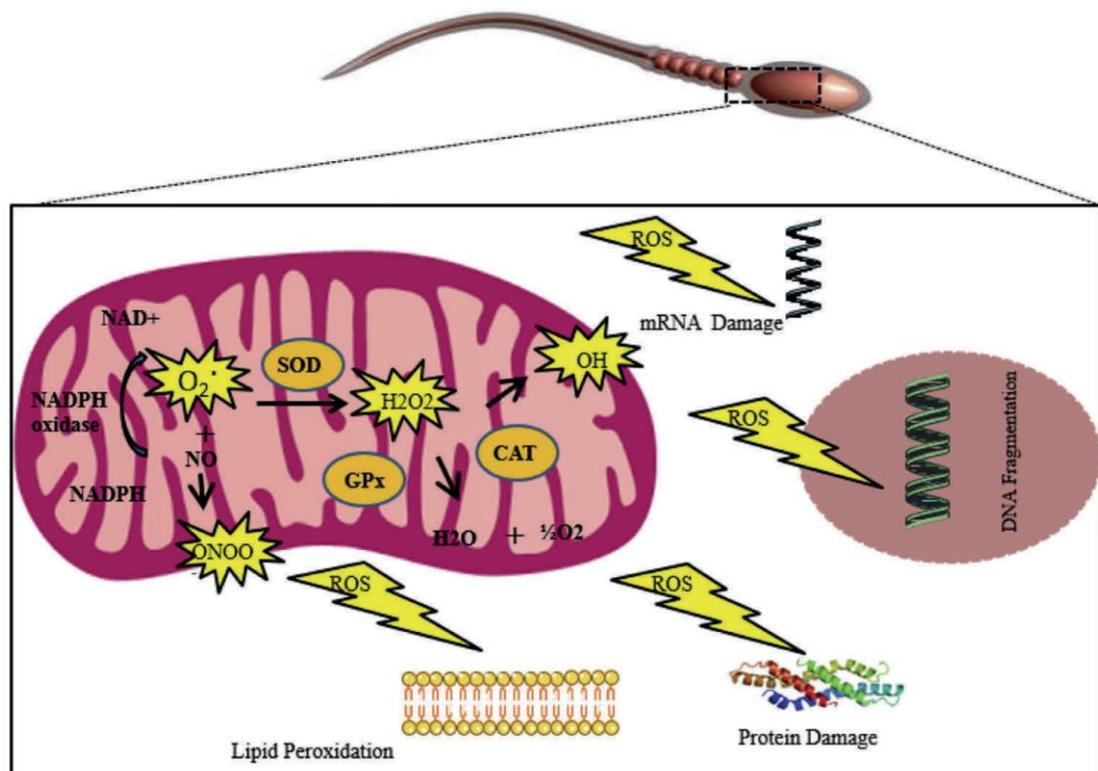
Nota. Adaptado de Espermatozoide, por Función de los espermatozoides, 2016, Maeve (<http://maeve3esoccs.blogspot.com/2016/01/funcion-de-los-espermatozoides.html>).

Como se mencionó, la manipulación de muestras seminales luego de la recolecta puede representar daños en el espermatozoide al permitir que se generen, por ejemplo, especies reactivas de oxígeno (T et al., 2019). Aunque los niveles fisiológicos de ROS son necesarios para eventos clave como la capacitación, la hiperactivación y la reacción del acrosoma, un desequilibrio entre su producción y los mecanismos captadores intrínsecos que los contrarrestan conduce a un deterioro de la capacidad fertilizante (Figura 8), conduciendo a una reducción de la viabilidad de los espermatozoides (Falchi et al., 2018).

Las ROS como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los aniones superóxido (O_2^-) y los radicales hidroxilo (OH^-) pueden inducir apoptosis, peroxidación de lípidos de membrana, alteración de las mitocondrias y daño del ADN (Hezavehei et al., 2018).

Figura 8

Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las mitocondrias de espermatozoides que conduce a una reducción de la calidad del esperma.



Nota. Adaptado de “Effects of mint, thyme, and curcumin extract nanoformulations on the sperm quality, apoptosis, chromatin decondensation, enzyme activity, and oxidative status of cryopreserved goat semen.” (p. 330), por Hezavehei et al., 2018, *Reproductive Biomedicine Online*.

Para el análisis y uso de muestras seminales, este se conserva en un conservante que contiene Tris, glicerol, glucosa, ácido cítrico, agua, yema de huevo y antibióticos a temperaturas refrigeradas durante varios días durante el almacenamiento de líquidos (Al-Bulushi et al., 2019) y a -198°C durante varios días, meses o incluso años durante la criopreservación (Gangwar et al., 2016). Normalmente, el plasma seminal contiene antioxidantes enzimáticos (naturales) y no enzimáticos (dietéticos); sin embargo, sus acciones protectoras contra el estrés oxidativo se debilitan significativamente después de la dilución del semen en el diluyente antes del almacenamiento (Mohsen Al-Mutary, 2020).

Es por ello que de acuerdo con Moradi et al., (2020), la inclusión de antioxidantes se ha propuesto en varios protocolos para conservar la fisiología normal de los espermatozoides durante su conservación en rangos de 3 a 24 h a distintas temperaturas (32°C , 5°C , 196°C). El propósito de agregar antioxidantes a los medios es reducir ROS y proteger los espermatozoides contra el estrés oxidativo de las macromoléculas y los daños relacionados con la temperatura, daños o lesiones, y mantener un entorno adecuado para que los espermatozoides sobrevivan temporalmente. También podrían promover la proliferación de células madre, espermatogoniales e incluso tienen una influencia beneficiosa en el desarrollo embrionario futuro. Se han suplementado varios antioxidantes a varias especies para contrarrestar los efectos adversos de ROS sobre la motilidad total de los espermatozoides, motilidad progresiva, viabilidad e integridad de la membrana plasmática (Seifi-Jamadi et al., 2017).

Según Mohsen Al-Mutary (2020), algunos de los antioxidantes que han mostrado beneficios durante el almacenamiento de semen en la calidad de los espermatozoides de animales de ganado son el resveratrol, iodixanol, cisteamina, glutatoina, quercetina, L-arginina, catalasa, melatonina, cisteína, encontrándose mejoría en los parámetros espermáticos (motilidad, viabilidad, membrana espermática y acrosoma) en relación al control, también en la actividad mitocondrial e inhibición de la producción de ROS, mejora en la fertilidad in vitro, supresión en la peroxidación lipídica entre otras.

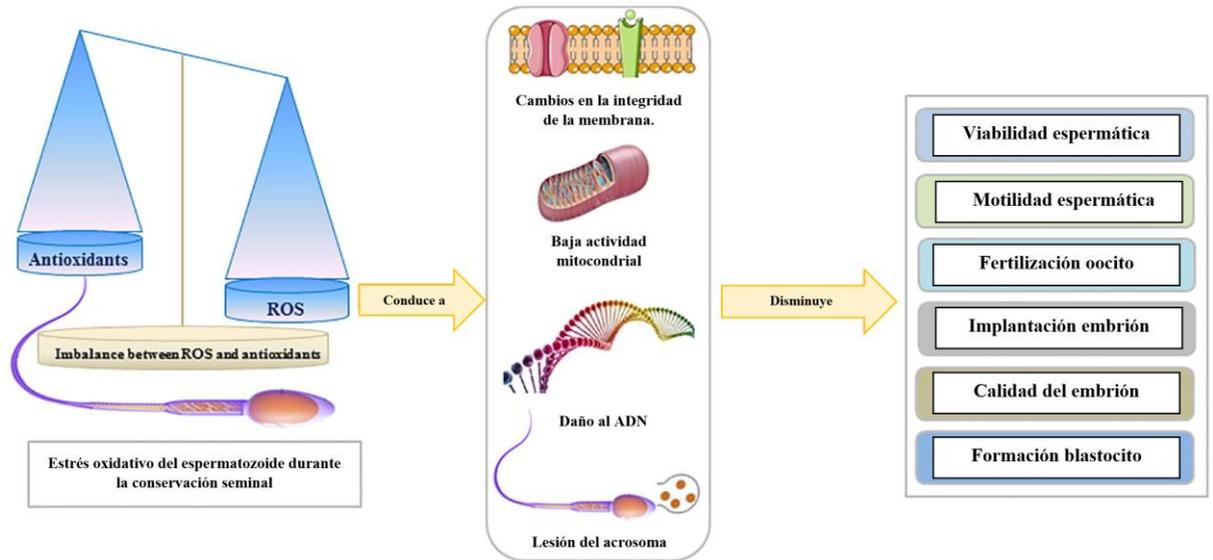
En el caso del ganado caprino, Moradi (2020), destaca el uso de la quercetina, ácido ascórbico, trolox, BHT, Fullenerol y L-arginina, observándose beneficios en la motilidad, tasas de supervivencia, integridad de la membrana y actividad de las mitocondrias y acrosoma.

Bergmann y col. (1997) evaluaron el reemplazo de tocoferol por Trolox® en la preservación de lipoproteínas de baja densidad y encontraron que el análogo de vitamina E aumenta efectivamente el tiempo de latencia para la degradación de lipoproteínas de baja densidad, demostrando que Trolox es un antioxidante eficaz contra la peroxidación lipídica.

En la Figura 9, se observa las consecuencias del desequilibrio entre antioxidantes y ROS en el espermatozoide.

Figura 9

Desequilibrio ROS y Antioxidantes en el semen y sus consecuencias.



Nota. Adaptado de “Use of antioxidants to augment semen efficiency during liquid storage and cryopreservation in livestock animals: A review” (p.18), por Mohsen Al-Mutary, 2020, *Journal of King Saud University – Science*

Capítulo III: Metodología

Localización Geográfica

El presente trabajo se realizó en el Centro Binacional de Formación Técnica Zapotepamba (4° 2' 29.404"S, 79° 46' 52,11"O) ubicados en Zapotepamba, parroquia Casanga del cantón Paltas; y en el Centro de Biotecnología Animal (CEBIREA) de la Universidad Nacional de Loja, Avenida Pío Jaramillo Alvarado, del cantón Loja.

Preparación de los animales

Los machos caprinos usados para el presente proyecto se encuentran en el Centro Binacional de Formación Técnica Zapotepamba, de ellos se eligieron los 5 con mayor diámetro testicular y de edades comprendidas entre 11 meses a 2 años (Tabla 5) y se los apartó del grupo por 20 días previo a la toma de muestras para evitar apareamiento. También se les suministró vitaminas (Vigantol) y Propionato de Testosterona (Testogan- 2ml) para estimular la espermatogénesis.

Tabla 5

Sementales seleccionados para la obtención de muestras y las medidas de las características principales.

	Semental 1 "Pepe"	Semental 2 "Roberto"	Semental 3 "Jorge"	Semental 4 "Junior"	Semental 5 "Gabo"
					
Raza	Chusca Lojana	Chusca Lojana	Chusca Lojana	Chusca Lojana	Chusca Lojana
Edad	2 años 9 meses	11 meses	1 año 1 mes	11 meses	1 año 1 mes
Peso	39,3 kg	30,5 kg	35,4 kg	29 kg	36,8 kg
Presencia de cuernos	SC	CC	CC	SC	CC
Altura 1- Patas delanteras	0,80 m	0,68 m	0,66 m	0,63 m	0,64 m
Altura 2- Patas traseras	0,82 m	0,72 m	0,67 m	0,67 m	0,67 m
Largo del dorso	1,22 m	0,97 m	0,95 m	0,90 m	0,89 m
Largo testículo	19 cm	16 cm	18 cm	20 cm	15 cm
Diámetro testículo	12 cm	12 cm	17 cm	18 cm	13 cm

Nota. SC abreviatura para "Sin Cuernos", CC abreviatura para "Con Cuernos"

Toma de muestras

La toma de muestras se realizó en la parroquia Zapotepamba la cual se ubica en un ecosistema de bosque seco con temperaturas desde 24 a 30°C en el día.

