

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL,
BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



TESIS DOCTORAL

**PRODUCCIÓN Y CONGELACIÓN SEMINAL EN LA VARIEDAD
MAJORERA DE LA AGRUPACIÓN CAPRINA CANARIA**

FERNANDO CABRERA MARTÍN

Las Palmas de Gran Canaria, 1999

72/1998-99

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO**

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el/a aspirante expuso esta **TESIS DOCTORAL**.

Terminada la lectura y contestadas por el/a Doctorando/a las objeciones formuladas por los señores miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de **SOBRESALIENTE CON LAUDE**
POR UNANIMIDAD

Las Palmas de Gran Canaria, a 15 de julio de 1999.



El/a Presidente/a: **Dr. D. Emilio Espinosa Velázquez,**

El/a Secretario/a: **Dr. D. Antonio Ruiz Reyes,**



El/a Vocal: **Dr.D. José Folch Pera,**



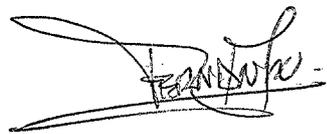
El/a Vocal: **Dr.D. Nelson González Romano,**



El/a Vocal: **Dr.D. Juan Capote Álvarez,**



El Doctorando: **D. Fernando Cabrera Martín,**



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DOCTORADO EN VETERINARIA

Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y
Tecnología de los Alimentos

Programa de Producción y Reproducción Ovina y Caprina

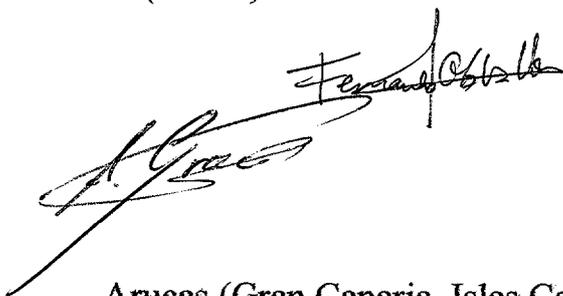
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
LAS PALMAS DE G. CANARIA
N.º Documento <u>189.448</u>
N.º Copia <u>568.305</u>

**PRODUCCIÓN Y CONGELACIÓN SEMINAL EN LA VARIEDAD
MAJORERA DE LA AGRUPACIÓN CAPRINA CANARIA**

Tesis Doctoral presentada por: **Fernando Cabrera Martín**

Dirigida por los doctores: **Anselmo Gracia Molina
Fernando González Valle**

Los directores
(firmas)



El doctorando
(firma)



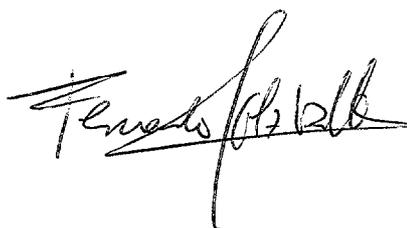
Arucas (Gran Canaria, Islas Canarias), a 25 de mayo de 1999

D. ANSELMO GRACIA MOLINA, Catedrático de Universidad del Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos y D. FERNANDO GONZÁLEZ VALLE, Profesor Titular Interino de Universidad del Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

INFORMAN

Que la Tesis Doctoral titulada “PRODUCCIÓN Y CONGELACIÓN SEMINAL EN LA VARIEDAD MAJORERA DE LA AGRUPACIÓN CAPRINA CANARIA”, de la que es autor el Licenciado en Veterinaria D. FERNANDO CABRERA MARTÍN, ha sido realizada en el Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, bajo nuestra dirección, reuniendo, a nuestro juicio, las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente en Arucas, 25 de mayo de 1999.



Algunos resultados del presente trabajo han sido publicados en los siguientes congresos y revistas:

Cabrera, F., González, F., Batista, M., Forga, J., González, C., Gracia, A., 1997. Estudio sobre la producción seminal del macho de la Agrupación Caprina Canaria (variedad Majorera) a lo largo del año. En: VII Jornadas sobre Producción Animal, Zaragoza. *I.T.E.A.* 18, II: 443-445.

Gracia-Molina, A., Cabrera-Martín, F., González-Valle, F., Batista-Arteaga, M., Forga-Martel, J., 1997. Estacionalidad en la producción seminal de la variedad Majorera de la Agrupación Caprina Canaria. *Av. Aliment. Mej. Anim.* 37, 4-5: 26. Abstract.

Cabrera-Martín, F., González-Valle, F., Batista-Arteaga, M., Forga-Martel, J., Rugeles-Pinto, C.C., Gracia-Molina, A., 1997. Efecto del lavado y el diluyente sobre la congelabilidad del semen de la Agrupación Caprina Canaria (variedad Majorera) y su conservación durante 6 meses. En: I Congreso Ibérico de Reproducción Animal, Estoril, Vol. II: 94-100.

Cabrera-Martín, F., González-Valle, F., Batista-Arteaga, M., Forga-Martel, J., Gracia-Molina, A., 1997. Producción y congelación seminal en la Agrupación Caprina Canaria (A.C.C.). En: VI Encuentro de Veterinarios de las Regiones Autónomas de Azores, Madeira y Canarias, Maspalomas, Gran Canaria, 42-45.

Cabrera-Martín, F., González-Valle, F., Batista-Arteaga, M., Forga-Martel, J., Calero-Carballo, P.O., Gracia-Molina, A., 1998. Estudio sobre la producción seminal del macho de la Agrupación Caprina Canaria (variedad Majorera) a lo largo del año. *Archivos de Reproducción Animal* 6: 6-11.

Cabrera, F., González, F., Batista, M., Forga, J., Calero, P., Gracia, A., 1998. Influencia de la edad y los factores ambientales sobre la producción seminal de la Agrupación Caprina Canaria (variedad Majorera) a lo largo del año. En: Producción Ovina y Caprina, XXIII Jornadas Científicas y II Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Vitoria-Gasteiz, 525-528.

Cabrera-Martín, F., González-Valle, F., Batista-Arteaga, M., Forga-Martel, J., Gracia-Molina, A., 1998. Influencia de la edad y los factores

ambientales sobre la producción seminal de la Agrupación Caprina Canaria (variedad Majorera) a lo largo del año. *Av. Aliment. Mej. Anim.* 38: 39. Abstract

Gracia, A., Cabrera, F., González, F., Batista, M., Forga, J., Calero, P., 1998. Efecto de la proporción de yema sobre la conservación de semen congelado en la Agrupación Caprina Canaria (variedad Majorera). En: Producción Ovina y Caprina. XXIII Jornadas Científicas y II Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Vitoria-Gasteiz, 517-520.

Gracia-Molina, A., Cabrera-Martín, F., González-Valle, F., Batista-Arteaga, M., Forga-Martel, J., 1998. Efecto de la proporción de yema sobre la conservación de semen congelado en la Agrupación Caprina Canaria (variedad Majorera). *Av. Aliment. Mej. Anim.* 38, 4-5: 41. Abstract.

* Parte de este trabajo ha sido financiado con el proyecto "Inseminación Artificial: congelación y aplicación seminal en ganado caprino" de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Años 1995-1997

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de Tesis, Dr. D. Anselmo Gracia Molina y Dr. D. Fernando González Valle por su especial implicación en el desarrollo de esta tesis, y por lo que me han enseñado durante todo este tiempo.

A mis compañeros en la unidad de Reproducción y Obstetricia, Miguel Batista Arteaga, por los útiles consejos prodigados, y Petra Calero Carballo por su colaboración en la fase final de la Tesis.

A los compañeros del área de Producción Animal, Juan Luis López Fernández, Rafael Ginés Ruiz, y Anastasio Argüello Henríquez, por su contribución al desarrollo técnico y material de este trabajo.

A Ventura, Juan Herrera, Pepa y Rosario, quienes en sus respectivos puestos de trabajo hicieron posible el desarrollo de la fase experimental de la Tesis.

Al Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y a todos sus componentes, por la gestión que ha hecho posible el desarrollo de esta Tesis.

Al Instituto Nacional de Meteorología, por permitir el acceso a datos climatológicos de gran importancia para poder llevar a cabo parte del estudio experimental.

A la Consejería de Educación, Cultura y Deportes del Gobierno de Canarias, por brindarnos a mí y a otros muchos como yo la oportunidad de iniciarnos en la labor investigadora financiando nuestra estancia a lo largo del transcurso de la Beca.

A mi novia, mis padres, abuelas, hermanos, tíos, primos, compañeros y amigos, a quienes espero compensar algún día por no haberles podido dedicar todo el tiempo que se merecen.



ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. PRODUCCIÓN SEMINAL DEL MACHO CABRÍO ...	7
2.1.1. MÉTODOS Y FRECUENCIA DE RECOGIDA ..	7
2.1.2. CARACTERÍSTICAS SEMINALES	8
2.1.3. FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES	9
2.1.3.1. Estación	11
2.1.3.2. Nutrición	13
2.1.3.3. Factores sociales	14
2.2. CONSERVACIÓN DEL SEMEN	14
2.2.1. SEMEN FRESCO	15
2.2.2. SEMEN REFRIGERADO	15
2.2.3. SEMEN CONGELADO	16
2.2.3.1. Método y frecuencia de recogida	16
2.2.3.2. Contrastación y selección de eyaculados	17
2.2.3.3. Dilución de eyaculados	17
2.2.3.3.1. Diluyentes empleados	17
2.2.3.3.2. La yema de huevo.....	20
2.2.3.3.3. Tasa de dilución	23
2.2.3.3.4. Proceso de dilución	24
2.2.3.4. Descenso de temperatura	25
2.2.3.5. Periodo de equilibración	25
2.2.3.6. Congelación propiamente dicha	25
2.2.3.7. Conservación en nitrógeno líquido	26
2.2.3.8. Descongelación	26

2. 2. 3. 9.	Contrastación y selección del semen congelado-descongelado	27
2. 3.	INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	29
2. 3. 1.	MÉTODOS DE SINCRONIZACIÓN-INDUCCIÓN DEL CELO	29
2. 3. 2.	INSEMINACIÓN ARTIFICIAL PROPIAMENTE DICHA	30
2. 3. 3.	FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA FERTILIDAD DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	31
2. 3. 3. 1.	Método de sincronización-inducción del celo	31
2. 3. 3. 2.	Momento de inseminación	32
2. 3. 3. 3.	Número de inseminaciones y dosis	33
2. 3. 3. 4.	Profundidad de deposición	33
2. 3. 3. 5.	Otros factores	34
2. 3. 4.	FERTILIDAD TRAS LA MONTA NATURAL Y LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	34
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	37
3. 1.	ANIMALES	38
3. 1. 1.	CONDICIONES DE MANEJO, ESTADO SANITARIO, ALOJAMIENTO Y ALIMENTACIÓN	38
3. 2.	SITUACIÓN GEOGRÁFICA Y CONDICIONES CLIMÁTICAS	38
3. 3.	MÉTODO Y FRECUENCIA DE RECOGIDA	38
3. 4.	CONTRASTACIÓN SEMINAL	42
3. 5.	CONGELACIÓN DEL SEMEN	43
3. 5. 1.	DILUYENTES	43
3. 5. 2.	“LAVADO” DE LOS ESPERMATOZOIDES	43
3. 5. 3.	DILUCIÓN	43

3. 5. 4.	ENVASADO	47
3. 5. 5.	DESCENSO DE TEMPERATURA	47
3. 5. 6.	EQUILIBRACIÓN	47
3. 5. 7.	CONGELACIÓN PROPIAMENTE DICHA	49
3. 6.	CONTRASTACIÓN DEL SEMEN DESCONGELADO	49
3. 6. 1.	DESCONGELACIÓN	49
	MOTILIDAD INDIVIDUAL PROGRESIVA	
3. 6. 2.	TRAS LA DESCONGELACIÓN (MIPD)	49
	PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES	
3. 6. 3.	VIVOS (PEV)	49
	PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES CON	
3. 6. 4.	ACROSOMA NORMAL (PEAN)	51
3. 7.	DISEÑO DE LA EXPERIENCIA	52
3. 8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
3. 8. 1.	SEMEN FRESCO	52
3. 8. 2.	SEMEN DESCONGELADO	54
4.	RESULTADOS	57
4. 1.	RESULTADOS OBTENIDOS EN EL SEMEN FRESCO	58
4. 1. 1.	CARACTERÍSTICAS SEMINALES	58
4. 1. 2.	ANÁLISIS DE VARIANZA	58
4. 1. 3.	EVOLUCIÓN A LO LARGO DEL AÑO	58
4. 1. 4.	CORRELACIONES CON LOS FACTORES CLIMÁTICOS	66
4. 1. 4. 1.	Correlaciones con las condiciones climáticas del día de la recogida	66
4. 1. 4. 2.	Correlación con las condiciones climáticas medias de varios días previos a la recogida	66
4. 1. 5.	CORRELACIONES CON LA EDAD DE LOS MACHOS	67

4. 2. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL SEMEN CONGELADO-DESCONGELADO	80
4. 2. 1. ANÁLISIS DE VARIANZA	80
4. 2. 2. DIFERENCIAS ENTRE MÉTODOS DE CONGELACIÓN (Mt)	81
4. 2. 2. 1. Efecto del "lavado"	81
4. 2. 2. 2. Efecto de la proporción de yema de huevo en el diluyente	81
4. 2. 2. 3. Efecto del diluyente	81
4. 2. 3. EFECTO DE LA ESTACIÓN O ÉPOCA DE RECOGIDA (E)	82
4. 2. 4. EFECTO DEL TIEMPO DE CONSERVACIÓN (tC)	83
5. DISCUSIÓN	93
5. 1. SEMEN FRESCO	94
5. 1. 1. CARACTERÍSTICAS SEMINALES	94
5. 1. 2. VARIACIÓN INDIVIDUAL	94
5. 1. 3. EVOLUCIÓN A LO LARGO DEL AÑO	95
5. 1. 4. RELACIÓN CON LOS FACTORES CLIMÁTICOS	97
5. 1. 5. RELACIÓN CON LA EDAD	99
5. 2. SEMEN CONGELADO-DESCONGELADO	99
5. 2. 1. VARIACIÓN INDIVIDUAL	99
5. 2. 2. DIFERENCIAS ENTRE LOS DISTINTOS MÉTODOS DE CONGELACIÓN	100
5. 2. 2. 1. Efecto del "lavado"	100
5. 2. 2. 2. Efecto de la proporción de yema	103
5. 2. 2. 3. Efecto del diluyente	104
5. 2. 3. EFECTO DE LA ESTACIÓN O LA ÉPOCA DE RECOGIDA (E)	104
5. 2. 4. EFECTO DEL TIEMPO DE CONSERVACIÓN	105