Para la obtención de la muestra se contó con la asesoría de un profesional, el Dr Hugo Viñan, médico veterinario del Centro. En cuanto a los animales, el macho elegido era llevado al área de recolección y ubicado en una manga improvisada para dicho fin. Su zona genital aseada con agua y jabón neutro, los vellos acumulados de

la punta del pene fueron depilados para evitar contaminación y finalmente se procedió a un total secado de la zona con papel toalla.

Después de esto se procedió al uso del electro-eyaculador, para lo cual el aparato fue lubricado e insertado en el recto del macho, se estimuló al animal por 10 segundos y se emitieron pulsos leves de energía (9 voltios) por alrededor de 4 a 5 segundos seguido de un breve descanso de 3 a 4 segundos dependiendo del animal, el ciclo se repetía hasta lograr obtener la eyaculación del macho.

Para ello el momento de la erección se sujetó el pene erecto y se lo guio al tubo colector hasta que el animal eyacule (fue importante evitar primeras gotas pertenecientes a orina y/o líquido pre-seminal). Una vez obtenida la muestra se la trasladó al laboratorio inmediatamente (5 min) manteniendo el tubo a 35°C en un termo.

Se tomaron tres muestras por animal con una diferencia de mínimo 3 días entre cada colecta.

Preparación de solución dilutora

El conservante usado fue Triladyl. Para la preparación del volumen necesario de esta solución se tomaron 70,7% de agua bidestilada, 23,6% de Triladyl puro y 5,7% de yema de huevo, porcentajes especificados para uso caprino de acuerdo con el manual (Minitube®, 2018).

Se siguieron los pasos del inserto y la solución elaborada fue usada el mismo día de su preparación.

Tratamientos con los antioxidantes

Los antioxidantes que se usaron fueron Vitamina E (tocoferol), Vitamina C (ácido ascórbico) ambos de Sigma Aldrich, Vitamina A (retinol) de Laboratorios Luque y Selenio de Nutrifit (Tabla 6). La vitamina E fue usada con una concentración

de 2 mM (0,95 $\mu\text{l/ml}$) (Ludeña, 2015); de la vitamina C se usó 8 mM (8,5 mg/ml) (Daramola & Adekunle, 2015); de la Vitamina A, 6 μM (2 $\mu\text{g/ml}$) (Maya-Soriano, Taberner, Sabés-Alsina, & López-Béjar, 2013) y, de Selenio 1 $\mu\text{g/ml}$ (Łukaszewicz, Jerysz, & Kowalczyk, 2020)

Tabla 6

Tratamientos empleados en la investigación

Tratamiento	
T₁	Tryladil + Vitamina A + Muestra
T₂	Tryladil + Vitamina C + Muestra
T₃	Tryladil + Vitamina E + Muestra
T₄	Tryladil + Selenio + Muestra
T₅	Tryladil (Control) + Muestra

Para obtener la concentración deseada de cada antioxidante, el volumen de la solución elaborada del conservante se dividió en viales de 2 ml en donde se agregó la cantidad necesaria de antioxidante (Tabla 7).

Tabla 7

Cantidad de antioxidante a usar para un volumen de 2 ml.

Antioxidante	Volumen 2 ml
Vitamina A	2,2 μl
Vitamina C	17 mg
Vitamina E	1,9 μl
Selenio*	0,002 μg

Nota Adaptado de Maya et al. (2013), Daramola et al. (2015), Ludeña (2015), (Łukaszewicz et al. (2020).

En el caso del selenio se agregó la cantidad correspondiente de éste para 1L de agua bidestilada (1 μg) y con ella se preparó un volumen adicional de conservante.

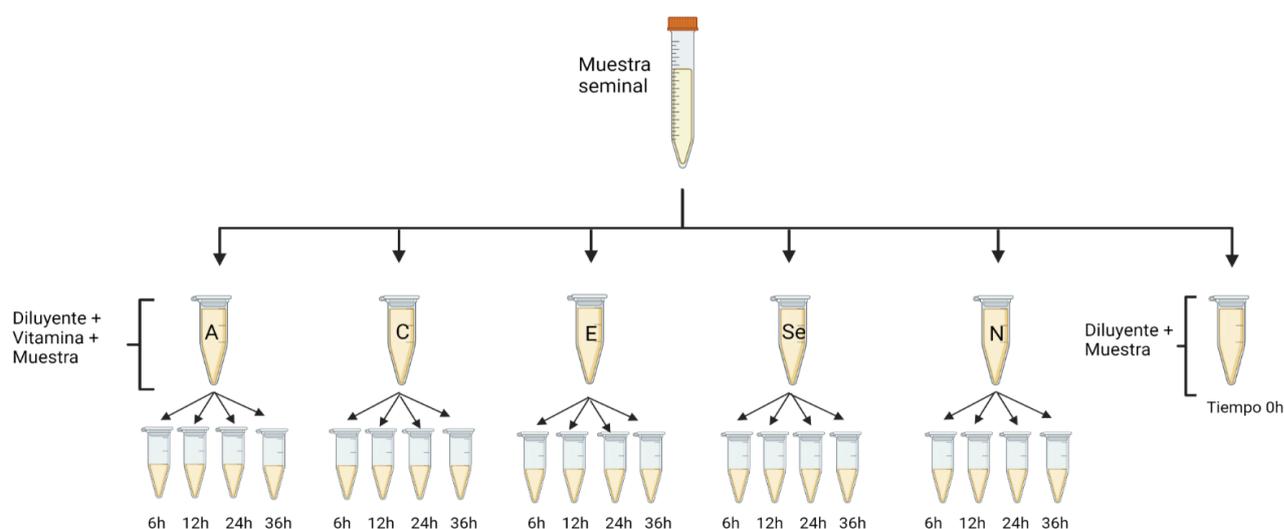
Conservación y análisis de las muestras seminales

Las muestras fueron analizadas en los tiempos de conservación 0h, 6h, 12h, 24h y 36h a 5°C, tomando como tiempo 0, el tiempo de la llegada de la muestra al laboratorio que fue de aproximadamente 5 a 10 min.

Una vez ahí, se las colocó inmediatamente en el baño María previamente calentado a 35°C, el volumen obtenido (0,5 a 1,5 ml según el macho) se dividió en 6 partes, cuatro de ellas para el estudio con los antioxidantes, otra para el grupo control y la sexta para el análisis inicial (tiempo 0h). A su vez el conservante se dividió de forma tal que en cada vial haya una relación de 1:10 del conservante (con antioxidante o control) respecto a la muestra seminal. Estos tubos a su vez se dividieron en 4 partes más para ser usados en los distintos tiempos de análisis (6h, 12h, 24h y 36h) como lo indica la Figura 10.

Figura 10

Esquema de la división de la muestra para su posterior análisis con el antioxidante y en los tiempos correspondientes.



Nota. Creado en BioRender.com

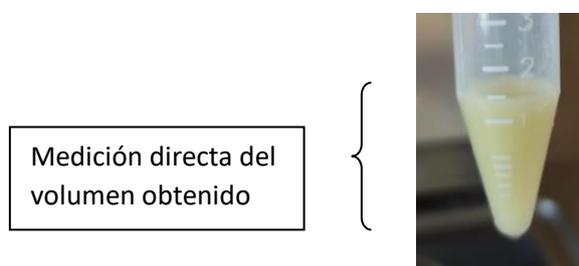
Para la prueba inicial se analizó: color, volumen, pH, concentración (# de espermatozoides/ml), motilidad total, motilidad progresiva, viabilidad seminal y morfología.

Color, volumen y pH

La medida del volumen del eyaculado se efectuó por lectura directa de la graduación que hubo en el tubo de recolección del semen (Figura 11). Considerando eyaculados normales aquellos que presentaron un volumen $\geq 0,5$ ml (Vera & Ricarte, 2015). El pH fue medido con tiras de pH, considerándose normal un pH de 6 a 7; la coloración se clasificó como blanco lechoso (BL) o amarillento.

Figura 11

Muestra Seminal



Nota. Ejemplo de muestra seminal de color amarillento y de volumen 1,4 mL.

Concentración seminal

Para la concentración se tomó 1 μ L de la muestra y se la diluyó en 199 μ L de formol salino, dilución 1/200 (Factor de dilución = 200). Se colocó 10 μ L de esta mezcla en cada lado de la cámara de Neubauer y se realizó el conteo de 5 sub-cuadrantes centrales. Para obtener la cantidad obtenida de espermatozoides/ml se usó la siguiente ecuación:

$$\text{Concen esperma} = \frac{\# \text{ espermatozoides contados}}{\# \text{ sub - cuadrantes usados en conteo}} * \frac{25 \text{ cuadrantes}}{0,1 \text{ mm}^3} * \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ ml}} * FD$$

Tomando en cuenta que: 5 sub-cuadrantes contados y FD (Factor de dilución) = 200

$$\text{Concen esperma} = \# \text{ espermatozoides contados} * 10 \times 10^6 = \# \text{ espermatozoides} / \text{mL}$$

Motilidad total y progresiva seminal

Para la motilidad total se tomaron 10 μL de la muestra, se colocaron en un portaobjetos previamente temperado (35°C) y se cubrió con un cubreobjetos; luego, con el lente 40x se contaron al azar 10 espermatozoides en el campo, de ellos se determinó el número de espermatozoides que mostraron movimiento frente a los que no, se repitió el procedimiento en 10 campos más y se obtuvo el porcentaje de motilidad.

La motilidad progresiva se calculó de manera similar a excepción de que la comparación fue de espermatozoides que mostraron movimiento lineal y hacia adelante frente a los espermatozoides con otro tipo de movimiento.

Ambas variables fueron analizadas en un microscopio de campo claro (Olympus CX31) a 10x y 40x.

Viabilidad y morfología seminal

El análisis de viabilidad se realizó usando la tinción eosina-nigrosina (Minitube). Para ello se incorporaron 5 μL de nigrosina 4%, 5 μL de eosina 2% y 5 μL de la muestra en un portaobjetos previamente calentado y se realizó el frotis (Figura 12). Luego se realizó el conteo de 200 espermatozoides por portaobjeto, considerándose espermatozoides vivos a aquellos que no se colorearon ya que su membrana plasmática se mantuvo intacta. El conteo se realizó con el software ImageJ-Fiji.

Con esta misma placa se analizó morfología, para lo cual se contaron 200 espermatozoides alrededor de todo el portaobjetos, teniendo en cuenta si las anomalías encontradas eran primarias o secundarias.

Figura 12

Tinción Eosina-Nigrosina para viabilidad seminal.



Nota. Espermatozoides blancos considerados vivos, los teñidos con eosina (rosados) como muertos. Observación con el lente 40x.

Análisis de datos

Se emplearon 5 animales para la obtención de la muestra, con 3 repeticiones por animal. Para cada muestra obtenida se analizaron 5 tratamientos en 5 tiempos distintos (0h, 6h, 12h, 24h, 36h)

La nomenclatura usada para cada muestra es la indicada en la Tabla 8.

Tabla 8

Nomenclatura usada para nombrar cada alícuota a analizar

Semental	Antioxidante	Repeticiones (R ₁ ,R ₂ ,R ₃)				
		0h	6h	12 h	24 h	36h
Semental - S _n (n=1,2,3, 4 o 5)	Vitamina A (A)	S _n I ₁ ,	S _n A ₁ R ₁ ,	S _n A ₂ R ₁ ,	S _n A ₃ R ₁ ,	S _n A ₄ R ₁ ,
		S _n I ₂ ,	S _n A ₁ R ₂ ,	S _n A ₂ R ₂ ,	S _n A ₃ R ₂ ,	S _n A ₄ R ₂ ,
		S _n I ₃	S _n A ₁ R ₃	S _n A ₂ R ₃	S _n A ₃ R ₃	S _n A ₄ R ₃
	Vitamina C (C)	S _n I ₁ ,	S _n C ₁ R ₁ ,	S _n C ₂ R ₁ ,	S _n C ₃ R ₁ ,	S _n C ₄ R ₁ ,
		S _n I ₂ ,	S _n C ₁ R ₂ ,	S _n C ₂ R ₂ ,	S _n C ₃ R ₂ ,	S _n C ₄ R ₂ ,
		S _n I ₃	S _n C ₁ R ₃	S _n C ₂ R ₃	S _n C ₃ R ₃	S _n C ₄ R ₃

Vitamina E (E)	$S_n I_{1,}$	$S_n E_1 R_{1,}$	$S_n E_2 R_{1,}$	$S_n E_3 R_{1,}$	$S_n E_4 R_{1,}$
	$S_n I_{2,S}$	$S_n E_1 R_{2,}$	$S_n E_2 R_{2,}$	$S_n E_3 R_{2,}$	$S_n E_4 R_{2,}$
	I_{13}	$S_1 E_1 R_3$	$S_n E_2 R_3$	$S_n E_3 R_3$	$S_n E_4 R_3$
Selenio (Se)	$S_n I_{1,}$	$S_n Se_1 R_{1,}$	$S_n Se_2 R_{1,}$	$S_n Se_3 R_{1,}$	$S_n Se_4 R_{1,}$
	$S_n I_{2,}$	$S_n Se_1 R_{2,}$	$S_n Se_2 R_{2,}$	$S_n Se_3 R_{2,}$	$S_n Se_4 R_{2,}$
	$S_n I_{3,}$	$S_n Se_1 R_{3,}$	$S_n Se_2 R_{3,}$	$S_n Se_3 R_{3,}$	$S_n Se_4 R_{3,}$
Control (N)	$S_n I_{1,}$	$S_n N_1 R_{1,}$	$S_n N_2 R_{1,}$	$S_n N_3 R_{1,}$	$S_n N_4 R_{1,}$
	$S_n I_{2,}$	$S_n N_1 R_{2,}$	$S_n N_2 R_{2,}$	$S_n N_3 R_{2,}$	$S_n N_4 R_{2,}$
	$S_n I_{3,}$	$S_n N_1 R_{3,}$	$S_n N_2 R_{3,}$	$S_n N_3 R_{3,}$	$S_n N_4 R_{3,}$

El análisis estadístico para los datos de volumen, concentración y morfología inicial se realizó mediante estadística descriptiva, mientras que para el análisis de motilidad total, motilidad progresiva y viabilidad se realizó un diseño completamente al azar (DCA) dispuesto en un arreglo bifactorial 5x5, como factores el Antioxidante (Niveles: A,C,E,Se,N control) y el tiempo de preservación (Niveles: 0h,6h,12h,24h).

Con los datos obtenidos se realizó una prueba Shapiro Wilk para verificar normalidad, una vez cotejado ello se procedió a realizar una prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas. Para la comparación de medias contra el grupo control se realizó la prueba de Dunnet.

Para el análisis y las gráficas estadísticas se usó el software GraphPad Prism 9 con los parámetros antes mencionados.

Capítulo IV: Resultados y Discusión

Evaluación seminal inicial.

Los promedios de los parámetros iniciales obtenidos en este trabajo fueron 0,77 mL para el volumen seminal, $1,63 \times 10^9$ espermatozoides/mL para la concentración, pH=7, así mismo el porcentaje de morfología anormal fue de 16,6 %, la viabilidad, motilidad total y motilidad progresiva seminal iniciales fueron de 89,4%, 86,4% y 78,9% respectivamente (Tabla 9). Estos valores iniciales, a excepción de la concentración, se encontraron en el rango esperado según (Maldonado et al., 2018; Vera & Ricarte, 2015; Tabarez, 2014; Niño, 2013) que proponen como valores adecuados un volumen mayor o igual a 0,40 mL, pH de 7 a 7,5, porcentaje de morfología anormal menor al 30%, motilidad total y viabilidad mayor a 80% y motilidad progresiva mayor a 75%.

Tabla 9

Valores obtenidos de volumen, pH, concentración, morfología anormal y color por semental

Variable	Semental					Promedio
	Semental 1	Semental 2	Semental 3	Semental 4	Semental 5	
Volumen (ml)	0,50±0,06	0,50±0,06	0,87±0,09	0,60±0,06	1,40±0,2**	0,77±0,17
pH	7	7	7	7	7	7
Concentración (esperm/ml *10 ⁹)	1,79±0,01	1,78±0,01	1,73±0,02	1,68±0,01	1,19±0,02****	1,63±0,11
Morfología anormal %	7,17±0,88****	13,83±0,88	16,67±1,01	27,33±0,6	18±0,29****	16,6±3,27
Color	BL	BL	BL	Amarillento	Amarillento	-----
Viabilidad%	90,33±2,08	89,33±0,58	89,67±1,15	89,33±0,58	86±1,53	88,93±1,69
MT%	87,67±2,52	86,33±0,58	86,33±0,58	84,33±0,58	87,33±1,53	86,40±1,3
MP%	81±2,0	77,33±0,58	78±1,0	77,33±0,58	81±2,65	78,87±1,98

Nota. BL = Blanco lechoso, MT = Motilidad total seminal, MP = Motilidad progresiva seminal.

****, *** En la fila indican diferencia significativa con respecto al grupo control (* p ≤ 0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Los valores obtenidos se asemejan a los valores iniciales obtenidos por Vieira Neto et al., (2017) y Malebogo et al., (2015) que obtuvieron un volumen

también de 0,77 mL, morfología anormal de 26%, motilidad total de 85%. Sin embargo la concentración seminal obtenido en este estudio se encuentra por debajo de la media en comparación al valor de otros trabajos realizados, cuyos valores van en rangos desde 2 a 6×10^9 espermatozoides/mL (Gibbons et al., 2017; Hafez & Hafez, 2002; Maldonado et al., 2018). Esto podría deberse a la técnica usada para la extracción seminal, de acuerdo con Abril-Sánchez et al., (2018) la electroeyaculación produce eyaculados de mayor volumen y menor concentración de espermatozoides que los obtenidos por el método vagina artificial (VA), pero no afecta la motilidad de los espermatozoides. En el trabajo de Malebogo et al., (2015) que compara el método de vagina artificial con el de electroeyaculación para extracción seminal en caprinos se observa que con el método de VA se obtiene un valor promedio de volumen seminal de 0,5 mL frente al valor de 1,1 mL con electroeyaculación, así mismo la concentración varía de 6,36 a $4,63 \times 10^9$ espermatozoides/mL.

En cuanto al color, aunque se trate de una variable subjetiva, la coloración seminal descrita en este trabajo como “Blanco lechoso” o “Amarillento” se puede comparar con aquellas descritas por Salviano & Torres De Souza, (2015) que definen la coloración seminal como “Blanco grisáceo” y “Amarillo” a aquellas de correcta calidad seminal.

Para la variable pH todas las muestras se mantuvieron en el rango de neutralidad (pH=7), valor similar con los resultados obtenidos por Yodmingkwan et al., (2016). De igual manera Liu et al., (2016) afirma que los valores óptimos de pH para semen caprino se encuentran en el rango 7,0 a 7,5. Sin embargo, en este trabajo debido a que se hizo uso de tiras de medición de pH no se pudo obtener datos más precisos sobre este valor.

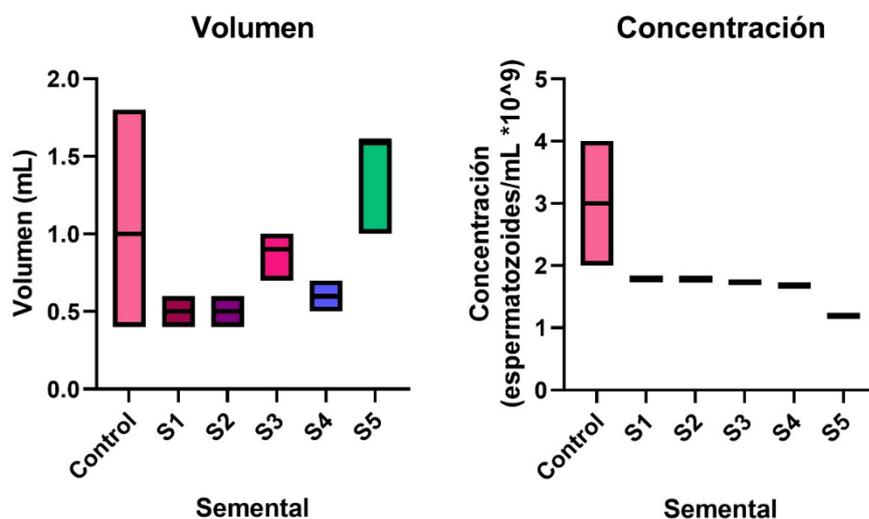
Respecto a los resultados obtenidos por semental, en este trabajo se analizaron las muestras seminales de 5 sementales de edades (11, 13, 33 meses) y diámetro testicular diferentes (6, 6.5, 8.5, 9 cm). De acuerdo a Leboeuf et al., (2020)

la calidad seminal puede variar según factores como la edad, peso, la ubicación geográfica, la temporada y la raza. En un estudio de Mia et al., (2013) en donde se ha comparado estos efectos en cabras de la raza Bengal Negra, se ha observado que la variabilidad de volumen y concentración seminal según la edad entre machos de 9 a 36 meses oscila entre 0,46 a 0,72 mL y entre $2,42$ a $2,76 * 10^9$ espermatozoides/mL. Así mismo se encontró que el peso del semental (12 - 30 kg) influyó en los volúmenes de semen obtenidos su estudio que fueron de 0,40 – 0,62 mL, respectivamente, sin embargo, no observó diferencia en la concentración obtenida según esta variable.

En el caso de la cabra criolla Chusca Lojana, animal de este estudio el volumen obtenido del semental 5 (1,4 mL) fue mayor en comparación a la de los otros sementales: 0,50, 0,87 y 0,60 mL. Sin embargo, todos los volúmenes se mantuvieron en el rango esperado (0,4 - 116 mL). Por otro lado, la concentración en este semental fue de $1,19 * 10^9$ espermatozoides/mL menor en comparación al resto ($1,79$, $1,78$, $1,73$ y $1,68 * 10^9$ espermatozoides/mL). Este macho tiene 13 meses de edad, peso de 36,8 Kg y diámetro testicular de 13 cm factores que en su conjunto pudieron haber influido para que haya esta diferencia de volumen y concentración respecto a los otros animales analizados. Así mismo de acuerdo con Tabarez et al., (2017) al realizar un análisis de la calidad del semen fresco de los machos de la cabra Blanca de Rasquera mostraron que la edad del macho tuvo un efecto sobre el volumen de los eyaculados y sobre la integridad funcional de la membrana espermática con valores más altos observados en machos de dos años. Sin embargo, en este caso se observó el valor más alto para el macho de un año, mientras que con el semental de dos años se consiguieron 0,5 mL.