6. CONCLUSIONES	107
7. RESUMEN	109
8. BIBLIOGRAFÍA	111
9. ABREVIATURAS EMPLEADAS	129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	10	Tabla 15	65
Tabla 2	36	Tabla 16	68
Tabla 3	39	Tabla 17	71
Tabla 4	43	Tabla 18	74
Tabla 5	45	Tabla 19	77
Tabla 6	46	Tabla 20	84
Tabla 7	46	Tabla 21	85
Tabla 8	51	Tabla 22	86
Tabla 9	52	Tabla 23	87
Tabla 10	53	Tabla 24	88
Tabla 11	55	Tabla 25	89
Tabla 12	56	Tabla 26	90
Tabla 13	59	Tabla 27	91
Tabla 14	62	Tabla 28	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	4	Figura 24	70
Figura 2	4	Figura 25	72
Figura 3	5	Figura 26	72
Figura 4	40	Figura 27	72
Figura 5	41	Figura 28	72
Figura 6	48	Figura 29	72
Figura 7	50	Figura 30	72
Figura 8	60	Figura 31	73
Figura 9	60	Figura 32	75
Figura 10	60	Figura 33	75
Figura 11	61	Figura 34	75
Figura 12	61	Figura 35	75
Figura 13	63	Figura 36	75
Figura 14	63	Figura 37	75
Figura 15	63	Figura 38	76
Figura 16	64	Figura 39	78
Figura 17	64	Figura 40	78
Figura 18	69	Figura 41	78
Figura 19	69	Figura 42	78
Figura 20	69	Figura 43	78
Figura 21	69	Figura 44	78
Figura 22	69	Figura 45	79
Figura 23	69		

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN

Del estudio de los restos arqueológicos de las Islas, se desprende que en torno a los 2000-2500 años a.C. comenzaron a llegar las primeras tribus procedentes del noroeste africano, constituyendo el primer asentamiento humano del Archipiélago. Casi la misma antigüedad se atribuye a los restos arqueológicos de la paleocabra Canaria encontrados en Villaverde (Fuerteventura), de origen también norteafricano, y de la que quedan algunos ejemplares en Las Desiertas, algunos kilómetros al norte del Archipiélago Canario, habiéndose extinguido hace poco en La Palma (Meco, 1992, 1994). La Conquista de Canarias y el descubrimiento de América a finales del siglo XV, representó para la cabra Canaria un constante aporte genético, al convertirse Canarias en paso obligado para las rutas transoceánicas. De ahí la notable influencia en algunos aspectos externos de razas portuguesas como la Charnaqueira o la Serpentina, españolas del Tronco Pirenaico y Granadina, del resto de Europa como la Saanen, o africanas como la Nubiana, que sin duda contribuyeron a configurar la actual Agrupación Caprina Canaria (Capote et al., 1992).

En la Agrupación Caprina Canaria (A.C.C.) se distinguen tres tipos étnicos: el Majorero, el Tinerfeño y el Palmero (Capote, 1985), con una producción media de 547, 429 y 363 litros de leche por lactación respectivamente (Capote et al., 1992), formando parte del grupo de los considerados más aptos para la producción lechera en el ámbito internacional (Jordana et al., 1991; Fresno et al., 1992; Capote et al., 1996). El tipo Majorero es el más extendido, ocupando en su origen prácticamente la mitad de la superficie del Archipiélago Canario, correspondiente a las tres islas más orientales: Lanzarote, Fuerteventura y Gran Canaria. Adaptada a un medio inhóspito con escasos recursos alimenticios y a su vez siendo seleccionada empíricamente para la producción láctea durante siglos, la cabra Majorera se ha perfilado como un animal de extraordinaria rusticidad y una gran capacidad lechera, que sin duda la convierten en objetivo de numerosos proyectos científicos y productivos. El tipo Tinerfeño y el Palmero se distribuyen por las islas más occidentales (Tenerife, La Palma, La Gomera y El Hierro), adaptadas en el caso del subtipo Tinerfeño del Norte a regiones húmedas con pastos más abundantes, y el Palmero a zonas abruptas de difícil acceso. Estos dos tipos, compensan su menor producción con un mayor rendimiento quesero y una excelente adaptación a sus hábitats, aprovechando de forma inmejorable los recursos de su entorno.

El número de efectivos de la A.C.C. ronda los 275.000 animales según el último censo efectuado en 1996 (Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca del Gobierno de Canarias), la mayor parte concentrada en las islas de Gran Canaria, Fuerteventura y Tenerife (Figura 1), en parte debido a su mayor extensión; la Figura 2 viene a corroborar este hecho, asemejándose la densidad de población entre unas y otras islas. Sin embargo, la contribución del sector al ámbito laboral no es muy manifiesta en islas como Gran Canaria, Tenerife o Lanzarote, donde la importancia del sector servicios es manifiesta, debido al gran desarrollo del turismo (Figura 3).

Ante la inminente implantación de futuros planes de mejora genética y la creciente demanda de nuestra agrupación racial desde muy diversas regiones, resulta imprescindible el conocimiento exhaustivo de la producción y calidad seminal del macho de la Agrupación Caprina Canaria, así como su posibilidad de conservación. Por estas razones, los objetivos fijados en el presente trabajo son:

1. Determinar la producción y calidad seminal del macho de la variedad Majorera de la A.C.C. a lo largo del año y su relación con factores climáticos.
2. Valorar la eficacia de distintas técnicas de congelación en función de:
 - a. El "lavado" de los espermatozoides antes de la dilución
 - b. El tipo de diluyente
 - c. La proporción de yema de huevo en el diluyente
 - d. La época del año
 - e. El tiempo de conservación

Figura 1. Distribución del censo caprino en las Islas Canarias: Fuerteventura (F), Lanzarote (LZ), Gran Canaria (GC), Tenerife (TF), La Palma (P), La Gomera (G) y El Hierro (H).

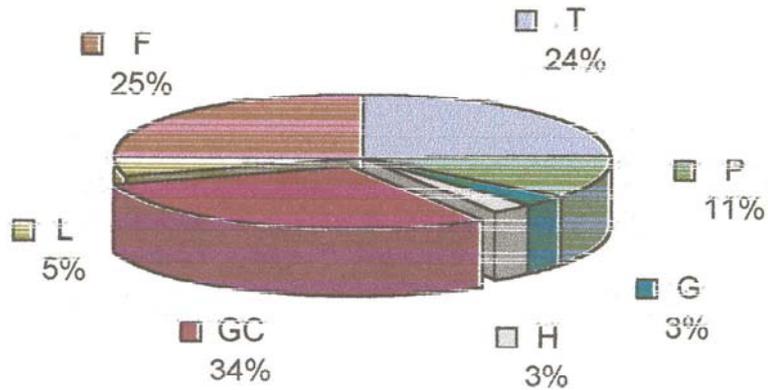


Figura 2. Densidad en cabezas de ganado caprino por km² en las Islas Canarias: Fuerteventura (F), Lanzarote (LZ), Gran Canaria (GC), Tenerife (TF), La Palma (P), La Gomera (G) y El Hierro (H).

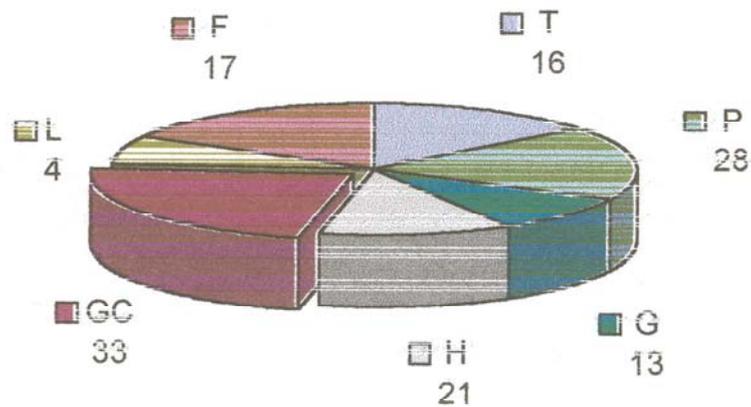
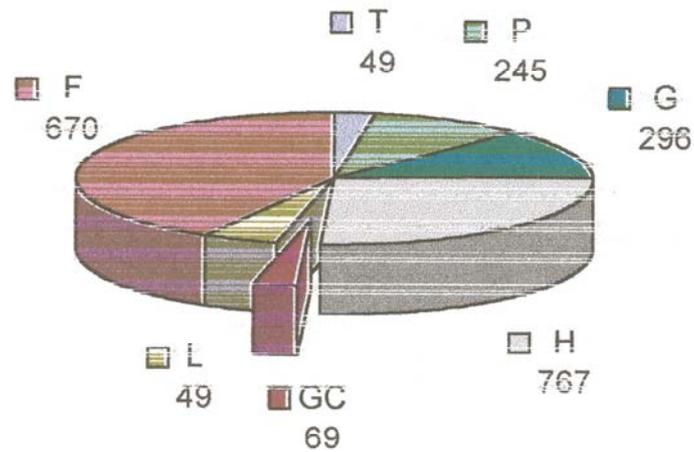


Figura 3. Número de cabezas de ganado por cada 1.000 habitantes en las Islas Canarias: Fuerteventura (F), Lanzarote (LZ), Gran Canaria (GC), Tenerife (TF), La Palma (P), La Gomera (G) y El Hierro (H).



2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. 1. PRODUCCIÓN SEMINAL DEL MACHO CABRÍO

2. 1. 1. MÉTODOS Y FRECUENCIA DE RECOGIDA

La recogida seminal en macho cabrío suele realizarse mediante vagina artificial a 40-44°C (Ritar y Salamon, 1982, 1991; Greyling y Grobbelaar, 1983; Loubser y van Niekerk, 1983; Memon et al., 1985; Mukherjee y Nelson, 1987; Skalet et al., 1988; Chauhan y Anand, 1990; Dunner y Vázquez, 1991; Pintado et al., 1991b, 1992; Tuli et al., 1991; Ritar et al., 1992; Roca et al., 1992a, 1992b; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995; Dunner, 1993; Ritar y Ball, 1993; Singh et al., 1995, 1996; Sinha et al., 1995, 1996; Pérez y Mateos, 1996, 1997; Karatzas et al., 1997), o electroeyaculación (Greyling y Grobbelaar, 1983; Loubser et al., 1983a; Skalet et al., 1988; Azawi et al., 1993). Este último método, sin embargo, proporciona eyaculados de peor calidad, con mayor volumen, pero menor concentración, menor motilidad y/o menor porcentaje de espermatozoides vivos (Greyling y Grobbelaar, 1983; Peskovatskov, 1985). Para la monta suele recurrirse a la inmovilización de una hembra ovariectomizada (Roca et al., 1992a, 1992b; Ahmad y Noakes, 1996; Karatzas et al., 1997; Pérez y Mateos, 1996, 1997), ya que la ausencia de ovarios en la hembra proporciona un estado reproductivo constante de ésta a lo largo de las sucesivas recogidas. Muchos autores practican una estrogenización periódica de la hembra mientras se prolonguen los períodos de recogida seminal (Chemineau, 1986b; Mukherjee y Nelson, 1987; Delgadillo et al., 1991; Ritar et al., 1992; Tuli y Holtz, 1994; Pérez y Mateos, 1996, 1997). Sin embargo, la estrogenización puede restringirse únicamente a las primeras recogidas (Peskovatskov, 1985), cuando los machos no han adquirido la suficiente confianza como para permitir la cercanía del operario durante la monta.

El macho cabrío es capaz de soportar severos ritmos de recogida como demuestran los estudios de Okere et al. (1986), Joseph y Nai (1989) o Ritar et al. (1992). Los primeros no encontraron diferencia significativa alguna entre las características del semen recogido 3 veces al día durante 21 días y el obtenido dos veces por semana durante 5 meses, mientras que los otros dos grupos de investigadores sí apreciaron descensos en la concentración a medida que el número de recogidas se incrementaba de 1 a 3 por día durante 3 meses (Joseph y Nai, 1989), o al final de un período de 5 días durante el cual se sometía a los machos a un ritmo de 5 recogidas por día (Ritar et al., 1992). Sin embargo, hay discrepancia en cuanto a si este efecto se acompaña también de un descenso en el volumen eyaculado y la motilidad (Joseph y Nai, 1989; Ritar et al., 1992).

En las experiencias de producción seminal en las que se pretende que el ritmo de recogida no ejerza influencia sobre las características seminales del macho cabrío para apreciar mejor la influencia de otros efectos, están indicadas frecuencias de 2 o 3 recogidas por semana porque proporcionan una producción seminal continua a lo largo de amplios periodos de tiempo. Por eso, para detectar posibles variaciones estacionales a lo largo del año se adoptan habitualmente estas frecuencias de recogida (Cortee, 1976, 1981; Mittal, 1982, 1986; Borgohain et al., 1983; Chauhan y Anand, 1990; Delgadillo et al., 1991, 1992a, 1993; Roca et al., 1992a, 1992b), aunque en ocasiones se han empleado frecuencias aún menores (Greyling y Grobbelaar, 1983; Loubser y Van Niekerk, 1983; Skalet et al., 1988; Tuli y Holtz, 1995; Pérez y Mateos, 1996, 1997).

2. 1. 2. CARACTERÍSTICAS SEMINALES

El semen de macho cabrío se caracteriza a grandes rasgos por un volumen eyaculado de aproximadamente 1 ml, una concentración de $3,0 \cdot 10^9$ spz / ml y una motilidad del 75%. No obstante, estos valores varían según las distintas razas y entre los diferentes autores, como se puede observar en la Tabla 1. Estas variaciones se pueden atribuir en parte a las diferencias de edad, método y ritmo de recogida, estación, etc..

El volumen eyaculado que podemos encontrar en las distintas razas varía desde los 0,35-0,5 ml en la Jamnapari (Sinha et al., 1981), la Malabari (Patil y Raja, 1978) o la Moxoto (Feliciano-Silva et al., 1992), hasta los 1,54 ml de la Saanen (Lima et al., 1994). El volumen eyaculado se determina habitualmente por lectura directa sobre el tubo graduado utilizado en la recogida (Greyling y Grobbelaar, 1983; Daudu, 1984; Okere et al., 1986; Ibrahim y Yousri, 1992; Karatzas et al., 1997).

En la concentración espermática se han encontrado oscilaciones desde los $0,6 \cdot 10^9$ spz/ml de la Red Sokoto (Daudu, 1984), hasta los $4,5 \cdot 10^9$ spz/ml de la Saanen o los $5,9 \cdot 10^9$ spz/ml de la Anglonubiana (Lima et al., 1994). La concentración espermática se determina ordinariamente diluyendo el semen 1:200-1:400 en solución con un 0,5% de eosina o solución salina formolada, para a continuación realizar el recuento mediante un hemocitómetro (Greyling y Grobbelaar, 1983; Loubser y Van Niekerk, 1983; Daudu, 1984; Okere et al., 1986; Chauhan y Anand, 1990; Tuli et al., 1991; Ritar et al., 1992; Roca et al., 1992a; Tuli y Holtz, 1992, 1994). Otra alternativa consiste en determinar la concentración espermática en función de la opacidad mostrada por una muestra de semen diluido 1:400 en solución salina

formolada o solución isotónica de citrato, mediante un espectrofotómetro previamente calibrado (Memon et al., 1986; Delgadillo et al., 1991; Azawi et al., 1993; Pérez y Mateos, 1996, 1997; Karatzas et al., 1997).