Figura 13

Comparación de los volúmenes y concentración obtenidos por cada semental

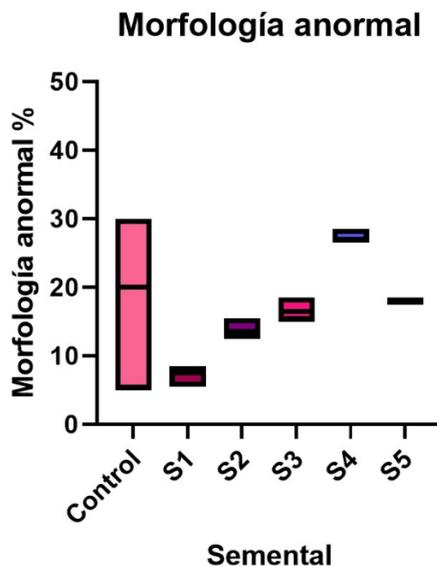


Nota. Diagramas de barras flotantes que representan los resultados obtenidos de n= 3 muestras por semental para volumen y concentración en comparación a los valores del grupo control.

La morfología por otra parte fue mayor en uno de los sementales de menor edad (S5) y menor para el mayor de ellos (S1). Sin embargo, todos los valores obtenidos para esta variable se encuentran en el rango de entre 5 a 30% como se observa en la Figura 14. Trabajos realizados en cabras, toros y en humanos (Judy Felton-Taylor et al., 2019; Kumar et al., 2017; Maldonado et al., 2018; Vilakazi & Webb, 2014), indican que la edad también puede ser un factor determinante para la cantidad de anomalías encontradas, machos muy jóvenes o muy viejos pueden presentar mayor porcentaje de anomalía morfológica seminal, así mismo Lekan & Suleima, (2013) mencionan que las características morfológicas de los espermatozoides también están influenciadas por otros factores como la composición genética y la etapa fisiológica del animal, su nutrición, peso, factores climáticos y su estado de salud.

Figura 14

Porcentaje de la morfología anormal seminal de cada semental

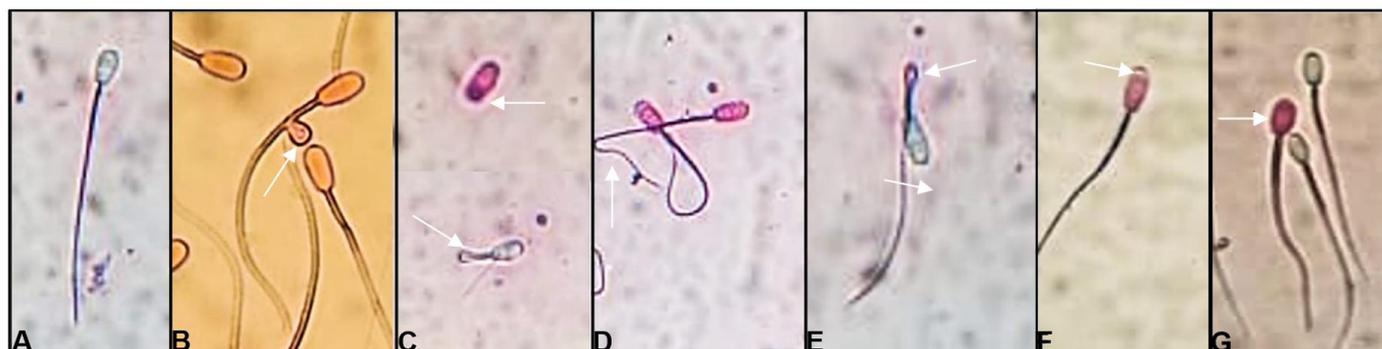


Nota. Diagramas de barras flotantes que representan los resultados obtenidos de n= 3 muestras por semental para el porcentaje de morfología anormal en comparación a los valores del grupo control.

Las anomalías encontradas en este estudio consistieron en cabezas desprendidas, colas enrolladas, gotas citoplasmáticas, colas dobladas (zona distal y proximal) (Figura 15). Estos resultados son similares a los obtenidos por Gororo et al., (2019) a excepción que en este trabajo no se observaron colas dobles. Las anomalías morfológicas de acuerdo a Salviano & Torres De Souza, (2015) pueden dividirse en primarias (causadas durante el proceso espermatogénico) o secundarias (que afecta al espermatozoide una vez formado). En este trabajo se observaron en su mayoría anomalías secundarias (colas dobladas) (Tabla 10). Según Ambali et al., (2018) este tipo de anomalías espermáticas pueden deberse a un trastorno de los túbulos seminíferos, durante la eyaculación o en la manipulación de la muestra seminal, incluida la excesiva agitación, sobrecalentamiento o enfriamiento rápido, mezcla de agua, orina o antiséptico en el semen.

Figura 15

Anormalidades espermáticas encontradas en las muestras seminales.



Nota. A. Espermatozoide normal, B. Flecha blanca indica gota citoplasmática, C. Flecha blanca superior indica cabeza desprendida e inferior señala cola enrollada, D. Flecha apunta zona de pieza media distal doblada, E. Flecha blanca señala pieza principal doblada, F. Flecha blanca indica la anomalía denominada diadema, G. Flecha apunta al espermatozoide con cabeza grande.

Tabla 10

Valores obtenidos de las anomalías morfológicas encontrada.

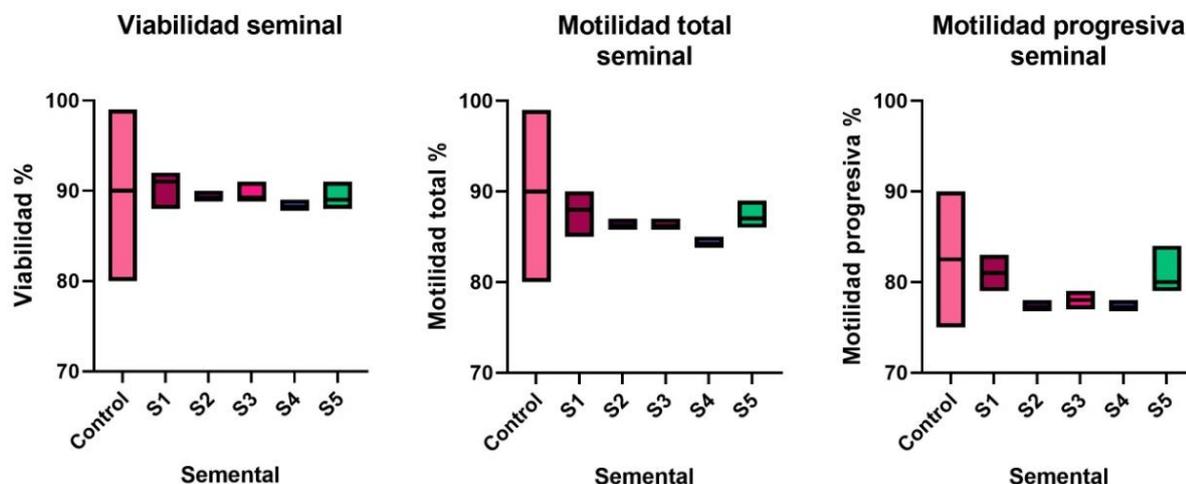
Sementales		Semental 1			Semental 2			Semental 3			Semental 4			Semental 5			
Repeticiones		R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	
Anormalidades primarias	Cabeza	Cabeza gigante	1	1	1	2					1		2				
		Diadema	12	7	6		5	2	3	1							
	Cola	Cola enrollada	2	1		1	3	2	2	1	1	2	1	2			
		Gota proximal		1		2	1	3	3	4	3			4			
	Anormalidades secundarias	Cabeza	Cabezas normales desprendidas			1	1	2	1		1	3	1		3	1	
			Pieza media distal doblada		1	4	11	13	4	15	6	8	18	8	5	3	2
Cola		Pieza principal doblada		1	5	9	14	11	19	17	17	32	38	40	31	28	35
		Total células anormales/200	15	11	17	25	31	27	37	30	33	54	53	57	37	35	36

Por otro lado, todos los valores de viabilidad, motilidad total y motilidad progresiva seminal por semental se encontraron en los rangos establecidos como control, como se puede observar en la Figura 16. Es decir, para la viabilidad y

motilidad total los valores fueron mayores o iguales al 80% y para motilidad progresiva los valores fueron mayores al 75%.

Figura 16

Viabilidad, motilidad total y motilidad progresiva seminal iniciales por semental.



Nota. Diagramas de barras flotantes que representan los resultados obtenidos de n= 3 muestras por semental para viabilidad, motilidad total y motilidad progresiva seminal en comparación a los valores del grupo control.

Los resultados obtenidos en este trabajo respecto a la evaluación inicial son considerados positivos ya que como lo menciona (Mellado, 2020) valores seminales dentro del rango esperado permiten tener mayor confianza de que los procesos de conservación y posterior inseminación artificial serán exitosos así como también permite identificar a aquellos machos que proporcionan las muestras como mejor calidad seminal.

Evaluación de motilidad seminal total, progresiva y viabilidad seminal.

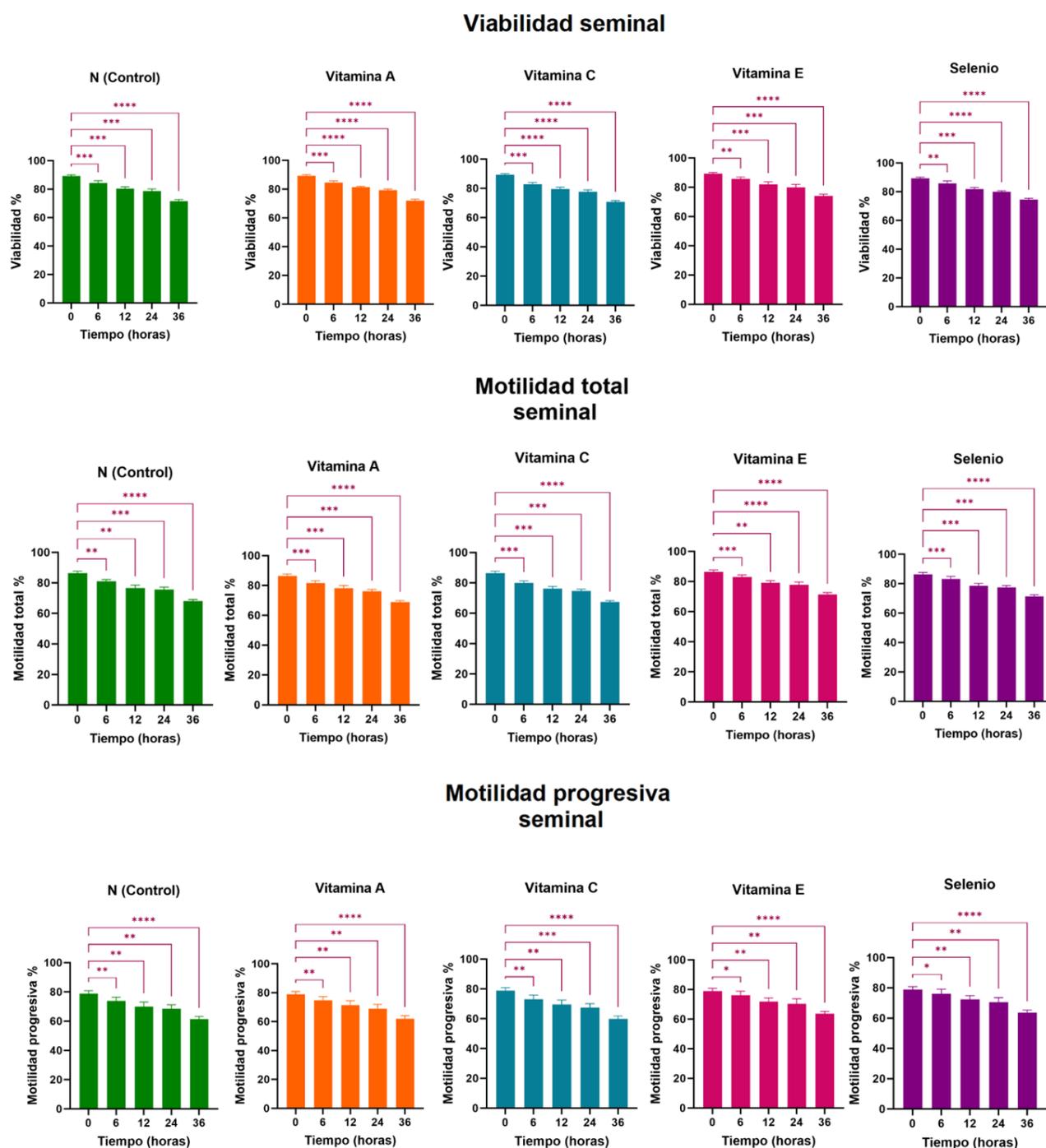
Los datos analizados de las variables motilidad seminal total, progresiva y viabilidad seminal mostraron que existe diferencia significativa entre los tiempos post colecta a las 6,12,24 y 36 h en comparación al tiempo 0h para cada tratamiento

($p < 0.0001$) (Figura 17). Además, se observó influencia del tiempo en la viabilidad seminal $F(2,694, 10,78) = 531,9$; $p < 0,0001$, en la motilidad total $F(1,700, 6,802) = 297,1$; $p < 0,0001$ y en la motilidad progresiva $F(1,740, 6,959) = 169,6$; $p < 0,0001$.

Resultados esperados, ya que como lo indica Gororo et al., (2019) el tiempo tiene un efecto grande y significativo sobre la pérdida de la calidad del semen. La pérdida de calidad seminal con el tiempo es inevitable para los espermatozoides, ya que son células catabólicas con poca o ninguna capacidad de recuperación. En especial la calidad de los espermatozoides que se mantienen *in vitro* se ve rápidamente disminuida por el agotamiento de la energía y los nutrientes, la generación de especies reactivas de oxígeno y los cambios en las condiciones osmóticas a lo largo del tiempo. Así mismo como lo mencionan (Subhan, Khan, Mushtaq, & Sultan, 2013) el almacenamiento seminal ya sea fresco, en refrigeración o congelación suele provocar daño ultraestructural, bioquímico y funcional a los espermatozoides, lo que resulta en una reducción de la motilidad, viabilidad, fertilidad y transporte deficiente.

Figura 17

Influencia del tiempo en las variables viabilidad seminal, motilidad total y motilidad progresiva seminal.



Nota. Diferencia estadísticamente significativa ANOVA de dos vías seguido por la prueba de comparación múltiple Dunnett: * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

En cuanto al análisis de los antioxidantes, se observó que existió influencia de este factor en las variables de calidad seminal analizadas: viabilidad seminal (F

(2,182, 8,726) = 32,47; $p < 0,0001$), motilidad total ($F(1,805, 7,222) = 38,46$, $p = 0,0002$) y motilidad progresiva ($F(1,676, 6,702) = 29,33$; $p = 0,0006$). Así mismo hubo interacción entre estos factores.

Mediante el análisis del porcentaje de motilidad seminal total, motilidad progresiva y viabilidad seminal se pudo observar que con el uso de vitamina E (0,95 $\mu\text{g/mL}$) y con el Selenio (1 $\mu\text{g/mL}$) las muestras seminales conservadas a 5°C prolongan su calidad en niveles óptimos por las 36 horas de análisis a diferencia del grupo control y de los otros dos tratamientos (vitaminas A y C) con los que en comparación se obtienen valores inferiores en el análisis de estos parámetros.

Mellado, (2008) manifiesta que una muestra seminal sea considerada satisfactoria posee un porcentaje de motilidad superior al 70% o mayor a 3 puntos, así mismo Ureña, (2018) propone que la viabilidad seminal posea porcentaje mayor al 70 u 80%, mientras que Vera & Ricarte, (2015) sugiere que la motilidad progresiva es considerada como adecuada al ser mayor al 60%.

En el caso de la viabilidad seminal, a las 36 horas de análisis se obtuvo un valor de 71,6% para el grupo control, a diferencia del 74,1% y del 74,5% obtenidos para la vitamina E y el selenio respectivamente (Figura 18), es decir existió una diferencia de 3%, lo que representó una diferencia significativa para ambas variables (** $p < 0,01$). Similares resultados se han observado por Tabatabaei et al., (2011) que evaluaron la efectividad de la vitamina E para la preservación de semen de gallo a 4°C, en este caso la viabilidad en su estudio mostro valores mayores para las muestras suplementadas con la vitamina en comparación al grupo control a las 24h de evaluación. Para el caso del selenio, en el trabajo realizado por Tareq et al., (2010), la suplementación seminal con este elemento permitió una mayor viabilidad en muestras seminales de porcino a las 3 horas de evaluación.

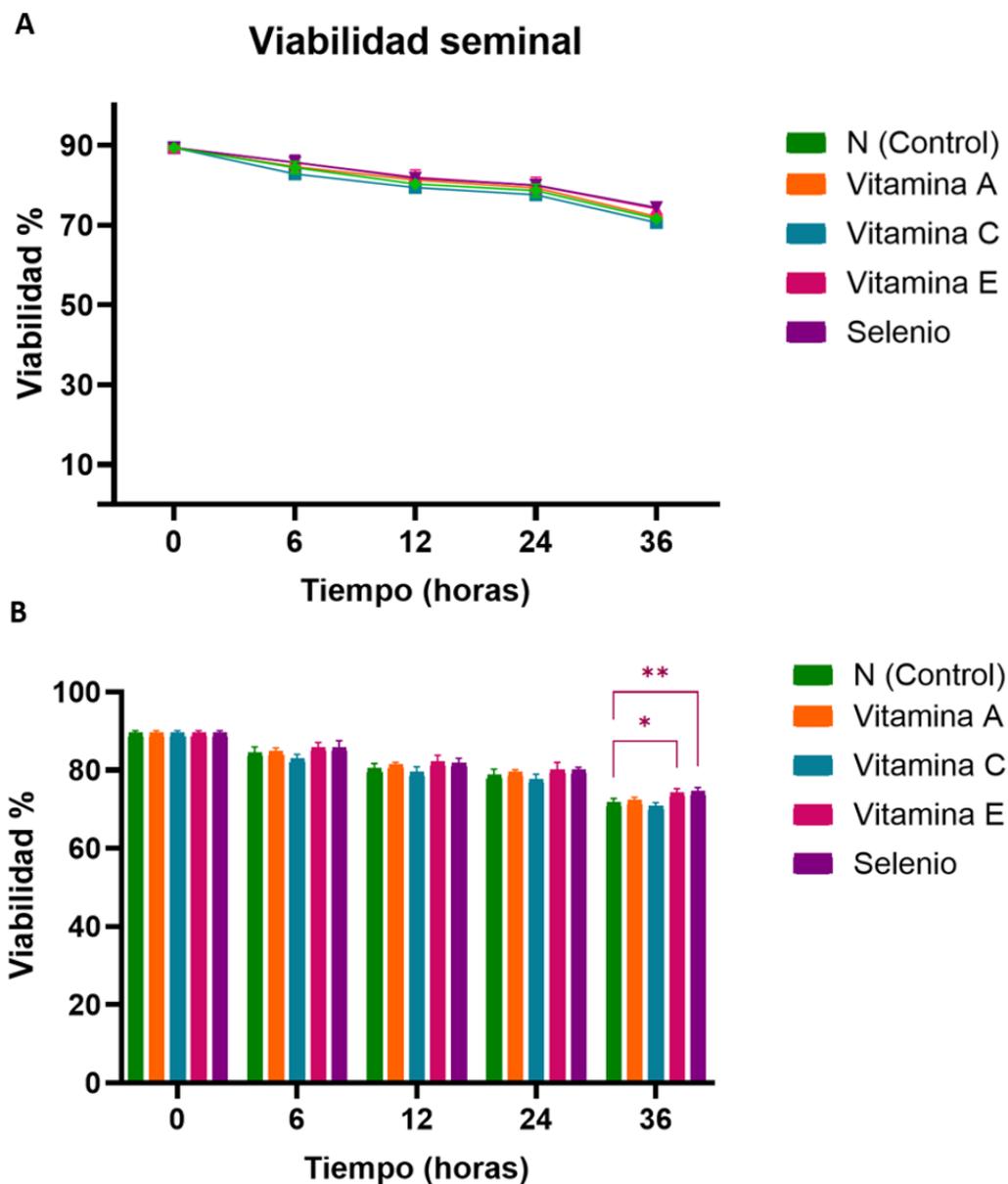
En el caso de la vitamina A (2 $\mu\text{g/mL}$), no se observaron cambios significativos para su efecto en la viabilidad seminal, aunque el valor obtenido

(72,1%) resultó ligeramente superior al grupo control (71,6%). Estos resultados tienen relación con los obtenidos con Maya-Soriano et al., (2013) en donde se analizó el efecto de esta vitamina a diferentes temperaturas (4°C, 22 °C, 32 °C y 41.5 °C), para la temperatura de 4°C ,similar a la usada en este trabajo (5 °C), tampoco se observó que haya influencia de la vitamina A en la viabilidad seminal, sin embargo si se observaron valores positivos a los 41,5°C.

La vitamina C (8,5 mg/mL) por otro lado si bien no mostró diferencia significativa en su efecto en la viabilidad seminal, los valores tendieron a ser menores que comparados al grupo control. Esto puede deberse a que como lo explica Vasconcelos et al., (2013) la vitamina C puede llegar a actuar como prooxidante. En presencia por ejemplo de metales de transición este elemento hace que los radicales sean altamente reactivos y más destructivos lo que conllevaría a la producción de más radicales libres.

Figura 18

Efecto de los tratamientos en la viabilidad seminal.



Nota. A. Curvas de viabilidad seminal a través del tiempo y con cada tratamiento. B. Diagrama de barras del efecto de los tratamientos y en los distintos tiempos. Los resultados son las medias \pm SD. Diferencia estadísticamente significativa ANOVA de dos vías seguido por la prueba de comparación múltiple Dunnet: * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$.