Los valores de **motilidad progresiva** que podemos encontrar en las distintas razas varían desde un 53% en la Moxoto (Feliciano-Silva et al., 1992) a un 87% en la Murciano-Granadina (Roca et al., 1992a). La motilidad progresiva puede valorarse como el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo (Corteel y Baril, 1975; Ritar y Salamon, 1982, 1991; Memon et al., 1985; Dunner y Vázquez, 1991; Tuli et al., 1991; Roca et al., 1992a; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995; Dunner, 1993; Pérez y Mateos, 1996, 1997; Sinha et al., 1995, 1996; Karatzas et al., 1997). Otros autores prefieren valorar el movimiento según una escala de 0 a 5 (Greyling y Grobbelaar, 1983; Chauhan y Anand, 1990; Delgadillo et al., 1992a; Ritar et al., 1992; Tuli y Holtz, 1992, 1994; Karatzas et al., 1997). El procedimiento empleado, implica la dilución de una muestra de semen en citrato sódico 0.1M, Tris-yema o solución salina, hasta una concentración aproximada de $100 \cdot 10^6$ spz/ml. A continuación, sobre porta y cubre a 34-38°C se observa a 100-400 aumentos mediante un microscopio óptico o de contraste de fases, sin conocer el evaluador la procedencia de la muestra (Corteel y Baril, 1975; Ritar y Salamon, 1982, 1991; Loubser y Van Niekerk, 1983; Daudu, 1984; Memon et al., 1985; Deka y Rao, 1986b; Chauhan y Anand, 1990; Tuli et al., 1991; Roca et al., 1992a; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995; Dunner, 1993; Ritar y Ball, 1993; Karatzas et al., 1997). Algunos autores incluso utilizan un hemocitómetro para tratar de ser más objetivos en la apreciación (Sinha et al., 1995, 1996).

El **número de espermatozoides por eyaculado** varía desde los $0,5 \cdot 10^9$ spz/ml en la Red Sokoto (Daudu, 1984), hasta los $6,5 \cdot 10^9$ spz/ml de la Anglonubiana o los $6,9 \cdot 10^9$ spz/ml de la Saanen (Lima et al., 1994).

2.1.3. FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES

Las características seminales del macho cabrío varían mucho de una raza a otra (Corteel, 1981; Greyling y Grobbelaar, 1983; Daudu, 1984), e incluso entre machos de la misma raza, hasta el punto de que la variabilidad individual es una de las constantes más habituales en la mayoría de las experiencias de producción seminal (Mohan et al., 1980; Saxena y Tripathi, 1980; Chemineau, 1986b; Roca et al., 1992a; Pérez y Mateos, 1996, 1997). Los factores que pueden contribuir a esta variación individual son entre otros la edad, el



Tabla 1. Características seminales de algunas razas caprinas

Raza	VE (ml)	Cc ($\cdot 10^9$ /ml)	MIF (%)	NEE ($\cdot 10^9$)	NEME ($\cdot 10^9$)	Referencia bibliográfica
Saanen	1,54	4,470	75,5%	6,884	5,197	Lima et al., 1994
Boer	1,42	3,040	64,0%	4,317	2,763	Tuli et al., 1991
Anglonubiana	1,09	5,920	85,7%	6,453	5,527	Lima et al., 1994
Angora	1,06	1,865	65,0%	1,977	1,285	Loubser y Van Niekerk, 1983
Murciano-Granadina	1,05	3,490	86,8%	3,665	3,181	Roca et al., 1992 ^a
Zaraibi	1,04	3,820	72,4%	3,973	2,876	Ibrahim y Yousri, 1992
Parbatsar	0,85	2,287	78,0%	1,944	1,517	Mittal y Ghosh, 1985
West African Dwarf	0,77	3,220	77,3%	2,479	1,916	Mann, 1981
Red Sokoto	0,72	0,610	77,5%	0,439	0,34	Daudu, 1984
Don	0,70	2,700	77,5%	1,890	1,465	Peskovatskov, 1985
Moxoto	0,60		54,9%	1,900	1,048	Feliciano-Silva et al., 1992
Barbari	0,69	2,472	78,0%	1,678	1,309	Mittal, 1982
Malabari	0,50	3,534	66,1%	1,767	1,169	Patil y Raja, 1978
Jamnapari	0,35	3,600		1,260		Sinha et al., 1981

VE volumen eyaculado, Cc concentración espermática, MIF motilidad individual progresiva en semen fresco, NEE número de espermatozoides por eyaculado, NEME número de espermatozoides móviles por eyaculado

peso o incluso la morfología escrotal (Corteel, 1981; Sinha et al., 1981; Feliciano-Silva et al., 1992; Summermatter y Fuschini, 1995). Así, por ejemplo, la producción seminal está muy correlacionada con el tamaño o el peso del testículo (Daudu, 1984; Ali y Mustafa, 1986; Ritar et al., 1992), a su vez, éstos se correlacionan con el peso vivo del animal (Chemineau, 1986b), y este último, lógicamente, relacionado con la edad del macho.

Existen otros factores con probada influencia sobre las características seminales del macho cabrío, así como sobre el tamaño testicular, la libido o producción de testosterona. Éstos son la estación de recogida (Corteel, 1976, 1978, 1980, 1981; Patil y Raja, 1978; Sinha et al., 1981; Loubser y Van Niekerk, 1983; Reddy et al., 1989; Zygogiannis et al., 1989; Ritar, 1991; Roca et al., 1992a, 1992b; Tuli y Holtz, 1995; Summermatter y Fuschini, 1995; Ahmad y Noakes, 1996; Pérez y Mateos, 1996, 1997; Karatzas et al., 1997), la nutrición (Corteel, 1981; Walkden-Brown et al., 1994a, 1994b; Martín y Walkden-Brown, 1995), y los factores sociales (Howland et al., 1985; Walkden-Brown et al., 1993, 1994b). Estos tres factores, por su gran importancia, se tratarán a continuación de forma más extensa:

2.1.3.1. Estación

La cabra ha sido considerada tradicionalmente como una especie poliéstrica estacional, en parte debido a que la mayoría de la literatura científica especializada que empezó a publicarse acerca de la actividad reproductiva de la cabra tenía su origen en países de clima templado, donde en efecto las razas allí explotadas muestran esta característica reproductiva (Martín et al., 1994). Muchas razas de clima tropical o subtropical, sin embargo, no siguen este mismo patrón, por lo que las primeras experiencias encaminadas a descubrir los mecanismos del comportamiento reproductivo estacional condujeron a probar que la variación fotoperiódica a lo largo del año era el componente principal de la estacionalidad reproductiva (Chemineau et al., 1986; Ritar, 1991; Pérez y Mateos, 1996, 1997).

En zonas de clima templado (latitud $>40^\circ$) la estación de cría suele prolongarse desde finales del verano hasta finales de invierno, mientras que desde la primavera a mediados del verano sobreviene el anestro estacional (Phillips et al., 1943; Eaton y Simmons, 1952; Corteel, 1975; Shelton, 1978; Mohammad et al., 1984). Entre esos dos períodos bien diferenciados, los animales experimentan un estado de transición, que en la hembra se caracteriza por una alta incidencia de ovulaciones silenciosas, sobre todo al inicio de la

estación de cría (Corteel, 1975; Camp et al., 1983). En el macho, el comienzo de la estación de cría se caracteriza por el desarrollo de un comportamiento especializado, la emisión de un fuerte olor con origen en la secreción de las glándulas sebáceas de la cabeza y región del cuello, y un aumento en el tamaño testicular y volumen seminal (Eaton y Simmons, 1952; Shakelton y Shank, 1984; Ozsar et al., 1990; Delgadillo et al., 1991, 1992a).

Las razas nativas de áreas tropicales (latitud $<25^{\circ}$) son capaces de reproducirse a lo largo de todo el año (Mann, 1981; Chemineau y Xandé, 1982; Chemineau, 1986a, 1986b; Llewelyn et al., 1993; Pérez y Mateos, 1996, 1997), aunque variaciones en la pluviometría, la disponibilidad de alimento y los factores sociales pueden llevar a una distribución no homogénea de la actividad reproductiva. En estas razas, por tanto, habría que hablar más de una estacionalidad en la disponibilidad de recursos y condiciones de manejo, que de una estacionalidad reproductiva propiamente dicha como la entendemos en razas de clima templado, donde la dependencia del fotoperíodo es clara, y difícil de superar con estrategias de manejo.

En los machos, el efecto de la estación unas veces repercute en una menor libido e incluso renuncia a la monta fuera de la estación de cría sobre todo en razas de clima templado (Loubser et al., 1983b; Loubser y Van Niekerk, 1983; Delgadillo et al., 1991; Ritai y Salamon, 1991), mientras que otras se traduce en una mera disminución de la producción y/o calidad seminal (Delgadillo et al., 1992a; Ahmad y Noakes, 1996; Karatzas et al., 1997; Pérez y Mateos, 1996, 1997). De hecho, en razas con origen en latitudes bajas, el efecto de la estación muchas veces es lo suficientemente leve como para permitir a los machos producir cantidades aceptables de semen a lo largo de todo el año (Mann, 1981; Sinha et al., 1981; Mittal, 1987b; Roca et al., 1992a, 1992b; Pérez y Mateos, 1996, 1997). La mayoría de los autores coinciden en señalar la época de mayor producción y/o calidad seminal en torno al otoño (Loubser y Van Niekerk, 1983; Corteel, 1981; Delgadillo et al., 1992a; Walkden-Brown et al., 1994c; Summermatter y Fuschini, 1995; Ahmad y Noakes, 1996; Pérez y Mateos, 1996, 1997), aunque en otros casos, sin embargo, no ha podido constatarse la existencia de variaciones considerables en determinados parámetros seminales entre diferentes estaciones (Sahni y Roy, 1972a; Patil y Raja, 1978; Greyling y Grobbelaar, 1983; Mittal, 1985, 1986, 1987b; Mittal y Ghosh, 1985; Chemineau, 1986b; Pérez y Mateos, 1996, 1997). Las implicaciones que el efecto de la estación tiene sobre las características del eyaculado se traducen sobre todo a nivel de una mayor producción y/o calidad seminal y una menor concentración espermática durante la época reproductiva (Corteel, 1981; Loubser y Van

Niekerk, 1983; Roca, 1989; Delgadillo et al., 1992a; Roca et al., 1992a; Summermatter y Fuschini, 1995; Ahmad y Noakes, 1996; Pérez y Mateos, 1996, 1997; Karatzas et al., 1997).

Está comprobado que el factor que regula principalmente la actividad reproductiva en las razas de clima templado es el **fotoperíodo** (Ritar, 1991; Pérez y Mateos, 1996, 1997), ya que modificando éste convenientemente o administrando melatonina se ha conseguido adelantar y/o prolongar dicha actividad, tanto en el macho (Chemineau, 1991, 1993; Delgadillo et al., 1991, 1992a, 1993; Malpoux et al., 1995) como en la hembra (Bon Durant et al., 1981; Chemineau et al., 1988, 1992; Maeda et al., 1988; Malpoux et al., 1995). Sin embargo, cuando estas razas son sometidas a regímenes *fotoperiódicos de tipo tropical* continúan mostrando variaciones estacionales en su actividad reproductiva (González-Stagnaro et al., 1974; Chemineau et al., 1992), o cuando llevan expuestas a más de 150 días largos retornan a la actividad (Maeda et al., 1986); por lo que otros factores distintos al fotoperíodo podrían estar implicados en la perdurabilidad del patrón estacional en estas razas, una vez se ha suprimido el estímulo de la *variación fotoperiódica* (Chemineau et al., 1992).

La **temperatura** se ha considerado también como un factor de importante influencia sobre las manifestaciones reproductivas del macho cabrío, tanto en climas tropicales, como en zonas templadas o en la región Mediterránea (Corteel, 1981; Casu et al., 1991; Chemineau, 1993). La elevada temperatura ambiental se ha citado como causa de desórdenes sobre los primeros estadios de la espermatogénesis, por tanto con efectos retardados sobre la calidad seminal y la fertilidad (Yokoki y Ogasa, 1977; Corteel, 1981; Kishore y Rao, 1983; Casu et al., 1991; Patil y Kaikini, 1992).

No se ha encontrado referencia alguna en cuanto a la influencia de **otros factores climáticos como por ejemplo la humedad relativa** sobre la calidad seminal del macho cabrío, reduciéndose lo encontrado a tan sólo el carnero y de forma esporádica (Bruckner y Bauer, 1972; El-Wishy et al., 1976).

2. 1. 3. 2. Nutrición

En el macho se ha comprobado que la subalimentación puede reducir la libido, el volumen seminal, el número de espermatozoides por eyaculado, el porcentaje de espermatozoides vivos, la motilidad espermática y la concentración de fructosa seminal, así como incrementar

el porcentaje de espermatozoides anormales. La sobrealimentación provocaría un aumento en el tamaño testicular y presumiblemente, por tanto, de la producción espermática (Walkden-Brown et al., 1995). Este efecto de la nutrición parece actuar de forma directa sobre el testículo, estimulando el crecimiento y la actividad de los túbulos seminíferos sin involucrar necesariamente al eje hipotálamo-hipofisario (Walkden-Brown et al., 1994a). No ocurre así, sin embargo, con el área intersticial, cuya respuesta al efecto de la nutrición se ve supeditada a la acción del fotoperíodo sobre el eje hipotálamo-hipofisario, restringiéndose dicha respuesta a épocas en que la inhibición fotoperiódica es leve en el caso de razas de clima templado (Walkden-Brown, 1994a, 1995; Martín et al., 1995). Todos estos estudios han demostrado que una alimentación de buena calidad antes de la llegada de la estación de cría, se traduce en un adelanto de ésta, y un aumento de la producción seminal.

2. 1. 3. 3. Factores sociales

Como el efecto macho sobre las hembras, el efecto hembra sobre los machos es capaz de provocar una repuesta a nivel fisiológico que se traduce en un aumento de las concentraciones séricas de LH, FSH, testosterona y/o cortisol, mejorando su libido y disposición para la monta, con mayor o menor intensidad dependiendo de la estación y del nivel nutricional del macho (Howland et al., 1985; Pérez-Llano y Mateos-Rex, 1994; Walkden-Brown et al., 1994a, 1994b). La respuesta al efecto hembra y la capacidad del macho para provocar el efecto macho sobre las hembras se intensifica ante un buen estado nutricional del macho, y todo ello depende del grado de inhibición fotoperiódica al que se encuentre sometido el animal, poniendo de manifiesto una compleja interacción entre estación, estado nutricional y factores sociales.