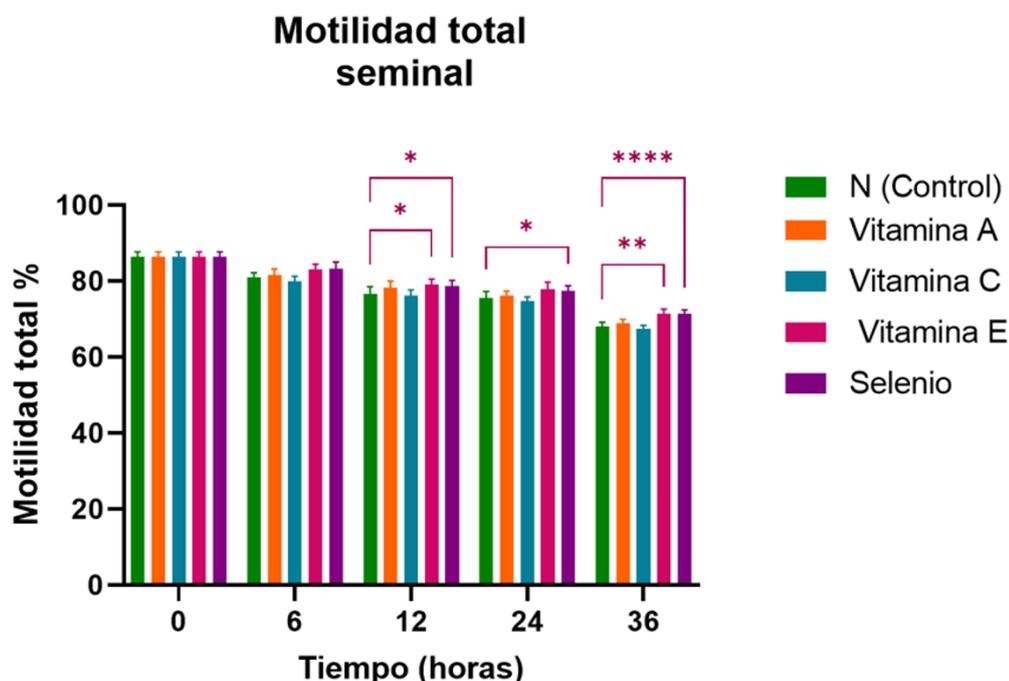
Con respecto al porcentaje de motilidad total, este también fue superior con los tratamientos de vitamina E (0,95 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Selenio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) respecto al grupo control a partir de las 12h de conservación. Además, si bien a las 12 y 24 h existió diferencia significativa ($p \leq 0.05$), a las 36 h se observó un mayor porcentaje de

motilidad total respecto al grupo control (68,1%) tanto para la vitamina E (71,5%) como para el Selenio (71,5%), es decir una diferencia de 3,4% (Figura 19). Así mismo si analizamos los datos obtenidos de acuerdo con la escala subjetiva propuesta por Hafez & Hafez, (2000) (Tabla 11), los valores de motilidad total obtenidos con ambos antioxidantes son considerados como “buenos” a diferencia de los obtenidos con el resto de los tratamientos considerados como “regulares”.

Estudios realizados por Asmarawati & Yuwanta, (2010) para la conservación seminal de gallo a temperatura de 4°C, también obtuvieron valores favorables para la variable de motilidad total al usar 0,1mM por un rango de 72 h, sin embargo a partir de las 24 horas el declive de esta variable es mayor. Así mismo en un estudio realizado en semen de urogallo preservado por 24h a 4°C se observa que con el uso de selenio (1 mg/mL) y de vitamina E (8 mg/mL) los valores de motilidad total se mantienen superiores (Kowalczyk, Klećkowska-Nawrot, & Łukaszewicz, 2017).

Figura 19

Efecto de los tratamientos en la motilidad seminal total.



Nota. A. Curvas de motilidad seminal total a través del tiempo y con cada tratamiento. B. Diagrama de barras del efecto de los tratamientos y en los distintos tiempos. Los resultados son las medias \pm SD. Diferencia estadísticamente significativa ANOVA de dos vías seguido por la prueba de comparación múltiple Dunnett: * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Tabla 11

Valores obtenidos de motilidad total seminal para cada tratamiento según escala subjetiva de Hafez.

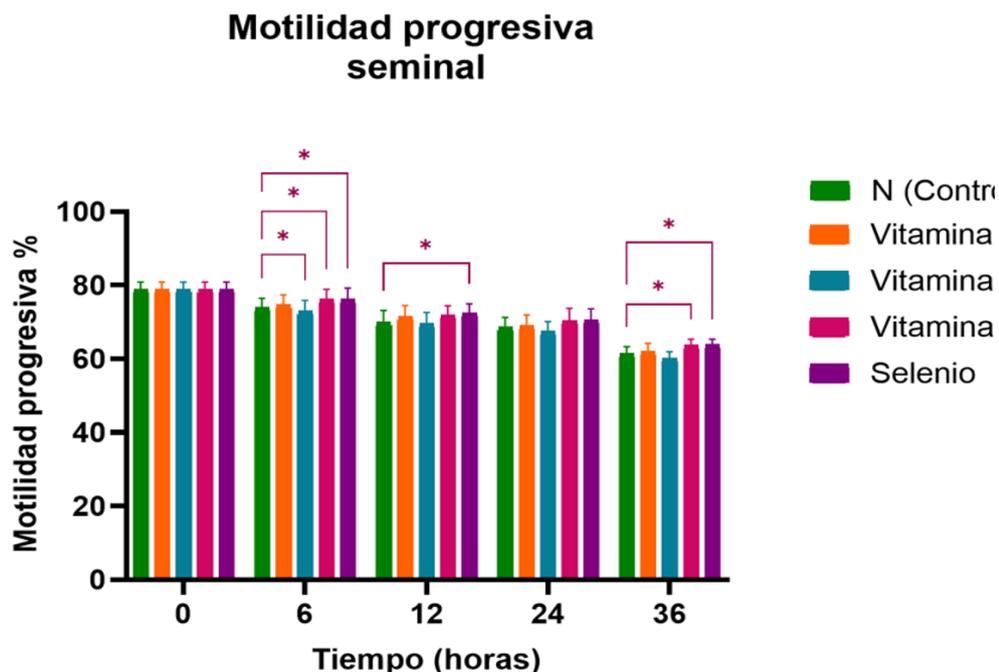
Tiempo post colecta (hrs)	Motilidad Total Seminal				
	Vitamina A	Vitamina C	Vitamina E	Selenio	N (Control)
0	4 (Bueno)	4 (Bueno)	4 (Bueno)	4 (Bueno)	4 (Bueno)
6	4 (Bueno)	4 (Bueno)	4 (Bueno)	4 (Bueno)	4 (Bueno)
12	4 (Bueno)	4 (Bueno)	4 (Bueno)	4 (Bueno)	4 (Bueno)
24	4 (Bueno)	4 (Bueno)	4 (Bueno)	4 (Bueno)	4 (Bueno)
36	3 (Regular)	3 (Regular)	4 (Bueno)	4 (Bueno)	3 (Regular)

Por otro lado, para el porcentaje de motilidad progresiva se observa diferencia significativa a las 6,12 y 36h de conservación. La vitamina E (0,95 μ l/mL) fue mayor significativamente a las 6 y 36 h ($p \leq 0.05$), mientras que el Selenio

(1µg/mL) lo fue a las 6, 12 y 36h ($p \leq 0.05$). La vitamina C (8,5 mg/mL) también mostro diferencia significativa a las 6 h pero con valores inferiores al grupo control ($p \leq 0.05$) (Figura 20). De manera similar a las otras variables analizadas la mayor diferencia se dio a las 36 h post coleta, la motilidad progresiva para el grupo control fue de 61,4% frente a los obtenidos con la vitamina E (63,4%) y el selenio (63,8%). En este caso la diferencia obtenida entre tratamientos fue de 2% y 2,4% más en relación con el control. Otros estudios han obtenido resultados similares con el uso de Trolox, un análogo de la vitamina E, en semen de carnero y de caballo , (Mata-Campuzano et al., 2014). Así mismo en el caso de la implementación de selenio en semen de pavo, se observó mejores resultados de esta variable en comparación al grupo control (Dimitrov, Atanasov, Surai, & Denev, 2007).

Figura 20

Efecto de los tratamientos en la motilidad seminal progresiva.



Nota. A. Curvas de motilidad seminal progresiva a través del tiempo y con cada tratamiento. B. Diagrama de barras del efecto de los tratamientos y en los distintos tiempos. Los resultados son las medias \pm SD. Diferencia estadísticamente significativa ANOVA de dos vías seguido por la prueba de comparación múltiple Dunnet: * $p \leq 0.05$.

Según Allai et al., (2018) la vitamina E es un potente eliminador de radicales peroxilo y probablemente el inhibidor más importante de la reacción en cadena de la lipoperoxidación en animales. Así mismo se cree que la función de la vitamina E en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) está involucrada en la desaceleración de la destrucción celular y los procesos de envejecimiento (Muhammad, Zubair Mohsin et al., 2015). Estas características podrían explicar porque con este antioxidante se obtuvieron mejores resultados para estos parámetros, además en investigaciones realizadas en caprinos, así como en otras especies animales, similares resultados se han obtenido. Según el análisis realizado por Soares et al., (2015) en semen caprino criopreservado, se obtuvieron resultados positivos luego de 30 días de conservación. De igual manera Allai et al., (2018)

informaron que la adición de 1 o 2 mg de vitamina E en conservante a base de yema de huevo/citrato mejoró la motilidad y la integridad de la membrana del semen refrigerado en carnero. De forma similar (2013) reportan resultados favorables en semen ovino conservado a 5 °C por 120 h, mostrando una mejora de estas variables desde la hora 6 de conservación.

En cuanto al selenio en un trabajo realizado por Dorostkar, Alavi-Shoushtari, & Mokarizadeh, (2012) en semen de búfalo se obtuvieron también resultados positivos al preservar el semen a 4 °C por 120 min con concentraciones de 1 y 2 µg/ml de selenio. Estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo empleando la misma concentración de selenio (1 µg/mL). Así mismo se ha demostrado que el uso de 1 a 2 µg/mL de selenio puede mejorar la calidad seminal en ratones, humanos, ovejas o bovinos (Muhammad, Zubair Mohsin et al., 2015). Los resultados favorables se podrían explicar porque como lo mencionan Łukaszewicz et al., (2020) el selenio forma parte de la estructura de la enzima glutatión peroxidasa, y junto con la vitamina E ayuda como antioxidante biológico y mantiene la consistencia celular. Esta enzima protege las estructuras internas de las células contra los radicales libres y es un antioxidante para los lípidos de la membrana celular (Dorostkar et al., 2012).

En cuanto a las vitaminas A y C, como se detalló, no se obtuvieron resultados favorables, Memon et al., (2013) explica que la presencia de ácido ascórbico en los fluidos extracelulares ayuda en varios mecanismos involucrados en la protección de la célula contra el estrés oxidativo, en algunos trabajos se ha observado que a concentraciones mayores a 2,5 mM la vitamina C ha desencadenado efectos perjudiciales para las muestras seminales. Ejemplo de ello se ha observado en trabajos en caballo, perro y humano (Michael et al., 2018; Vasconcelos Franco et al., 2013). En esta investigación se usó una concentración de 8mM (8,5 mg/mL) de vitamina C, la cantidad usada podría explicar el efecto

desfavorable de este antioxidante para los parámetros de motilidad total y motilidad progresiva. Sin embargo, existen también estudios en donde si se ha logrado obtener resultados favorables, en la investigación de Memon et al., (2013) obtuvieron valores de motilidad superiores al grupo control con concentraciones de 2,5 y 8,5 mg/mL de ácido ascórbico en la conservación seminal de esperma caprino pre y post congelación, de igual manera Ibrahim et al., (2013) lograron obtener efectos positivos al aplicar 0,9 mg/mL de vitamina C para conservación seminal de ovino a 5°C. La variabilidad de resultados obtenidos con esta vitamina hace necesario mayor número de investigaciones.

Los efectos de la vitamina A en la motilidad seminal total como en la progresiva tampoco tuvieron diferencia significativa. Análisis realizados con esta vitamina por Maya-Soriano et al., (2015) mostraron que la suplementación con retinol en el conservante no tiene ningún efecto beneficioso sobre la viabilidad, motilidad, progresividad e integridad acrosómica y morfológica de los espermatozoides de conejo usando concentraciones de 50, 100 y 200 μM , en este caso se hizo uso de una cantidad mucho menor (6 μM), sin embargo, tampoco se observaron resultados favorables para ninguna de las variables analizadas.

Además de la influencia del tiempo y los antioxidantes en la conservación seminal en refrigeración, aquí analizados, variables como la temperatura de refrigeración empleada, el rango de dilución y el conservante usados pueden tener efecto en la calidad seminal. En cuanto a la temperatura escogida para este protocolo, se ha observado que en su mayoría la preservación seminal caprina de corto plazo ha dado mejores resultados a 5°C en comparación a otras investigadas (El-Battawy, 2019; Paschoal et al., 2020; Salvador, Yániz, Viudes-de-Castro, Gómez, & Silvestre, 2006). En un estudio de comparación de la preservación seminal caprina a 5° C vs a 17°C se demostró que la calidad seminal a 5°C se mantuvo en niveles significativamente mayores en cuanto a motilidad total (71,5%) en comparación a lo

obtenido con 17 °C (53,7%) (Sadeghi et al., 2020). La misma tendencia se observa al analizar conservación seminal caprina a temperaturas de 20, 25 y 38,5 °C (Xu et al., 2017). De igual manera, este autor obtiene mejores resultados al realizar una dilución 1:10 de conservante:muestra seminal en comparación a lo obtenido con diluciones 1:2 y 1:3, Murphy et al., (2013) encontró que los espermatozoides en especies de rumiantes como bovino, almacenados en diluciones más altas mostraron mayor viabilidad y consumo reducido de glucosa, mientras que Johnke, Graaf, & Bathgate, (2015) explica que cuando los espermatozoides están en conservación a altas concentraciones (baja dilución), puede haber un incremento en el estrés oxidativo induciéndose consecuentemente el daño al ADN nuclear y mitocondrial. En ese sentido el uso en este trabajo de la dilución 1:10 es justificado. Así mismo el conservante usado (Triladyl®), al ser en base de uso comercial (testado) y en base a yema de huevo (5,6%) ha mostrado resultados satisfactorios para conservación seminal en bovinos, caprinos y ovinos tanto para preservación en refrigeración como en congelación (Rekha et al., 2018; por lo que mantiene la calidad seminal.

Los resultados obtenidos con dos de los antioxidantes usados (vitamina E (0,95 µl/mL) y Selenio (1 µg/mL)) mejoran el proceso de conservación seminal con fines de uso para programas de reproducción por lo que su aplicación para la preservación seminal de la cabra criolla Chusca Lojana a 5°C en diluyente comercial Triladyl® es propuesto.

Capítulo V: Conclusiones

Los antioxidantes con los que se obtuvo mejores resultados de calidad seminal (motilidad total (>70%), motilidad progresiva (>60%) y viabilidad seminal (>70%)) a través del tiempo (0-36h) fueron la vitamina E (0,95 µl/mL) y el Selenio (1 µg/mL).

Mantener una adecuada calidad seminal, en este caso caprina, es indispensable para lograr un programa de inseminación artificial satisfactorio. Debido a ello y con los resultados obtenidos de calidad seminal antes expuestos, se propone como protocolo de conservación seminal el uso de los antioxidantes vitamina E (0,95 µl/mL) o Selenio (1 µg/mL) en el conservante comercial Triladyl (1:10) a una temperatura de 5°C en un rango de tiempo post colecta de 0-36 horas.

El semen caprino conservado con el protocolo propuesto en este trabajo podrá ser usado en los programas de reproducción (inseminación artificial), principalmente para la inseminación de cabras en celo que se encuentren en zonas periféricas al lugar en donde habita el macho donante y por ende no se pueden inseminar inmediatamente post colecta.

En cuanto a las pruebas seminales analizadas en el tiempo 0 se obtuvieron valores aceptables en cuanto a volumen de eyaculado (0,5; 0,6; 0,87; 1,4 mL), pH (7), color (Blanco lechoso, amarillo), porcentaje de anomalías morfológicas (7,17; 13,83; 16,67; 27,33; 18), viabilidad seminal inicial (90,33%, 89,33%, 89,67%, 88,33%, 89,33%, 89,67%), motilidad total inicial (87,67%, 86,33%, 86,33%, 84,33%, 87,33%) y motilidad seminal progresiva inicial (81,00%, 77,33%, 78,00%, 77,33%, 81,00%, 82,50%) para las muestras seminales obtenidas de los 5 machos estudiados, sin embargo, la concentración espermática se mantuvo por debajo de los valores reportados en bibliografía para todos los sementales ($2-6 \times 10^9$

espermatozoides/mL). Así mismo la edad, peso del semental y método de colecta podría ser un factor influyente para los datos obtenidos.

Los factores tiempo, antioxidante y su interacción influyeron en la calidad espermática, en sus parámetros de viabilidad ($<0,0001$; $<0,0001$; $0,0036$) motilidad total ($<0,0001$; $0,0002$; $0,0020$) y motilidad progresiva seminal ($<0,0001$; $0,0006$; $0,0183$).

Capítulo VI: Recomendaciones

Con el objeto de mejorar el protocolo de conservación seminal se recomienda usar técnicas propuestas como favorables, como la extracción del plasma seminal en conjunto con la adición de uno de los antioxidantes que dieron resultados favorables y/o el uso de otros conservantes seminales.

Para obtener datos más exactos de pH, se recomienda usar un potenciómetro para su medición.

De ser posible para la obtención de información más precisa en cuanto a calidad seminal se recomienda analizar también parámetros seminales como los niveles de especies reactivas de oxígeno, la integridad del acrosoma, vigor (rapidez con la que se mueven los espermatozoides) y potencial de membrana mitocondrial.

Referencias

- Abril-Sánchez, S., Crosignani, N., Freitas-de-Melo, A., Terrazas, A., Damián, J. P., Beracochea, F., ... Ungerfeld, R. (2018). Sedation or anaesthesia decrease the stress response to electroejaculation and improve the quality of the collected semen in goat bucks. *Animal*, *12*(12), 2598–2608.
<https://doi.org/10.1017/S1751731118000320>
- Allai, L., Benmoula, A., Marciane da Silva, M., Nasser, B., & El Amiri, B. (2018). Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal Reproduction Science*, *192*, 6–17.
<https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2018.03.019>
- Ambali, L., Anoh K, U., & Suleiman, O. (2018). International Journal of Livestock Production Relationships between sperm morphology and semen cation concentrations in red sokoto goats (*Capra aegagrus hircus*), *9*(6), 108–111.
<https://doi.org/10.5897/IJLP2015.0280>
- Asmarawati, W., & Yuwanta, T. (2010). The effect of adding vitamin c and e in native chicken semen extender stored at temperature 4 o c on semen quality and egg fertility . *International Seminar on Tropical Animal Production (ISTAP)*, 19–22. Retrieved from
<https://jurnal.ugm.ac.id/istaproceeding/article/viewFile/30492/18396>
- Bidot, A. (2017). Composición, cualidades y beneficios de la leche de cabra: revisión bibliográfica. *Revista de Producción Animal*, *29*. Retrieved from
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202017000200005
- Boe-Hansen, G. B., & Satake, N. (2019). An update on boar semen assessments by flow cytometry and CASA. *Theriogenology*, *137*, 93–103.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2019.05.043>

- De La Rosa, S. (2011). Base Animal y Mejora Genética. In *MANUAL DE PRODUCCION CAPRINA* (Primera, pp. 109–138).
- Dimitrov, S. G., Atanasov, V. K., Surai, P. F., & Denev, S. A. (2007). Effect of organic selenium on Turkey semen quality during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, *100*, 311–317. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.07.007>
- Dorostkar, K., Alavi-Shoushtari, S. M., & Mekarizadeh, A. (2012). Effects of in vitro selenium addition to the semen extender on the spermatozoa characteristics before and after freezing in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Veterinary Research Forum*, *3*(4), 263. Retrieved from /pmc/articles/PMC4313046/
- Gibbons, A., Cueto, M., & Wolff, M. (2017). Inseminación artificial en la especie caprina. *Reproducción y Genética*. Retrieved from https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-manual_inseminacion_artificial_en_caprinos.pdf
- Gororo, E., Zulu, P. T., Chatiza, F. P., & Mhuka, C. (2019). Effects of different extenders and storage temperatures on longevity of small East African goat (*Capra hircus*) semen. *Small Ruminant Research*, *175*(April), 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.04.013>
- Hafez, B., & Hafez, E. (2002). *Reproducción e inseminación artificial*. (M. Hill, Ed.) (7ma Edición).
- Heifer. (2018, March 3). CRIANZA DE CABRAS EN EL BOSQUE SECO. Retrieved November 5, 2020, from <http://www.heifer-ecuador.org/wp-content/uploads/2018/03/3.-Guía-Técnica-Cabras.pdf>
- Ibrahim Azawi, O., Khudhur Hussein, E., & Ibrahim Azawi BVM, O. (2013). *Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5 °C*. *ARTICLE Veterinary Research Forum* (Vol. 4).

- J, W., H, C., X, X., C, F., F, F., J, Z., ... X, Z. (2014). Effect of vitamin C on growth of caprine spermatogonial stem cells in vitro. *Theriogenology*, *81*(4), 545–555.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2013.11.007>
- Johinke, D., Graaf, S. de, & Bathgate, R. (2015). The Effect of Sperm Concentration and Storage Vessel on Quercetin-Supplemented Rabbit Semen During Chilled Storage. *Reproduction in Domestic Animals*, *50*(4), 567–573.
<https://doi.org/10.1111/RDA.12525>
- Judy Felton-Taylor, Kelli A. Prosser, Juan H. Hernandez-Medrano, Sheridan Gentili, Katrina J. Copping, Paula E. Macrossan, & Viv E.A. Perry. (2019). Effect of breed, age, season and region on sperm morphology in 11,387 bulls submitted to breeding soundness evaluation in Australia | Elsevier Enhanced Reader. *Therionology*, 1–7. Retrieved from
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.001>
- Kowalczyk, A., Klećkowska-Nawrot, J., & Łukaszewicz, E. (2017). Effect of selenium and vitamin E addition to the extender on liquid stored capercaillie (*Tetrao urogallus*) semen quality. *Reproduction in Domestic Animals*, *52*(4), 603–609.
<https://doi.org/10.1111/RDA.12955>
- Kumar, N., Singh, K., Choudhari, A. R., & Gandhi, M. (2017). Impact of age on semen parameters in male partners of infertile couples in a rural tertiary care center of central India: A cross-sectional study. *Int J Reprod BioMed*, *15*(8), 497–502.
- Kumar, P., Kumar, R., Mehta, J. S., Chaudhary, A. K., Ravi, S. K., Chandra Mehta, S., ... Talluri, T. R. (2019). Ameliorative Effect of Ascorbic Acid and Glutathione in Combating the Cryoinjuries During Cryopreservation of Exotic Jack Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, *81*, 102796.
<https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2019.102796>