2. 2. CONSERVACIÓN DEL SEMEN

El rendimiento reproductivo de un macho se puede mejorar a costa de obtener varias dosis seminales a partir de un eyaculado, y poder conservarlas durante un período suficientemente largo como para permitir su distribución a lo largo del espacio y/o el tiempo. La inseminación con semen fresco permite conseguir el primero de los objetivos con buenos resultados y pocas necesidades de infraestructura, mientras que para refrigerar o congelar semen ya es necesario realizar una valoración más

exhaustiva de los eyaculados y disponer de una infraestructura más compleja, obteniendo muchas veces resultados no alentadores.

2. 2. 1. SEMEN FRESCO

El aprovechamiento de los eyaculados pasa por la utilización de diluyentes, donde los espermatozoides se encuentren más protegidos de las inclemencias externas y puedan disponer de nutrientes con los que cubrir sus necesidades. La temperatura de conservación ideal en este caso ronda los 22-30°C (Sahni y Roy, 1972b), y los diluyentes más utilizados son la leche de vaca o de cabra (Sahni y Roy, 1972c; Prasad, 1981; Karatzas et al., 1997), el Cornell University Extender o C.U.E. (Sahni y Roy, 1972c), la solución salina (Sahni y Roy, 1972c), y los que contienen como componente principal la yema de huevo, como el yema-citrato, yema-glicina o yema-citrato-glicina (Sahni y Roy, 1972c).

2. 2. 2. SEMEN REFRIGERADO

La refrigeración del semen conlleva la necesidad de incorporar al medio de dilución algún componente que proteja a los espermatozoides del choque por frío, como la yema de huevo o la lactosa, aunque dicha necesidad depende de la temperatura de refrigeración; así, Matthew et al. (1984) probaron diferentes concentraciones de yema de huevo en un diluyente a base de Tris, llegando a la conclusión de que si se conservaba a 3-5°C la motilidad espermática aumentaba conforme lo hacía la proporción de yema en el diluyente hasta un 25%, mientras que si la conservación se llevaba a cabo a 6-8°C los mejores resultados se obtenían cuando la proporción de yema era la mínima (en este caso del 5%). Dunner y Vázquez en 1991, en el mismo sentido, atribuyeron a la ausencia de yema de huevo en sus 16 diluyentes, los peores resultados obtenidos al conservar el semen a 5°C frente a los 15°C. Entre los diluyentes más empleados figuran los confeccionados principalmente a base de yema de huevo, con citrato, fosfato, fructosa y/o glicina (Sahni y Roy, 1972c; Borgohain et al., 1985; Deka y Rao, 1986c; Azawi et al., 1993; Pintado et al., 1991a). Otros diluyentes empleados incluyen en su composición el Tris (Matthew et al., 1984; Deka y Rao, 1986c; Azawi et al., 1993) o la leche de vaca descremada (Sahni y Roy, 1972c; Borgohain et al., 1985; Azawi et al., 1993; Karatzas et al., 1997) entre otros. En síntesis, puede hablarse básicamente de tres tipos de diluyentes: el Tris-yema, la leche desnatada con o sin yema, y los constituidos principalmente

a partir de yema de huevo. A este respecto, los distintos autores han observado un mejor rendimiento de los diluyentes cuyo componente principal es el Tris frente a los que incluyen leche o fundamentalmente yema (Sahni y Roy, 1972c; Borgohain et al., 1985; Deka y Rao, 1986c; Azawi et al., 1993; Pintado et al., 1991a). El glicerol, por otra parte sólo necesario si se desea congelar las dosis, se ha visto que empeora los resultados cuando simplemente se pretende conservar el semen a 5°C (Misra et al., 1996).

2. 2. 3. SEMEN CONGELADO

La congelación de semen es una herramienta que nos permite distribuir la calidad genética de un macho en el espacio y el tiempo, pero durante el proceso de congelación los espermatozoides se ven expuestos a múltiples agresiones fisico-químicas que menoscaban su integridad, disminuyendo considerablemente la fertilidad del semen; por esta razón han sido muchos los trabajos encaminados a encontrar el medio ideal y las mejores condiciones para conseguir la mayor tasa de supervivencia tras la descongelación, para así mejorar la fertilidad del semen. A continuación se citan los hallazgos más relevantes acerca de la congelación del semen caprino:

2. 2. 3. 1. Método y frecuencia de recogida

El primer paso importante en la congelación seminal es la recogida. Teniendo en cuenta que el macho cabrío presenta variaciones en su calidad y producción seminal a lo largo del año, se debe elegir la época apropiada, si es que existe, en función de la raza. Esto es importante porque la calidad del semen descongelado está muy relacionada con su calidad antes de la congelación. No menos importantes son el método y la frecuencia de recogida, extendiéndose sobre todo el uso de la vagina artificial, la cual proporciona eyaculados de mejor calidad que los obtenidos por electroeyaculación (Greyling y Grobbelaar, 1983; Peskovatskov, 1985). No obstante, también con electroeyaculación se han obtenido resultados satisfactorios (Loubser et al., 1983a; Azawi et al., 1993). La frecuencia de recogida adoptada para obtener semen de calidad oscila entre 1 y 2 veces por semana (Deka y Rao, 1986b; Chauhan y Anand, 1990; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995; Dunner, 1993; Singh et al., 1995, 1996; Karatzas et al., 1997). Tras la recogida, el semen suele mantenerse en un baño María a 30-37°C a la espera ser contrastado y procesado (Corteel y Baril, 1975; Memon et al., 1985; Mukherjee y

Nelson, 1987; Pintado et al., 1991b; Tuli et al., 1991; Roca et al., 1992b; Dunner, 1993; Tuli y Holtz, 1995; Pérez y Mateos, 1996, 1997; Karatzas et al., 1997).

2. 2. 3. 2. Contratación y selección de eyaculados

En el proceso de congelación, la contratación seminal tiene por objeto rechazar para la congelación aquellos eyaculados que no muestren unas condiciones mínimas de calidad, ya que la supervivencia posterior va a depender en gran medida de este factor. En general, los controles más rutinarios que se practican al semen antes de proceder a su conservación son los de volumen (Loubser y Van Niekerk, 1983; Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995; Karatzas et al., 1997), consistencia (Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995), concentración (Memon et al., 1985; Ritar y Salamon, 1991; Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995; Ritar y Ball, 1993; Singh et al., 1995; Sinha et al., 1995, 1996; Karatzas et al., 1997), motilidad masal (Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995; Singh et al., 1995; Sinha et al., 1995, 1996), motilidad progresiva o individual (Memon et al., 1985; Ritar y Salamon, 1991; Tuli et al., 1991; Pintado et al., 1992; Tuli y Holtz, 1992, 1994; Singh et al., 1995; Karatzas et al., 1997), porcentaje de espermatozoides vivos (Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992, 1994; Ritar y Ball, 1993; Singh et al., 1995; Sinha et al., 1995, 1996; Karatzas et al., 1997) y porcentaje de acrosomas normales (Pintado et al., 1992; Singh et al., 1995).

De forma general se ha encontrado que se desechan para la congelación eyaculados con menos de $2,5-3,3 \cdot 10^9$ spz/ml (Memon et al., 1985; Ritar y Salamon, 1991; Ritar y Ball, 1993; Sinha et al., 1995), motilidad masal inferior a 3 o 4 puntuando de 0 a 5 (Tuli y Holtz, 1992, 1994; Sinha et al., 1995), motilidad individual progresiva menor del 70-80% (Memon et al., 1985; Ritar y Salamon, 1991; Pintado et al., 1992), un porcentaje de espermatozoides vivos inferior al 80% (Ritar y Ball, 1993) y/o un porcentaje de acrosomas normales por debajo del 80% (Pintado et al., 1992).

2. 2. 3. 3. Dilución de eyaculados

2. 2. 3. 3. 1. Diluyentes empleados

Los diluyentes más empleados en la congelación de semen caprino contienen como ingrediente principal alguna sustancia con cualidades tamponadoras y protectoras como el **Tris** (Rossouw, 1974; Westhuysen et al., 1980; Ritar y Salamon, 1982, 1991; Loubser et al., 1983a; Deka y Rao, 1985a, 1985b,

1986a, 1986b; Memon et al., 1985; Mukjerhee y Nelson, 1987; Chauhan y Anand, 1990; Deshpande y Mehta, 1991; Pintado et al., 1991b, 1992; Sinha et al., 1991, 1995, 1996; Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992, 1994; Dunner, 1993; Singh et al., 1995, 1996; Sinha et al., 1995, 1996; Singh y Purbey, 1996; Karatzas et al., 1997), la **leche desnatada de vaca** (Corteel, 1974, 1983; Westhuysen et al., 1980; Loubser y Van Niekerk, 1983; Deka y Rao, 1985b; Memon et al., 1985; Mukjerhee y Nelson, 1987; Chauhan y Anand, 1990; Pintado et al., 1991b; Sinha et al., 1991), o la **yema de huevo** (Waide et al., 1977; Memon et al., 1985; Sinha et al., 1991; Deka y Rao, 1985a, 1985b; Deshpande y Mehta, 1991; Chauhan y Anand, 1990).

Muchos de los autores citados en el párrafo anterior han comprobado una mayor efectividad de los diluyentes a base de Tris que los constituidos a base de otra solución tampón con yema de huevo (Rossouw, 1974; Deka y Rao, 1985a, 1985b, 1986; Memon et al., 1985; Chauhan y Anand, 1990; Sinha et al., 1991; Singh y Purbey, 1996). Sin embargo, entre Tris y leche desnatada, la diferencia se decanta unas veces a favor del primero (Drobnis et al., 1980; Deka y Rao, 1987c; Chauhan y Anand, 1990), otras a favor del segundo (Westhuysen et al., 1980; Pintado et al., 1991b), y el resto sin diferencias significativas (Deka y Rao, 1985b; Memon et al., 1985; Sinha et al., 1991). Los resultados obtenidos con diluyentes a base de leche, han sido mejorados por Corteel en 1983, añadiendo a ésta un 25% de solución salina. En ocasiones también se ha empleado leche de cabra en lugar de la de vaca, pero con peores resultados (Deshpande y Mehta, 1991).

Es frecuente la incorporación de algún tipo de **azúcar** al diluyente, por un lado, con la finalidad de aumentar su osmolaridad, y por otro, para actuar como nutriente del espermatozoide. Ya en 1974 Corteel advertía que la adición de glucosa a un diluyente a base de leche desnatada mejoraba significativamente la motilidad tras la descongelación, y Salamon y Ritar en 1982 comprobaron mejores resultados al emplear glucosa o fructosa, que lactosa o rafinosa con un diluyente a base de Tris.

Una **cobertura antibiótica** se hace necesaria también en el diluyente para evitar la proliferación de posibles microorganismos alteradores del medio, o prevenir la transmisión de enfermedades. Una mezcla constituida por penicilina y estreptomycinina a razón de 500-1000 U.I./ml y 0.5-1 mg/ml respectivamente, suele ser la combinación más empleada para conseguir estos objetivos (Chauhan y Anand, 1990; Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992; Singh et al., 1995 1996).

Otros elementos que pueden añadirse al diluyente son **metilxantinas** como la cafeína en concentración 2 mM o la teofilina a 5 mM, las cuales poseen una comprobada acción mejoradora de la motilidad (Sinha et al., 1995). El **glutatión** reducido juega un papel fundamental en la fructolisis y en la inhibición de la peroxidación lipídica acontecida sobre todo durante el proceso de la descongelación, comprobándose que a concentración 5 mM permite un mejor aprovechamiento de la fructosa y una mejor conservación de la estructura de las membranas, preservando por tanto la integridad del acrosoma y aumentando el porcentaje de espermatozoides móviles (Sinha et al., 1996).

La inclusión de **crioprotectores** en los diluyentes de congelación se hace también necesaria para amortiguar los efectos que ésta tiene sobre las células y tejidos debido al cambio de estado del agua: Por un lado, durante la congelación, aumenta la concentración de solutos al reducirse cada vez más la cantidad de agua líquida disponible, volviéndose el medio tóxico por momentos. Por otro, las moléculas de agua pierden movilidad y adoptan una estructura cristalina, formando cristales tanto intra como extracelulares, ostentando mayor volumen que el agua líquida original, constituyendo un peligro para la integridad física de las membranas (Salisbury et al., 1978). Los crioprotectores actúan en general aumentando la osmolaridad del medio, deshidratando ligeramente la célula para que así pueda soportar mejor el aumento de volumen del agua contenida. A su vez, el crioprotector disminuye el punto crioscópico de las soluciones, con lo que a una temperatura dada, la formación de hielo se reduce, y por tanto el efecto concentración es menor. El empleo del glicerol supuso una mejora considerable de los resultados obtenidos en la congelación de semen de toro, siendo hoy por hoy el más utilizado en caprino. Otros crioprotectores como el etilenglicol, el propilenglicol (Waide et al., 1977), el dimetil-sulfóxido o DMSO (Austin et al., 1992; Singh et al., 1995) o sacáridos (Singh et al., 1995) han sido utilizados pero en general con peores resultados. Tan sólo la combinación de lactosa y glicerol (Singh et al., 1995, 1996) o DMSO y glicerol (Austin et al., 1992) ha proporcionado mejores resultados que los obtenidos con la utilización simple del glicerol. Las concentraciones más usadas de glicerol varían del 3% al 8% (Sahni y Roy, 1972b; Corteel, 1974; Rossouw, 1974; Ritar y Salamon, 1982, 1991; Memon et al., 1985; Deka y Rao, 1986b; Mukherjee y Nelson, 1987; Chauhan y Anand, 1990; Deshpande y Mehta, 1991; Pintado et al., 1991b, 1992; Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992, 1994; Das y Rajkonwar, 1994; Singh et al., 1995).

2. 2. 3. 3. 2. La yema de huevo en los diluyentes de congelación de semen caprino

La congelación de semen caprino no es tan exitosa como la de semen bovino, lo cual desde un primer momento se intentó relacionar con la coagulación que se producía en el medio de dilución cuando éste contenía yema de huevo y era incubado. Este efecto, al parecer, era debido a la presencia en el plasma seminal de una enzima (la fosfolipasa A) originada en las glándulas bulbouretrales o de Cowper, que hidrolizaba la lecitina de la yema de huevo produciendo ácidos grasos y lisolecitina, esta última con efecto tóxico sobre los espermatozoides (Roy, 1957; Iritani et al., 1961, 1964; Iritani y Nishikawa, 1963, 1964, 1972; Ritar y Salamon, 1982; Memon et al., 1985). El citado efecto se averiguó que estaba sujeto a cambios estacionales (Iritani et al., 1964; Corteel, 1980; Ritar y Salamon, 1991) aumentando la actividad de la EYCE (*Egg Yolk Coagulating Enzyme*, enzima coaguladora de la yema de huevo) a medida que se acercaba el final de la estación de cría, hasta el punto de que algunos machos no tolerarían concentraciones de yema de huevo superiores al 1,5% (Ritar y Salamon, 1982, 1991). A conclusión similar llegaron Tuli y Holtz (1995) al obtener también mayor tasa de motilidad y porcentaje de espermatozoides vivos en otoño-invierno que en primavera-verano. Iritani et al. (1964), sin embargo, registraron mayor actividad de la EYCE durante la estación de cría.

La retirada del plasma seminal mediante el "lavado" de los espermatozoides (Iritani et al., 1961; Corteel, 1974; Ritar y Salamon, 1982) o la resección de las glándulas bulbouretrales (Iritani y Nishikawa, 1972; Corteel, 1980), reducían sustancialmente el efecto tóxico de la yema de huevo, tanto si el semen era diluido en medios que la contuvieran (Iritani et al., 1961; Iritani y Nishikawa, 1972; Ritar y Salamon, 1982) como si no (Corteel, 1974, 1980; Ritar y Salamon, 1982); por lo que al menos la yema de huevo no sería el único elemento implicado en dicho efecto. En 1974, Corteel diseñó un "lavado" de los espermatozoides que consistía en diluir el semen a razón 1:9 en Krebs-Ringer-fosfato-glucosa, centrifugarlo, retirar el sobrenadante, resuspender en el mismo medio el precipitado de espermatozoides, y repetir el proceso. Otros autores han utilizado para el "lavado" soluciones a base de Tris o Ringer, con fuerzas centrifugas de 660-950g durante 10-15 minutos y diluyendo 1:5-1:20 (Ritar y Salamon, 1982, 1991; Memon et al., 1985; Mukherjee y Nelson, 1987; Pintado et al., 1991b, 1992; Tuli y Holtz, 1994; Singh et al., 1995, 1996; Sinha et al., 1995). En este último aspecto, Ritar y Salamon (1982) comprobaron una mayor efectividad del "lavado" diluyendo 1:10 que

haciéndolo 1:5, así como mejor el doble "lavado" que el simple; pero el "lavado" doble 1:10 podía ser sustituido por el simple 1:20 sin verse afectada la supervivencia de los espermatozoides (Ritar y Salamon, 1982, 1991).

Además del beneficio a corto plazo del "lavado" sobre la calidad de los espermatozoides tras la descongelación, Corteel y Baril (1975) completaron el hallazgo descubriendo un efecto beneficioso del "lavado" también a largo plazo, notando que de los 3 a los 90 días de conservación del semen en nitrógeno líquido, la pérdida adicional de motilidad era del 16,6% en el semen no "lavado" y del 0% en el "lavado". De los 90 a los 180 días el semen no "lavado" llegó a perder un 22,0% de motilidad, mientras que el "lavado" sólo sufrió una pérdida del 1,3%. Sin embargo, contrariamente a lo observado por Corteel y Baril, Deka y Rao (1987b) notaron un aumento significativo de anomalías espermáticas hasta los 12 meses, con la misma intensidad en semen "lavado" que en el no "lavado". Y en 1991, Ritar y Salamon detectaron también la misma pérdida adicional de motilidad tras 6 meses de conservación a -196°C , tanto en semen "lavado" como en semen íntegro, y congelando en medios con yema de huevo. En el mismo estudio, Ritar y Salamon comprobaron además, que cuando al diluyente no se le añadía yema de huevo, tras dos meses de conservación se producía un mayor descenso de la motilidad en semen "lavado" que en el no "lavado". Este resultado contradice las suposiciones de Corteel y Baril (1975), quien atribuía la pérdida de viabilidad en el semen no "lavado" tras 6 meses de conservación a la presencia de yema de huevo.

Los efectos beneficiosos del "lavado" han sido también citados por Westhuysen (1978), Drobnis et al. (1980), Ritar y Salamon (1982, 1991), Memon et al. (1985), Deka y Rao (1986c) y Dunner (1993), tanto sobre la calidad del semen congelado como sobre la del refrigerado. Otras veces o se ha encontrado mejora significativa en la calidad o fertilidad del semen "lavado" sobre el no "lavado", o incluso se ha observado diferencia significativa a favor del segundo (Ritar y Salamon, 1983; Strohmeier, 1988; Tuli y Holtz, 1994). Con todo esto, surge la duda de si realmente conviene invertir más tiempo en una laboriosa tarea que retrasa el proceso de la congelación (Corteel y Baril, 1975; Ritar y Salamon, 1983), y que por sí misma se traduce de forma inmediata en una pérdida de espermatozoides y una reducción de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides vivos y acrosomas normales, la capacidad de endósmosis y la integridad celular (Drobnis et al., 1980; Ritar y

Salamon, 1982; Pintado et al., 1992; Tuli y Holtz, 1994). Autores como Memon et al. (1985) o Ritar y Salamon (1982, 1991), explicando en parte las diferencias de apreciación entre unos y otros en función de la metodología de valoración empleada, han encontrado que la ventaja del semen "lavado" sobre el no "lavado" no se hace patente en el instante mismo de la descongelación del semen, sino tras la incubación a 37°C durante varias horas como afirmara en su día Corteel (1974). De hecho, la actividad de la EYCE se optimiza en torno a temperaturas de 40°C, bastando tan solo una proporción del 2,5-4% de plasma seminal para provocar la coagulación del medio (Ritar y Salamon, 1982). El doble "lavado", por otro lado, no elimina totalmente el plasma seminal, pudiendo manifestarse el efecto de la coagulación tras períodos de incubación de 5 horas (Iritani et al., 1961).

La controversia encontrada entre unos y otros autores, se suele fundar en que la conveniencia o no de efectuar el "lavado" de los espermatozoides antes de la dilución, depende en gran medida del factor individual, racial, así como del método de congelación empleado o los criterios de valoración del semen descongelado (Ritar y Salamon, 1982). Así por ejemplo, Memon et al. (1985) han encontrado que las diferencias de motilidad espermática y porcentaje de espermatozoides normales eran mayores entre el semen "lavado" y el no "lavado" cuando el diluyente empleado era leche, que cuando era lactosa-yema o Tris-yema; y ya Courtens et al. en 1984, habían observado por microscopía electrónica, que la acción de la secreción de las glándulas bulbouretrales se limitaba, según su observación, a inducir la adhesión de determinados componentes de la leche a la mitad anterior de la cabeza del espermatozoide, traducándose esto en una mayor frecuencia de reacciones acrosómicas; por lo tanto cabría pensar más en una toxicidad de la leche que de las lisofecitinas supuestamente generadas por la interacción entre la secreción de las glándulas bulbouretrales y la yema de huevo. De hecho, en 1990 Chauhan y Anand comprobaron que los fosfolípidos más abundantes en la yema de huevo (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) no eran hidrolizados por las enzimas del plasma seminal. Sahni (1987), por otro lado, encontró que la presencia de iones sodio y citrato frenaban la reacción, mientras que la del ion calcio la catalizaba.

La importancia de emplear o no yema de huevo en los diluyentes de congelación de semen caprino, radica principalmente en sus ventajas como protector de los espermatozoides contra el choque por frío y la presión osmótica (Pintado et al., 1991b; Dunner y Vázquez, 1991; Dunner, 1993), por lo que

aquellos autores que han comprobado que la raza con la que trabajan o los machos empleados no presentan grandes problemas a la hora de incorporar yema de huevo a sus diluyentes, lo hacen sin tan siquiera plantearse el "lavado" previo de los espermatozoides (Deka y Rao, 1986a, 1986b; Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995); otros, optan por utilizar yema de huevo en los diluyentes pero realizando previamente el "lavado" de los espermatozoides (Ritar y Salamon, 1982, 1991; Loubser et al., 1983; Pintado et al., 1991b; Dunner, 1993; Singh et al., 1995, 1996; Karatzas et al., 1997); y el resto, se inclinan por "lavar", y emplear diluyentes sin yema de huevo (Corteel, 1974).

Autores como Ritar y Salamon (1991) han comprobado que en semen íntegro, la pérdida de motilidad tras la conservación del semen en nitrógeno líquido durante 6 meses era mayor en semen diluido en medios con un 1,5% de yema que en el diluido con un 6%. Deka y Rao (1986a) obtuvieron significativamente mayor porcentaje de motilidad espermática progresiva y menor porcentaje de acrosomas dañados diluyendo semen íntegro en medios con un 10-20% de yema de huevo que con un 7%, y otros muchos autores emplean concentraciones del 15-20% de yema de huevo en sus diluyentes de congelación obteniendo resultados satisfactorios (Memon et al., 1985; Tuli y Holtz, 1992, 1994; Singh et al., 1995, 1996). Todos estos autores coinciden en la ventaja que supone emplear yema de huevo en los diluyentes. Ritar y Salamon (1991), en la línea del efecto estacional sobre la actividad de la EYCE, obtuvieron los mejores resultados con un 12% de yema de huevo a principios de la estación de cría y con un 0-1,5% a finales de ésta, supuestamente por la mayor actividad de la EYCE durante este último período. Por tanto, el factor estacional debe ser otro de los tenidos en cuenta según la raza a la que nos refiramos, para valorar el efecto de la adición de yema de huevo en los diluyentes sobre los parámetros del semen a la descongelación.

La mayoría de los autores recomiendan yema de huevo fresco de no más de 24 horas (Mukherjee y Nelson, 1987) o 3 días (Tuli y Holtz, 1994), pero, al menos en caprino, no se han llevado a cabo estudios acerca de la importancia de este hecho. Ritar y Salamon (1991), de hecho, empleaban yema de huevo conservada a -20°C y descongelada el mismo día de la recogida para incorporarla al diluyente, obteniendo resultados satisfactorios.

2. 2. 3. 3. 3. Tasa de dilución

La dosis necesaria de espermatozoides para conseguir una buena fertilidad en caprino se sitúa en torno a los 200-300 millones, por lo que partiendo de esta base, muchos autores diluyen el semen lo suficiente para conseguir concentraciones que rondan los $400-600 \cdot 10^6$ spz/ml, en función del volumen del eyaculado y la concentración inicial de éste (Memon et al., 1985; Mukherjee y Nelson, 1987; Pintado et al., 1991b, 1992; Singh et al., 1995, 1996). Otros, emplean tasas de dilución constantes tras una verificación mínima de calidad, evitando así tener que calcular la magnitud de la dilución, y acelerando así todo el proceso (Chauhan y Anand, 1990; Tuli y Holtz, 1992; Sinha et al., 1996). Las tasas de dilución empleadas oscilan entre 1:2 y 1:30 (Chauhan y Anand, 1990; Ritar et al., 1990b; Tuli y Holtz, 1992; Singh et al., 1996; Sinha et al., 1996), obteniéndose una mayor calidad del semen a la descongelación cuando la tasa de dilución ronda el 1:20 (Chauhan y Anand, 1990). Ritar y Ball (1993) en la misma línea comprobaron mejores resultados con una tasa de dilución 1:2 frente a 1:0,5 o 1:1, pero Ritar et al. (1990a) no encontraron diferencia alguna entre emplear tasas de dilución 1:2 o 1:23.

2. 2. 3. 3. 4. Proceso de dilución

La dilución del semen suele realizarse en varias fases, incluyendo la primera de ellas la incorporación de diluyente sin glicerol, y a continuación y de forma paulatina la del diluyente con glicerol (Mukherjee y Nelson, 1987; Deka y Rao, 1986b). Este procedimiento, supuestamente, permite una aclimatación progresiva de la célula al medio hiperosmótico que supone el medio glicerolado, con lo que la deshidratación de ésta no se produce de forma repentina. Simplificando el método, algunos autores han renunciado a una primera dilución sin glicerol evitando con ello tener que trabajar con dos fracciones del diluyente, obteniendo buenos resultados (Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992; 1994, 1995). Sin embargo, intentos de simplificar aún más la incorporación del glicerol reduciendo la dilución a un solo paso, han desembocado en la obtención de peores resultados que los obtenidos añadiendo la fracción glicerolada en varios pasos (Tuli y Holtz, 1994).

Por otro lado, la incorporación de la porción glicerolada tradicionalmente se ha venido realizando a temperaturas de refrigeración (Deja y Rao, 1987a; Pintado et al., 1991b, 1992), pero trabajos recientes han podido constatar que también es factible realizarla a 30-37°C o a temperatura ambiente (Ritar y Salamon, 1982, 1991; Salamon y Ritar, 1982; Ritar et al., 1990b; Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992, 1994), habiéndose obtenido incluso

mejores resultados que cuando se incorporaba a 4-5°C (Salamon y Ritar, 1982, Tuli y Holtz, 1994).

2. 2. 3. 4. Descenso de temperatura

Una vez realizada la primera o todas las diluciones, según el método, se procede a un descenso paulatino de la temperatura hasta los 4-5°C en un tiempo estimado entre una y dos horas (Ritar y Salamon, 1982, 1991; Deka y Rao, 1986b; Mukherjee y Nelson, 1987; Chauhan y Anand, 1990; Pintado et al., 1991b, 1992; Dunner, 1993; Tuli y Holtz, 1994, 1995). Deka y Rao (1987a) ampliando dicho período a 2,5 horas notaron menor daño acrosómico en comparación con las 1,5 horas, y Westhuysen (1978) no detectó diferencia significativa alguna entre 1/2, 1 o 2 horas.

2. 2. 3. 5. Período de equilibración

Tras el pertinente descenso de temperatura y la adición de la porción glicerolada del diluyente, el semen diluido se mantiene a 4-5°C durante un período comprendido entre 2 y 6 horas según los distintos autores, para permitir la reestructuración de membranas imprescindible para dotar a la célula de mayor resistencia frente a la congelación (Rossouw, 1974; Westhuysen, 1978; Memon et al., 1985; Deka y Rao, 1986b; Sinha et al., 1995, 1996; Chauhan y Anand, 1990; Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995; Das y Rajkonwar, 1994, 1996; Singh et al., 1995, 1996). Chauhan y Anand (1990) demostraron mayor calidad del semen ampliando el período de equilibración a 3 horas, frente a 1, 2, 4 y 5 horas.