- Leboeuf, B., Delgadillo, J. A., Manfredi, E., Piacère, A., Clément, V., Martin, P., ... De Cremoux, R. (2008). Management of Goat Reproduction and Insemination for Genetic Improvement in France. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(SUPPL.2), 379–385. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2008.01188.X>
- Lekan, A. A., & Suleima, I. (2013). RELATIONSHIPS BETWEEN SPERM MORPHOLOGY, SEMEN CHARACTERISTICS, TESTICULAR MEASUREMENTS AND BODY CONFORMATION TRAITS IN RED SOKOTO GOAT. *International Journal of Advanced Biological Research*, 3(3), 348–353. Retrieved from https://www.academia.edu/16751194/RELATIONSHIPS_BETWEEN_SPERM_MORPHOLOGY_SEMEN_CHARACTERISTICS_TESTICULAR_MEASUREMENTS_AND_BODY_CONFORMATION_TRAITS_IN_RED_SOKOTO_GOAT
- Lieberman, D., McClure, E., Harston, S., & Madan, D. (2016). Maintaining semen quality by improving cold chain equipment used in cattle artificial insemination. *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep28108>
- Liu, C. H., Dong, H. B., Ma, D. L., Li, Y. W., Han, D., Luo, M. J., ... Tan, J. H. (2016). Effects of pH during liquid storage of goat semen on sperm viability and fertilizing potential. *Animal Reproduction Science*, 164, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.011>
- Łukaszewicz, E., Jerysz, A., & Kowalczyk, A. (2020). Effect of semen extenders on viability of ISA Brown and Hubbard Flex roosters' sperm stored for 24 h. *Poultry Science*, 99(5), 2766–2774. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.12.055>
- Maldonado, J., Lorenzo, D., Domínguez, P., Pastor, F., Vélez, L., & Figueroa, U. (2018). Efecto de la edad del macho cabrío en parámetros de calidad durante el proceso de criopreservación seminal. *Acta Agrícola y Pecuaria*.
- Malebogo, A., Khoboso, C., & Tlou, Caswell Chokoe, Tshimangadzo, L. (2015).

Comparison of Electro Ejaculator and Artificial Vagina on Semen Collection from South African Indigenous Goat Following Assessment by Computer Aided Sperm Analysis. *Animal Sciences*. <https://doi.org/10.4236/ojas.2015.52023>

Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Tamayo-Canul, J., López-Urueña, E., de Paz, P., Anel, L., ... Álvarez, M. (2014). Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature, extender and storage time. *Animal Reproduction Science*, 151(3–4), 137–147.
<https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2014.10.006>

Maya-Soriano, M. J., Taberner, E., Sabés-Alsina, M., & López-Béjar, M. (2013). Retinol might stabilize sperm acrosomal membrane in situations of oxidative stress because of high temperatures. *Theriogenology*, 79(2), 367–373.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.10.009>

Maya-Soriano, M. J., Taberner, E., Sabés-Alsina, M., Piles, M., & Lopez-Bejar, M. (2015). Absence of beneficial effects on rabbit sperm cell cryopreservation by several antioxidant agents. *Zygote*, 23(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1017/S0967199413000270>

Mellado, M. (2008). Técnicas para el manejo reproductivo de las cabras en Agostadero. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 47–63. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93911227005>

Mellado, M. (2020). Goat Husbandry: Reproductive Management. In M. Mellado (Ed.), *Reference Module in Food Science*. Saltillo: Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00823-4>

Memon, A. A., Wahid, H., Rosnina, Y., Goh, Y. M., Ebrahimi, M., & Nadia, F. M. (2013). Effect of ascorbic acid concentrations, methods of cooling and freezing on boer goat semen cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(2), 325–330. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02155.x>

- Mia, M., Khandoker, M., Husain, S., Faruque, M., Apu, A., & Notter, D. (2013). Genetic and Phenotypic Parameters for Semen Characteristics and Their Relationship with Scrotal Circumference in Black Bengal Bucks. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 709–717.
- Michael, A. J., Alexopoulos, C., Pontiki, E. A., Hadjipavlou-Litina, D. J., Saratsis, P., Ververidis, H. N., & Boscos, C. M. (2018). Quality and reactive oxygen species of extended canine semen after vitamin C supplementation. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.043>
- Moradi, M., Karimi, I., Ahmadi, S., & Mohammed, L. J. (2020). The necessity of antioxidant inclusion in caprine and ovine semen extenders: A systematic review complemented with computational insight. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(9), 1027–1043. <https://doi.org/10.1111/rda.13754>
- Muhammad, Zubair Mohsin, A., Maqbool, A., Sajid, M., Sajid, G., Ahmad, I., & Shafia, T. (2015). Effect of Selenium and Vitamin E on cryopreservation of semen and reproductive performance of animals (a review). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, (2320-7078c).
- Murphy, C., Fahey, A., Shafat, A., & Fair, S. (2013). Reducing sperm concentration is critical to limiting the oxidative stress challenge in liquid bull semen. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4634–4637. <https://doi.org/10.3168/JDS.2012-6484>
- Nethenzheni, L., Mphaphathi, ML2 Madzhie, L., Negota, N., Kalonji, P., Nedambale, T., & Barry, D. (2021). Effect of Bioxcell® and Triladyl® Extenders and Removal of Seminal Plasma on Equilibrated and Cryopreserved Semen from South African Unimproved Indigenous Bucks. *Journal of Bacteriology and Mycology*, 8(1–7). <https://doi.org/10.26420/jbacteriolmycol.2021.1164>
- Niño, T. (2013). *Aportaciones tecnológicas en la preservación del semen en la raza caprina Majorera*. Las Palmas. Retrieved from

https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/10743/4/0686754_00000_0000.pdf

Rekha, A., Zohara, B. F., Bari, F. Y., & Alam, M. G. S. (2018). Comparisons of commercial Triladyl and locally manufactured extenders for the chilling of semen and their effects on pregnancy rates after transcervical AI in Bangladeshi Indigenous (*Ovis aries*) sheep. *Animal Reproduction (AR)*, 13(4), 735–742. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR733>

Rojas, A., & Meneses, R. (2004). *Características de la Raza Boer*. La Serena. Retrieved from <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR31619.pdf>

Sadeghi, S., Gallego, R. Del, García-Colomer, B., Gómez, E. A., Yániz, J. L., Gosálvez, J., ... Silvestre, M. A. (2020). Effect of Sperm Concentration and Storage Temperature on Goat Spermatozoa during Liquid Storage. *Biology* 2020, Vol. 9, Page 300, 9(9), 300. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY9090300>

Salviano, M. B., & Torres De Souza, J. A. (2015). Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. *Rev Bras Reprod Anim*, (3), 159–167. Retrieved from www.cbra.org.br

Simões, J., Abecia, J. A., Cannas, A., Delgado, J. A., Lacasta, D., Voigt, K., & Chemineau, P. (2021). Review: Managing sheep and goats for sustainable high yield production. *Animal*, 100293. <https://doi.org/10.1016/J.ANIMAL.2021.100293>

Soares, A. T., Silva, S. V., Batista, A. M., Almeida, F. C., Nunes, J. F., Peixoto, C. A., & Guerra, M. M. P. (2015). Ultrastructure evaluation of goat spermatozoa after freezing in a skim milk-based extender with Trolox supplementation. *Andrologia*, 47(4), 470–476. <https://doi.org/10.1111/and.12279>

Subhan, M., Khan, D., Mushtaq, A., & Sultan, S. (2013). Effect of extenders, postdilution intervals, and seasons on semen quality in dairy goats. *Turkish*

Journal of Veterinary and Animal Sciences, 37, 147–152.

<https://doi.org/10.3906/vet-1110-24>

Sun, L., Fan, W., Wu, C., Zhang, S., Dai, J., & Zhang, D. (2020). Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-based extender on goat semen cryopreservation. *Cryobiology*, 92(August), 146–150.

<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.12.004>

T, L., Y, H., T, Z., R, Z., H, C., S, C., & H, Z. (2019). Mechanisms of ROS-induced mitochondria-dependent apoptosis underlying liquid storage of goat spermatozoa. *Aging*, 11(18), 7880–7898.

<https://doi.org/10.18632/AGING.102295>

Tabarez, A. (2014). *OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN CAPRINO DE LA RAZA*. Barcelona.

Tabarez, A., García, W., & Palomo, M. J. (2017). Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donor age on buck sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 149, 91–98.

<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.01.007>

Tabatabaei, S., Batavani, R., & Ayen, E. (2011). Effects of Vitamin E Addition to Chicken Semen on Sperm Quality During in Vitro Storage of Semen. *Veterinary Research Forum*, 2(2), 103–111.

Tareq, K. M. A., Akter, Q. S., Takagi, Y., Hamano, K., Sawada, T., & Tsujii, H. (2010). Effect of selenium and vitamin E on acrosome reaction in porcine spermatozoa. *Reproductive Medicine and Biology*, 9(2), 73.

<https://doi.org/10.1007/S12522-009-0041-X>

Ureña, F. (2018). Inseminación Artificial. Retrieved August 4, 2021, from

<http://www.uco.es/zootecniaygestion/menu.php?tema=120>

- Vargas, J., Zaragoza, L., Delgado, J., & Rodríguez, G. (2016). Biodiversidad caprina iberoamericana. *Universidad Cooperativa de Colombia*.
<https://doi.org/10.16925/9789587600629>
- Vasconcelos Franco, J. S., Chaveiro, A., Góis, A., & Moreira da Silva, F. (2013a). Effects of α -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(10), 787–793.
<https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2012.12.012>
- Vasconcelos Franco, J. S., Chaveiro, A., Góis, A., & Moreira da Silva, F. (2013b). Effects of α -tocopherol and Ascorbic Acid on Equine Semen Quality after Cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(10), 787–793.
<https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2012.12.012>
- Vera, T., & Ricarte, A. (2015, July). GUIA PARA LA EVALUACION DEL SEMEN DE CAPRINOS. APORTE DE ALGUNAS METODOLOGIAS PARA LA EVALUACION DE LA CALIDAD SEMINAL DE REPRODUCTORES MACHOS CAPRINOS. Retrieved November 5, 2020, from
https://www.researchgate.net/publication/298070056_GUIA_PARA_LA_EVALUACION_DEL_SEMEN_DE_CAPRINOS_APORTE_DE_ALGUNAS_METODOLOGIAS_PARA_LA_EVALUACION_DE_LA_CALIDAD_SEMINAL_DE_REPRODUCTORES_MACHOS_CAPRINOS_Cartilla_de_divulgacion
- Vieira Neto, B., Francisco, M., Salles Rodrigues, C., Silva Leles, D., Salles, F., & de Araújo, A. (2017). Effect of Flunixin Meglumine administration on seminal characteristics of male sheep and goat. *Ciências Agrárias*, 38(5), 3145–3154.
<https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n5p3145>
- Vilakazi, D. M., & Webb, E. C. (2014). Effect of age and season on sperm morphology of Friesland bulls at an artificial insemination centre in South Africa. *South African Journal of Animal Science*.

Xu, C.-L., Zhou, J.-B., Zhao, B.-T., Lan, G.-C., Luo, M.-J., Chang, Z.-L., ... Tan, J.-H.

(2017). Liquid Storage of Goat Semen in Chemically Defined Extenders.

Reproduction in Domestic Animals, 44(5), 771–778.

<https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2008.01071.X>

Yodmingkwan, P., Guntaprom, S., Jaksamrit, J., & Lertchunhakiat, K. (2016). Effects

of Extenders on Fresh and Freezing Semen of Boer Goat. *Agriculture and*

Agricultural Science Procedia, 11, 125–130.

<https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.12.021>

Anexos