2. 2. 3. 6. Congelación propiamente dicha

La congelación del semen tras su conveniente preparación, suele realizarse fundamentalmente mediante dos métodos: la congelación en pajuelas sobre los vapores del nitrógeno líquido (Corteel, 1974; Loubser y Van Niekerk, 1983; Memon et al., 1985; Deka y Rao, 1986b; Mukherjee y Nelson, 1987; Pintado et al., 1991b; Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995; Dunner, 1993; Ritar y Ball, 1993; Karatzas et al., 1997) y la congelación en píldoras o "pellets" sobre nieve carbónica (Waide et al., 1977; Ritar y Salamon, 1982, 1991; Loubser et al., 1983a; Ritar y Ball, 1993). Ritar et al. (1990b) obtuvieron mayor viabilidad congelando los espermatozoides en píldoras que en pajuelas, pero no observaron diferencias de fertilidad entre ambos métodos (Ritar et al., 1990a).

A su vez, se emplean pajuelas de 0,5 (Deka y Rao, 1986b; Mukherjee y Nelson, 1987; Pintado et al., 1991b, 1992; Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995) ó 0,2-0,25 ml (Corteel y Baril, 1975; Memon et al., 1985; Chauhan y Anand, 1990; Dunner, 1993; Ritar y Ball, 1993; Singh et al., 1995, 1996). Samouilidis y Hahn (1972) obtuvieron mayor motilidad con pajuelas de 0.5 que de 0.2-0.25, y Ritar et al. (1990b) no observaron diferencia alguna entre ambos tipos de pajuelas.

En general, la velocidad óptima de congelación depende en gran medida del tipo de crioprotector y su concentración, el diluyente, y por supuesto de la geometría del envase. El aumento de la concentración del crioprotector, permite reducir la velocidad de congelación. Crioprotectores no penetrantes, como los azúcares o las proteínas, exigen mayores velocidades de congelación que los penetrantes, como el glicerol o el DMSO. La técnica más empleada en caprino para pajuelas de 0,25-0,5 ml y empleando concentraciones de glicerol del 3-8%, consiste en situar las pajuelas a 2-5 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido durante 8-10 minutos, donde la temperatura oscila entre los -110 y los -120°C (Deka y Rao, 1986b; Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995). A continuación se sumergen en el nitrógeno líquido a -196°C .

2. 2. 3. 7. Conservación en nitrógeno líquido

El metabolismo celular se ralentiza con el descenso de la temperatura, hasta casi detenerse a temperaturas de congelación. Pero aún así, a -196°C se mantiene cierta actividad, hasta el punto de que ciertos cambios pueden tener lugar en el semen incidiendo sobre su calidad. Corteel y Baril (1975) ya observaron una pérdida de motilidad durante la conservación del semen caprino en nitrógeno líquido durante un período de 6 meses, que iba desde un 1,3% en semen "lavado" a un 22% en el semen no "lavado". Deka y Rao (1987b) detectaron también un aumento significativo de las anomalías espermáticas hasta los 12 meses, y Samouilidis et al. (1982) comprobaron tras 11 años de conservación en nitrógeno líquido, un descenso del 15% en motilidad y del 20% en la fertilidad.

2. 2. 3. 8. Descongelación

Tradicionalmente la descongelación del semen se ha venido realizando en agua a temperaturas de 30-40°C durante 10-120 segundos (Corteel, 1974; Corteel y Baril, 1975; Waide et al., 1977; Ritar y Salamon, 1982, 1991; Loubser et al., 1983a; Memon et al., 1985; Deka y Rao, 1986b, 1987c; Chauhan y Anand, 1990; Pintado et al., 1991b, 1992; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995; Dunner, 1993; Ritar y Ball, 1993; Singh et al., 1995; Sinha et al., 1995), con ventajas frente a la descongelación a temperatura ambiente (Rossouw, 1974) o a 5°C (Deka y Rao, 1987c); pero en algunos trabajos se ha obtenido mejor calidad seminal con mayores velocidades de descongelación comprendiendo temperaturas del orden de los 55-70°C durante 7 segundos (Tuli et al., 1991), razón por la cual otros autores han optado por descongelar en estas condiciones (Lawrenz, 1986). La explicación parece estar en que cuanto más rápida es la descongelación, menos tiempo permanece el semen bajo los efectos deletéreos del cambio de estado del agua, y más sincronizada es la descongelación del medio extracelular con la del intracelular; aunque todo esto depende en gran medida de la velocidad de congelación a la que fue sometido el semen, y por tanto, al tipo de cristales de hielo que se formaron.

2. 2. 3. 9. Contrastación y selección del semen congelado-descongelado

En el semen congelado-descongelado, la característica más estudiada es la motilidad (Rossouw, 1974; Corteel y Baril, 1975; Westhuysen, 1978; Ritar y Salamon, 1982, 1991; Deka y Rao, 1985b, 1986a, 1986b, 1987c; Memon et al., 1985; Sinha et al., 1991, 1995, 1996; Chandler et al., 1988; Strohmeyer, 1988; Dunner y Vázquez, 1991; Pintado et al., 1991b, 1992; Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995; Dunner, 1993; Ritar y Ball, 1993; Berger et al., 1994; Singh et al., 1995; Singh y Purbey, 1996), seguida por el estado de los acrosomas (Deka y Rao, 1985a, 1985b, 1986b, 1987c; Chandler et al., 1988; Dunner y Vázquez, 1991; Pintado et al., 1991b, 1992; Dunner, 1993; Berger et al., 1994; Sinha et al., 1995; Singh et al., 1995; Sinha et al., 1995, 1996; Singh y Purbey, 1996), la resistencia osmótica (Dunner y Vázquez, 1991; Pintado et al., 1991b, 1992; Dunner, 1993) el porcentaje de espermatozoides vivos (Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995; Singh et al., 1995; Sinha et al., 1995), el porcentaje de anomalías espermáticas (Singh et al., 1995; Singh y Purbey, 1996), la actividad enzimática intracelular (Singh et al., 1996) o extracelular (Drobnis et al., 1980; Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992, 1994; Singh et al., 1996; Sinha et al., 1996), y finalmente otras como la aglutinación (Chandler et al., 1988) o penetración de ovocitos (Berger et al., 1994). Berger et al. (1994) compararon motilidad espermática, integridad acrosómica, capacidad de los espermatozoides para sufrir la reacción acrosómica, y

habilidad del espermatozoide para fusionarse con la membrana plasmática del ovocito de hamster, encontrando que sólo la última de estas pruebas se correlacionaba significativamente con la fertilidad.

La **motilidad** suele valorarse de forma similar a como se ha descrito para el semen fresco, pero con menores tasas de dilución.

El **porcentaje de espermatozoides vivos** se determina tras la tinción con eosina-nigrosina, realizando un recuento de 200 espermatozoides a 400-1000 aumentos (Greyling y Grobbelaar, 1983; Loubser y Van Niekerk, 1983; Tuli et al., 1991; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995; Karatzas et al., 1997). Loubser y Van Niekerk (1983), sin embargo, realizaron la tinción con violeta genciana y se ayudaban de un hemocitómetro.

El porcentaje de **espermatozoides morfológicamente normales** se suele determinar mediante la misma prueba anterior (Greyling y Grobbelaar, 1983; Loubser y Van Niekerk, 1983; Ali y Mustafa, 1986; Skalet et al., 1988) o la de la “gota gruesa”, fijando la muestra de semen en solución fosfato tamponada conteniendo glutaraldehído al 2% y a 37°C, para contar a continuación 100-400 espermatozoides al microscopio de contraste de fases a 1000 aumentos (Roca et al., 1992a, 1992b; Pérez y Mateos, 1996, 1997).

El porcentaje de **espermatozoides con acrosoma normal** se determina también mediante la prueba de la “gota gruesa” detallada en el párrafo anterior contando 100-200 células (Memon et al., 1985; Okere et al., 1986; Pintado et al., 1991b; Pintado-Sanjuanbenito y Pérez-Llano, 1992; Roca et al., 1992b; Dunner, 1993; Pérez y Mateos, 1996, 1997) o mediante tinción Giemsa (Deka y Rao, 1986b; Singh et al., 1995; Sinha et al., 1995, 1996; Misra et al., 1996).

El porcentaje de **endósmosis positiva** se determina diluyendo una gota de semen ($\approx 50 \mu\text{l}$) en 1 ml de una solución de citrato trisódico 100 mO (1g/100ml) y fijando la muestra en glutaraldehído para observarla mediante el microscopio de contraste de fases. Se consideran reacciones normales aquellas en las que el espermatozoide presente el flagelo enrollado en mayor o menor grado dentro de la membrana plasmática (Dunner y Vázquez, 1991; Pintado et al., 1991b).

La calidad del semen descongelado, deteriorado por el proceso de congelación-descongelación, suele estar en caprino muy reducida con respecto a la del semen antes de la congelación, con valores de motilidad desde el 20-30% (Westhuysen, 1978; Corteel, 1983; Strohmeyer, 1988; Dunner,

1993) al 60-70% (Deka y Rao, 1985b, 1986a, 1986b; Chouhury et al., 1987; Sinha et al., 1991; Delgadillo et al., 1992a), siendo lo más habitual encontrarla entre un 30 y un 60% (Rossouw, 1974; Corteel y Baril, 1975; Westhuysen, 1978; Salamon y Ritar, 1982; Loubser et al., 1983c; Deka y Rao, 1985b; Strohmeier, 1988; Delgadillo et al., 1992a; Tuli y Holtz, 1992, 1994, 1995; Sinha et al., 1995; Singh et al., 1995; Sinha et al., 1995). El porcentaje de acrosomas intactos en el semen descongelado varía según la literatura entre el 30-40% de Strohmeier (1988) y Dunner (1993), al 70-90% de autores como Deka y Rao (1985a, 1985b, 1986a, 1987c) o Sinha et al. (1995), pasando por el 40-70% de Memon et al. (1985). Todo ello según la raza, el proceso de congelación llevado a cabo, los criterios del evaluador, así como la técnica de contrastación empleada (Pintado-Sanjuanbenito y Pérez-Llano, 1992).

La mayoría de los autores desechan para la inseminación aquellas dosis en las que el porcentaje de espermatozoides móviles sea menor del 30-45% (Corteel, 1980; Singh et al., 1995; Karatzas et al., 1997) y/o la puntuación en motilidad menor de 3 puntuando de 0 a 5 (Corteel, 1980; Karatzas et al., 1997).

2. 3. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

2. 3. 1. MÉTODOS DE SINCRONIZACIÓN-INDUCCIÓN DEL CELO

Las razas de climas templados muestran una importante variación estacional en su actividad reproductiva, controlada principalmente por la fluctuación anual de la duración del día (Malpaux et al., 1995). Por ese motivo, en contraestación se suele recurrir a métodos de inducción del celo que consisten en someter el aparato reproductivo de la hembra a un ambiente progestérico durante unos días, para a continuación estimular adecuadamente el ovario con FSH o análogos como la PMSG o la eCG, e incluso en ocasiones asegurando la ovulación y formación del cuerpo lúteo con análogos de la LH como la hCG. Otra estrategia empleada para conseguir que las hembras muestren actividad cíclica en contraestación, es la que combina una manipulación del fotoperíodo mediante suministro de luz en invierno, y la administración de melatonina por medio de implantes en primavera (Malpaux et al., 1995).

La sincronización-inducción del celo es interesante también porque permite un agrupamiento de los celos, y con ello una mejora en las

condiciones de manejo, la posibilidad de programar la contratación de servicio técnico especializado para llevar a cabo las inseminaciones, y un mayor control de la fecha de parto y por tanto de sus condiciones. Por esta razón se considera una herramienta casi imprescindible para realizar inseminaciones a nivel de campo.

Los tratamientos de sincronización-inducción del celo empleados para inseminación artificial, implican el sometimiento de la hembra a una fase progesterónica de unos 17-21 días (Bongso et al., 1982; Berger et al., 1994), o a un período de actuación más corto del progestágeno (10-11 días), en combinación con algún luteolítico (Simplicio y Machado, 1991a, 1991b). Esta fase progesterónica es esencial fuera de estación o al comienzo de la estación reproductiva para el éxito de la posterior fase folicular del ciclo, y bloquea el comienzo de ésta mientras no se retire el dispositivo liberador de progestágeno. Sin embargo, si no va acompañada de la administración de PMSG, incluso en época reproductiva, provoca una débil respuesta ovárica (Ritar et al., 1984; Tamanini et al., 1985). En tratamientos de 10-11 días, la aplicación del luteolítico se hace necesaria para evitar que algunas cabras cíclicas puedan mantener un cuerpo lúteo funcional tras la retirada del dispositivo liberador de progestágeno.

Dos días antes de la retirada del dispositivo liberador de progestágeno suele administrarse PMSG o eCG con el fin de estimular el crecimiento folicular, a mayor o menor dosis según el grado de estacionalidad y prolificidad de la raza (Lawrenz, 1986; Corteel et al., 1988; Ritar et al., 1989; La chevre, 1992; Ritar y Ball, 1993; Baril et al., 1993; Freitas et al., 1996; Karatzas et al., 1997), y en ocasiones conjuntamente con hCG (Simplicio y Machado, 1991b).

En estación reproductiva, el tratamiento progestágeno puede sustituirse por dos aplicaciones de prostaglandina F_{2α} o análogos, separadas unos 10-11 días (Machado y Simplicio, 1994), de manera que en el momento de la segunda aplicación todas las hembras presenten un cuerpo lúteo sensible, y tras la lisis queden sincronizadas.

2.3.2. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL PROPIAMENTE DICHA

La aplicación del semen en caprino se lleva a cabo mediante dos técnicas: la inseminación laparoscópica y la inseminación transcervical. La primera de ellas surge por la necesidad de obtener en caprino mayores

índices de fertilidad, ya que ésta aumenta con la profundidad de deposición, y atravesar el cuello uterino en esta especie constituye una dificultad añadida.

2. 3. 3. FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA FERTILIDAD DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

2. 3. 3. 1. Método de sincronización/inducción del celo

Aunque la sincronización mediante tratamiento hormonal comporta muchas ventajas a la hora de programar las inseminaciones, no hay que olvidar el costo que representa y la menor fertilidad que se consigue frente al celo espontáneo (González-Stagnaro et al., 1975; Drilleau, 1991; Simplicio y Machado, 1991a, 1991b), por lo que deben considerarse también alternativas como el efecto macho cuando sea posible su aplicación (Gibbons et al., 1992).

Como progestágeno para los tratamientos de sincronización o sincronización-inducción del celo se suele emplear esponjas impregnadas con 40-45 mg de FGA (González-Stagnaro et al., 1975; Corteel et al., 1988; Ritar et al., 1989; La chevre, 1992; Freitas et al., 1996), con 50-60 mg de MPA (Loubser et al., 1983a; Lawrenz, 1986; Simplicio y Machado, 1991a, 1991b; Karatzas et al., 1997), o los dispositivos internos de liberación controlada de progestágeno o CIDR (Corteel et al., 1988; Ritar et al., 1989; Ritar y Ball, 1993). Dosis de 45 mg de FGA (González-Stagnaro, 1975) o 60 mg de MAP (Simplicio y Machado, 1991a) han sido descritas como mejores que las de 40 mg de FGA o 50 mg de MPA respectivamente, proporcionando una mayor fertilidad. Corteel et al. (1988) obtenían también mejor fertilidad tras la inseminación transcervical con semen congelado utilizando un dispositivo CIDR, que una esponja; mejora que no encontraron Ritar et al. (1989) inseminando laparoscópicamente. Estudios relativamente recientes han comprobado que la sustitución de una esponja impregnada en progestágeno a mitad del tratamiento repercute negativamente sobre la fertilidad, contrariamente a lo que podría esperarse (Freitas et al., 1996). No es por tanto recomendable intentar mantener una concentración estable de progesterona a lo largo del tratamiento, sino que es preferible que ésta vaya disminuyendo paulatinamente como ocurre de forma normal a medida que la esponja va perdiendo principio activo. La preferencia o no de emplear tratamiento progesterónico previo u optar por dos aplicaciones de prostaglandina dependerá en cada caso del grado de estacionalidad de la raza, puesto que en contraestación, la instauración de

un estado progesterónico previo es indispensable en razas estacionales. Corteel et al. (1988) observaron cómo la fertilidad mejoraba cuando las esponjas eran retiradas por la mañana en vez de por la tarde.

Con la administración de PMSG se consigue adelantar el momento de la ovulación (Ritar et al, 1989), aunque la dosis en sí no repercute sobre la fertilidad en estación reproductiva (Ritar y Salamon, 1983). Su aplicación 48 horas antes de la retirada de las esponjas mejora la fertilidad de la inseminación transcervical con semen congelado, frente a su administración en el momento de la retirada de dichas esponjas (Ritar et al, 1989).

Se ha comprobado también que tratamientos hormonales de sincronización continuados año tras año, traen consigo respuestas retardadas al tratamiento por un efecto de inmunización ante la PMSG; lo cual puede llevar a retrasos en la aparición del celo en algunas hembras, y con ello, a una mayor dispersión de los celos, con la consecuente pérdida de fertilidad en caso de inseminar a tiempo fijo tras la retirada de esponjas sin tener en cuenta el momento de la aparición del celo (Baril et al., 1992, 1993, 1996; La chevre, 1992).

2. 3. 3. 2. Momento de inseminación

La congelación supone para los espermatozoides una serie de agresiones que menoscaban su integridad, volviéndose más sensible a condiciones externas y perdiendo capacidad fecundante. A su vez, el tiempo transcurrido desde la recogida hasta la congelación definitiva, así como el metabolismo que aunque ínfimo sigue desarrollándose en el espermatozoide durante la conservación en nitrógeno líquido, repercute sobre la vida media que resta al espermatozoide una vez descongelado, por lo que se busca una inseminación prácticamente sincronizada con la ovulación, y mejor algo antes que algo después de ésta (Suga et al., 1972; Ritar et al., 1990a). Se ha comprobado que la supervivencia de los espermatozoides en el tracto femenino mejora en torno al celo, y la motilidad en el cérvix declina conforme se acerca el momento de la ovulación, pero no así en el útero, donde la motilidad no depende de si su estado es luteal, de inicio o final de celo (Suga et al., 1972). Teniendo en cuenta estos aspectos y que la fertilidad se incrementa considerablemente con la profundidad de deposición del semen, los distintos autores han descrito un momento óptimo de inseminación que oscila entre las 30 y las

62 horas de la retirada del tratamiento progestágeno, según la raza, si se opta por una o dos inseminaciones, o si se ha incluido o no PMSG en el tratamiento (Bongso et al., 1982; Lawrenz, 1986; La chevre, 1992; Baril et al., 1993; Ritar y Ball, 1993; Berger et al., 1994; Karatzas et al., 1997). En caso de inseminar a celo detectado suele hacerse sobre las 12-14 horas o a las 12 y 24 horas tras la detección, suponiendo una frecuencia de detección de 12 horas (González-Stagnaro et al., 1975; Gibbons et al., 1992; Loubser et al., 1983a).

2. 3. 3. 3. Número de inseminaciones y dosis

Como consecuencia de la amplia variación individual en cuanto al momento de inicio del celo desde el final del tratamiento de sincronización y por tanto también en cuanto al momento de la ovulación, surge la duda de si es más conveniente inseminar una sola vez cuando se espera que la mayoría de las hembras esté en el momento óptimo de serlo, o asegurar la fecundación inseminando un mayor número de veces a intervalos separados adecuadamente en función del momento más probable en que pueda acontecer la ovulación. Corteel et al. (1988), sin embargo, en un amplio estudio, comprobaron una ligera aunque significativa mejora de la fertilidad inseminando sólo una vez que haciéndolo dos veces, hecho que atribuyeron a la provocación de un menor estrés al animal. También Ritar y Ball (1993) obtuvieron mejores resultados inseminando una vez que haciéndolo dos veces dando la razón a Corteel, aunque por el escaso número de animales la diferencia no fue significativa. Otros autores no han encontrado diferencia significativa si bien el número de animales utilizados fue reducido (Ritar y Salamon, 1983), y otros tantos obtienen mayor fertilidad inseminando dos veces que tan sólo una (Karatzas et al., 1997).

La dosis empleada en inseminación con semen congelado suele oscilar entre los 60-300 millones de espermatozoides para inseminación transcervical (Corteel y Baril, 1975; Ritar y Salamon, 1983; Lawrenz, 1986; Ritar et al., 1990a; Baril et al., 1993; Ritar y Ball, 1993; Karatzas et al., 1997) y los 10-60 millones para inseminación laparoscópica (Ritar et al., 1990a; Ritar y Ball, 1991, 1993; Singh et al., 1995). Muchos autores han comprobado cómo con la disminución de la dosis seminal se reduce también la fertilidad, aunque las diferencias descritas en la mayoría de los casos son pequeñas y no significativas (Ritar y Salamon, 1983; Lawrenz, 1986; Ritar et al., 1990a; Ritar y Ball, 1991).

2. 3. 3. 4. Profundidad de deposición

La profundidad de la deposición del semen es otro tema importante a tener en cuenta en caprino, puesto que la cualidad más mermada en el semen tras su congelación es su capacidad para atravesar el cuello uterino. Numerosos estudios revelan una diferencia significativa entre la fertilidad del semen fresco o refrigerado y la del congelado, que desaparece o se hace menos patente cuanto más profundamente en el cérvix se deposita el semen, hasta llegar a la luz uterina (Bongso et al., 1982; Ritar y Salamon, 1983; Ritar et al., 1989, 1990a). En este aspecto, la experiencia del inseminador ha sido considerada como un factor importante para mejorar la fertilidad de un año a otro (Peskovatskov, 1985). Bongso et al. (1982) consiguieron la máxima penetrabilidad del cuello uterino a las 72 horas de finalizado el tratamiento de sincronización con esponjas y PMSG. Debido a la mayor fertilidad conseguida con la deposición uterina y a que no siempre se consigue superar el cérvix, en muchas ocasiones se recurre a la inseminación laparoscópica (Ritar et al., 1989, 1990a), pero tan sólo en el ámbito de experiencias concretas o animales muy valiosos en los que el incremento de fertilidad compense el mayor coste de la operación.

2. 3. 3. 5. Otros factores

Como ya se comentó en apartados anteriores acerca de los factores que influyen sobre la calidad seminal del macho cabrío, la **estacionalidad** reproductiva es otro factor importante a tener en cuenta en la hembra a la hora de inseminar, dependiendo de la raza y las condiciones ambientales (Prasad, 1981; Lawrenz, 1986; Casu et al., 1991; Chemineau, 1993; Malpoux et al., 1995).

La fertilidad de las hembras suele ir aumentando con la **edad** hasta los 2,5 años (Ritar et al., 1990a; Drilleau, 1991), y también se ve mejorada *conforme aumenta el período transcurrido entre el **destete** y la inseminación* (Ritar et al., 1989).

2. 3. 4. FERTILIDAD TRAS LA MONTA NATURAL Y LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

La fertilidad encontrada en la bibliografía oscila a grandes rasgos entre el 70-100% con monta natural (Loubser et al., 1983a; Westhuysen et al.,

1980; Loubser et al., 1983a; Bongso et al., 1982; Drilleau, 1991), el 60-90% tras la inseminación con semen fresco (Westhuysen et al., 1980; Prasad, 1981; Loubser et al., 1983a; Ritar et al., 1989; Karatzas et al., 1997), el 55-90% con semen refrigerado (Corteel, 1976; Borgohain et al., 1985; Corteel et al., 1988) y el 20-80% con congelado (Corteel, 1975, 1976; Waide et al., 1977; Westhuysen et al., 1980; Loubser et al., 1983a; Corteel et al., 1988; Deka y Rao, 1989; Chauhan y Anand, 1990; Ritar et al., 1990a; Ritar y Ball, 1991, 1993; La chevre, 1992; Delgadillo et al., 1992a; Baril et al., 1993; Singh et al., 1995; Karatzas et al., 1997). La Tabla 2 muestra algunos de los valores de fertilidad obtenidos por estos autores en función del tipo de semen empleado.



Tabla 2. Fertilidad tras la cubrición natural (C), la inseminación con semen fresco (F) o congelado (Cg).

Referencia	C	F	Cg
Bongso et al., 1982	71,00%		81,00%
Waide et al., 1977			71,90%
Joseph y Nai, 1989			70,40%
Corteel, 1976			69,40%
González-Stagnaro, 1975a, 1975b			68,60%
Deka y Rao, 1989			66-69%
Delgadillo et al., 1992a			63,00%
Corteel et al., 1988			57-63%
Samouilidis et al., 1982			53-67%
Drilleau, 1991	69,00%	55,00%	60,00%
La Chevre, 1992			58,40%
Simplicio y Machado, 1991a, 1991b			34-73%
Singh et al., 1995			50,53%
Ritar et al., 1990a			34-64%
Sinha et al., 1987			43,75%
Westhuysen et al., 1980	100,00%	90,00%	27-50%
Loubser et al., 1983a	76,70%	90,00%	34,80%
González-Stagnaro et al., 1975	80,20%		11-24%

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. 1. ANIMALES

Se utilizaron 7 machos de la Agrupación Caprina Canaria (variedad Majorera) con una media de 18 meses de edad al comienzo de la experiencia y previamente entrenados para servir en vagina artificial.

3. 1. 1. CONDICIONES DE MANEJO, ESTADO SANITARIO, ALOJAMIENTO Y ALIMENTACIÓN

Los machos fueron alojados conjuntamente en un área de unos 100 m², con zona cubierta y zona al aire libre, donde podían pasear y tener libre acceso al agua y la sal.

Antes de la experiencia los animales fueron vacunados contra linfadenitis, basquilla, y septicemia hemorrágica, así como desparasitados con ivermectina y levamisol. Las revacunaciones y desparasitaciones periódicas se hicieron coincidir al término de cada uno de los tres períodos de congelación de los que constó la experiencia.

Una ración media diaria basada en 1.060 gr. de maíz, 490 gr. de gránulos de alfalfa deshidratada y 275 gr. de salvado, se repartía en dos tomas diarias, y se complementaba con forraje y suplemento vitamínico-mineral.

3. 2. SITUACIÓN GEOGRÁFICA Y CONDICIONES CLIMÁTICAS

La experiencia se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (Arucas, Las Palmas), a 28° N, 15° O y 100 m sobre el nivel del mar.

Las condiciones climáticas de la zona se resumen en la Tabla 3 y Figuras 4 y 5, destacando una temperatura media diaria que ronda los 14,5-31,5°C, una mínima absoluta de 8,5°C, una máxima absoluta de 35,5°C, una humedad relativa del 21-97% y una duración del día que oscilaba en torno a las 10,5-14 horas a lo largo del año.

3. 3. MÉTODO Y FRECUENCIA DE RECOGIDA

Tabla 3. Condiciones meteorológicas bajo las cuales se desarrolló la experiencia por estaciones. Medias y rangos.

Estación	Temperatura				Humedad relativa	Duración del día
	Máxima	Mínima	Media	Diferencia		
Primavera 96	20,9 °C (17,0-29,0)	15,3 °C (12,0-19,0)	18,1 °C (14,5-22,3)	5,5 °C (2,5-15,0)	82% (50-93)	13,0 h (12,1-13,9)
Verano 96	24,5 °C (21,5-29,0)	19,2 °C (16,5-24,0)	21,9 °C (19,8-26,3)	5,3 °C (2,5-9,7)	79% (54-93)	13,0 h (13,9-12,1)
Otoño 96	25,3 °C (18,5-35,5)	21,1 °C (15,0-27,5)	23,2 °C (16,8-31,5)	4,1 °C (2,0-9,5)	76% (40-97)	11,3 h (12,1-10,4)
Invierno 97	22,0 °C (12,0-29,0)	16,1 °C (8,5-23,0)	19,0 °C (10,3-25,0)	5,8 °C (1,0-13,5)	74% (21-93)	11,3 h (10,4-12,1)
Primavera 97	17,7 °C (17,0-19,0)	14,0 °C (13,0-15,0)	15,9 °C (15,0-17,0)	3,6 °C (2,5-4,0)	89% (82-94)	13,0 h (12,1-13,9)

Estos valores meteorológicos han sido facilitados por el Instituto Nacional de Meteorología. Prohibida su reproducción total o parcial por cualquier medio

Figura 4. Medias mensuales de las temperaturas máxima (□), mínima (□) y media (□) diarias, y diferencia diaria de temperatura (□) en °C.

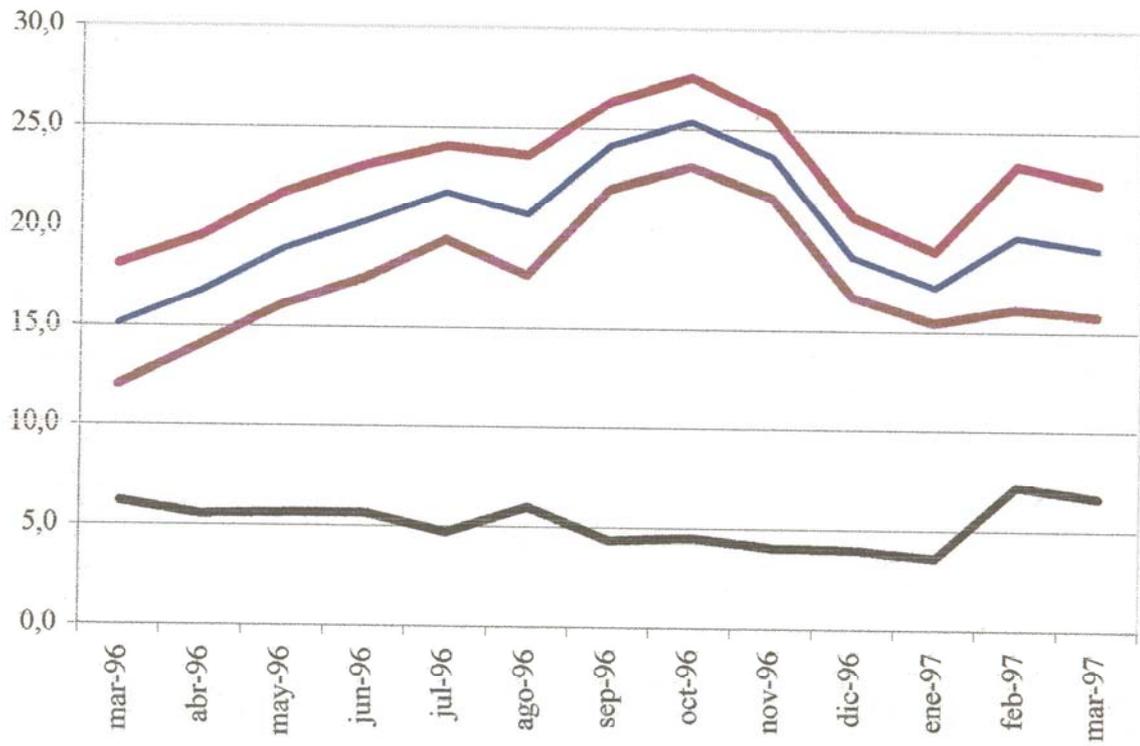
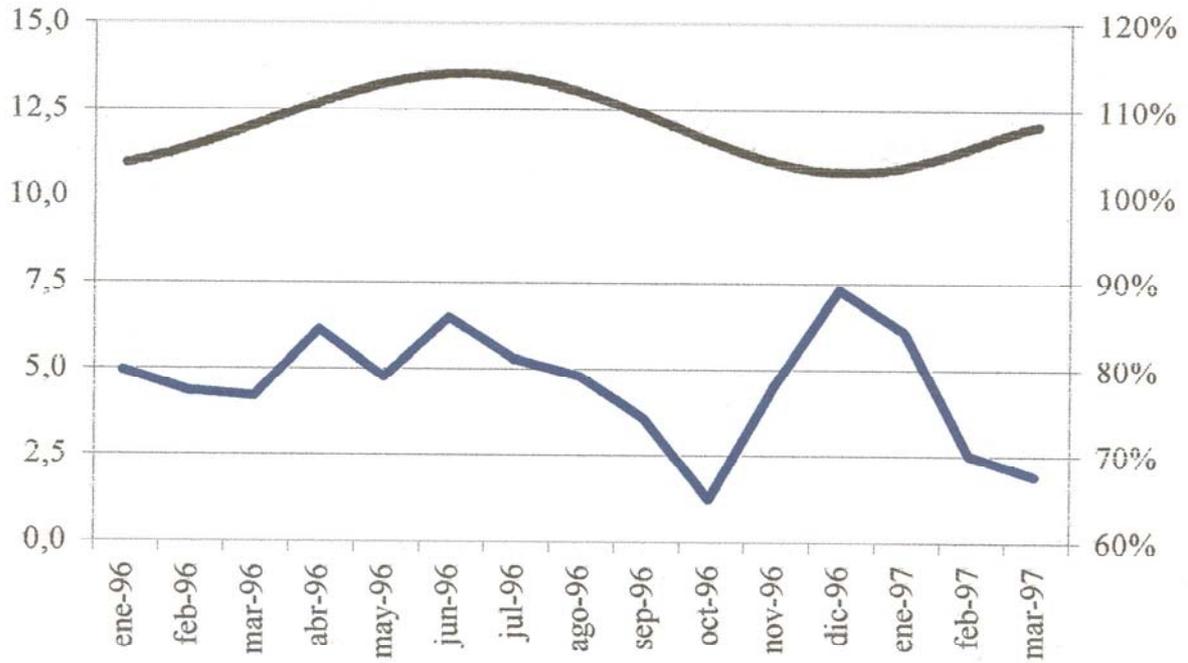


Figura 5. Medias mensuales de la duración del día en horas (□, escala izquierda) y la humedad relativa diaria en porcentaje (□, escala derecha).



Se recogió semen dos veces por semana durante 14 meses consecutivos, desde abril de 1996 a mayo de 1997 ambos incluidos.

El semen era obtenido mediante vagina artificial IMV (Instruments de Médecine Vétérinaire, Francia) a 40-42°C, que se conservaba en una estufa hasta el momento de la recogida. La vagina con su cono y tubo colector graduado contaban con una doble protección de cuero y algodón, para conservar mejor el calor de la vagina y proteger al semen de la luz y las variaciones térmicas.

Para la monta se empleó a una hembra ovariectomizada y estrogezada, debidamente inmovilizada para facilitar la tarea de recolección.

Durante la sesión de recogida, si el volumen eyaculado era menor de 0,5 ml, se procedía a una segunda recogida y se mezclaban los dos eyaculados. La sesión de recogida se consideraba concluida si transcurridos 5 minutos el macho no mostraba interés alguno por la hembra.

3. 4. CONTRASTACIÓN SEMINAL

Los tubos colectores conteniendo semen, se depositaban en un baño María a 37°C, evaluando en ese mismo momento el volumen eyaculado (VE). A continuación se hallaba su concentración (Cc), motilidad individual progresiva (MIPF), número de espermatozoides por eyaculado (NEE) y número de espermatozoides móviles por eyaculado (NEME).

El volumen eyaculado (VE) se midió a través de la graduación presentada al efecto en el tubo colector.

Antes del comienzo de la experiencia se calibró un espectrofotómetro Micro-Reader I modelo 4025-080 de IMV, y semanalmente era comprobado con recuentos simultáneos al hemocitómetro. Con dicho espectrofotómetro se determinaba la concentración (Cc) de la muestra de semen, diluyendo ésta a razón de 1:400 en solución salina formolada al 0,3% (Tabla 4), y midiendo su absorbancia (Abs) pasados 5 minutos desde la dilución y el llenado de las cubetas (M.A.P.A., 1985). La fórmula obtenida por regresión tras la calibración del espectrofotómetro y que fue empleada para hallar la concentración fue:

$$Cc = Abs \cdot 1,2699 \cdot 10^9 + 6,0870 \cdot 10^8$$

El recuento de espermatozoides mediante el hemocitómetro se realizó también diluyendo previamente el semen a razón de 1:400 en solución salina formolada al 0,3%, y llenando la cámara por capilaridad. El número de espermatozoides observado en una superficie de $0,2 \text{ mm}^2$ (80 cuadros pequeños de $0,0025 \text{ mm}^2$ cada uno y distribuidos en 5 cuadros mayores), era multiplicado por 20.050.000 para obtener la concentración en espermatozoides por mililitro, teniendo en cuenta la dilución realizada (1/401) y el volumen cubierto con el recuento ($0,2 \text{ mm}^2 \cdot 0,1 \text{ mm}$ de altura = $0,02 \text{ mm}^3$).

Tabla 4. Solución salina formolada al 0,3% utilizada para hallar la concentración (Cc)

NaCl	9 g
dH ₂ O	hasta 1000
Solución de formaldehído al 35-40%	8,5 ml

La **motilidad individual progresiva (MIPF)** se analizó tras hallar la concentración de los eyaculados, diluyendo una muestra de semen a razón de 1:60–1:100 en solución salina (0,9% NaCl) a 37°C, y observando una gota de dicha solución entre portaobjetos y cubreobjetos también a 37°C, mediante un microscopio Olympus BH2-NIC-2 de contraste de interferencia diferencial (DIC) o Nomarski a 100-400 aumentos. Portaobjetos y cubreobjetos eran mantenidos a 37°C mediante una placa calefactora Minitüb GmbH HT 200 que calentaba a su vez la pletina del microscopio.

El **número de espermatozoides por eyaculado (NEE)** se calculó mediante la multiplicación simple del volumen eyaculado y la concentración.

$$NEE = VE \cdot Cc$$

El **número de espermatozoides móviles por eyaculado (NEME)** fue calculado mediante el producto del número de espermatozoides por eyaculado y la motilidad individual progresiva.

$$\text{NEME} = \text{NTE} \cdot \text{MIPF}$$

3. 5. CONGELACIÓN DEL SEMEN

Se congeló semen durante tres períodos de nueve semanas cada uno, y separados entre sí por otras nueve semanas según el siguiente esquema:

Primer período: del **07-05-96** al **09-07-96** (primavera-verano)

Segundo período: del **10-09-96** al **12-11-96** (verano-otoño)

Tercer período: del **14-01-97** al **18-03-97** (invierno)

Entre esos períodos, los machos seguían siendo sometidos al mismo ritmo de dos recogidas por semana y su semen analizado, pero no congelado.

3. 5. 1. DILUYENTES

La experiencia testaba 4 diluyentes diferentes, según consta en la Tabla 5: el primero de ellos a base de leche desnatada en polvo (L), y los otros 3 a base de Tris (hidroximetil) aminometano (T-1.5, T-6 y T-12), diferenciándose estos últimos básicamente en la proporción de yema de huevo contenida (1,5%, 6% o 12% respectivamente).

3. 5. 2. "LAVADO" DE LOS ESPERMATOZOIDEOS

El semen, cuando el método lo exigía, era diluido a 37°C hasta los 10 ml en una solución de "lavado" SL (Tabla 6) o T (Tabla 7) según se fuera a diluir a continuación en leche o Tris respectivamente, centrifugado a 700 g durante 15 minutos, y tras ser retirado el sobrenadante, sometido nuevamente al mismo proceso antes de ser diluido.

3. 5. 3. DILUCIÓN

Tabla 5. Composición de cada uno de los diluyentes empleados en la experiencia (por cada 100 ml de diluyente)

	L	T-1.5	T-6	T-12	
Leche	10 g	-	-	-	Fracción no glicerolada
Tris	-	2,984 g	2,847 g	2,666 g	
Yema de huevo	-	1,5 ml	6 ml	12 ml	
Glucosa	0,196 g	0,493 g	0,47 g	0,44 g	
Ácido cítrico	-	1,565 g	1,494 g	1,398 g	
Penicilina	50.000 U.I.	49.250 U.I.	47.000 U.I.	44.000 U.I.	
Estreptomina	50 mg	49,25 mg	47 mg	44 mg	
Leche	8,6 g	-	-	-	Fracción glicerolada
Tris	-	2,74528 g	2,61924 g	2,45272 g	
Yema de huevo	-	1,38 ml	5,52 ml	11,04 ml	
Glucosa	0,16856	0,45356 g	0,4324 g	0,4048 g	
Ácido cítrico	-	1,4398 g	1,37448 g	1,28616 g	
Penicilina	43.000 U.I.	45.310 U.I.	43.240 U.I.	40.480 U.I.	
Estreptomina	43 mg	45,31 mg	43,24 mg	40,48 mg	
Glicerol	14%	8%	8%	8%	

Tabla 6. Solución de lavado (SL) según Corteel (1974)

NaCl al 0,9%	500 ml
KCl al 1,15%	20 ml
CaCl ₂ al 1,22%	15 ml
KH ₂ PO ₄ al 2,11%	2 ml
Tampón fosfato	60 ml
. 3,581 g NaH ₂ PO ₄ 12 H ₂ O	
. 2 ml HCl 1N	
. hasta 100 ml dH ₂ O	
MgSO ₄ 7 H ₂ O al 3,82%	5 ml
Glucosa al 5,34%	22,5 ml

Tabla 7. Solución de lavado (T)

Tris (Hidroximetil) Aminometano	3,029 g
Glucosa	0,500 g
Ácido Cítrico	1,589 g
Penicilina	50.000 UI
Estreptomicina	50 mg
dH ₂ O	hasta 100

La dilución se realizaba a 37°C cuando se prescindía del “lavado” de los espermatozoides, y a temperatura de laboratorio (20-23°C) cuando previamente se había recurrido a dicho “lavado”, según el descenso progresivo de temperatura que iba experimentando el semen diluido en la solución de “lavado” durante la centrifugación.

La primera de las diluciones se llevaba a cabo con la fracción no glicerolada del correspondiente diluyente, hasta alcanzar una concentración de 800 millones de espermatozoides móviles por mililitro. A continuación se añadía a la misma temperatura comentada anteriormente y hasta alcanzar una concentración de $400 \cdot 10^6$ spz/ml, la fracción glicerolada, dividida en tres alícuotas de igual volumen. El tiempo transcurrido entre cada una de las 4 fases de dilución fue de 10 minutos, añadiendo el diluyente glicerolado gota a gota, y resbalando por las paredes del tubo colector donde era procesado el semen.

3. 5. 4. ENVASADO

Se utilizaron pajuelas de 0,5 ml que fueron llenadas a temperatura ambiente con el semen diluido, dejando una cámara de aire de aproximadamente 1 cm de longitud en el extremo abierto de la pajuela para evitar el contacto directo del semen con el sistema de sellado. Para sellar, se utilizó agua y polvo de alcohol de polivinilo, que combinados formaban una pasta *in situ* en el extremo de la pajuela.

3. 5. 5. DESCENSO DE TEMPERATURA

Las pajuelas, llenadas y selladas, se introducían en el cuerpo de un congelador de pajuelas Nicoool LM-10, cuya capacidad aislante permitía un descenso paulatino de temperatura hasta los 5°C en 1,5-2 horas al introducirlo en un frigorífico.

Un termómetro Crison 638 PT con sonda de inmersión introducida a nivel de las pajuelas, monitorizaba el descenso de temperatura en todo momento para verificar las condiciones del proceso.

3. 5. 6. EQUILIBRACIÓN

Tras el descenso de temperatura descrito anteriormente, las pajuelas continuaban en el interior del cuerpo del congelador de pajuelas Nicoool LM-10 durante dos horas más, tiempo durante el cual la temperatura seguía disminuyendo muy lentamente desde los 5 a los 3°C. La Figura 6 muestra el descenso de temperatura desde temperatura ambiente hasta los 4-5°C, así como la registrada durante el período de equilibración.

3. 5. 7. CONGELACIÓN PROPIAMENTE DICHA

Tras el período de equilibración, la base del congelador de pajuelas Nicoool LM-10 se llenaba con el nitrógeno líquido necesario para efectuar la congelación, se introducía en el frigorífico, y sobre ella se montaba el cuerpo del congelador de pajuelas conteniendo suspendidas las mismas, accionando el ventilador que permitía la circulación del vapor de nitrógeno en el interior. El descenso a temperaturas de congelación era monitorizado también mediante el termómetro Crison 638 PT con su sonda introducida en el congelador a la altura de las pajuelas, mostrando la Figura 7 el descenso de temperatura registrado durante el proceso.

3. 6. CONTRASTACIÓN DEL SEMEN DESCONGELADO

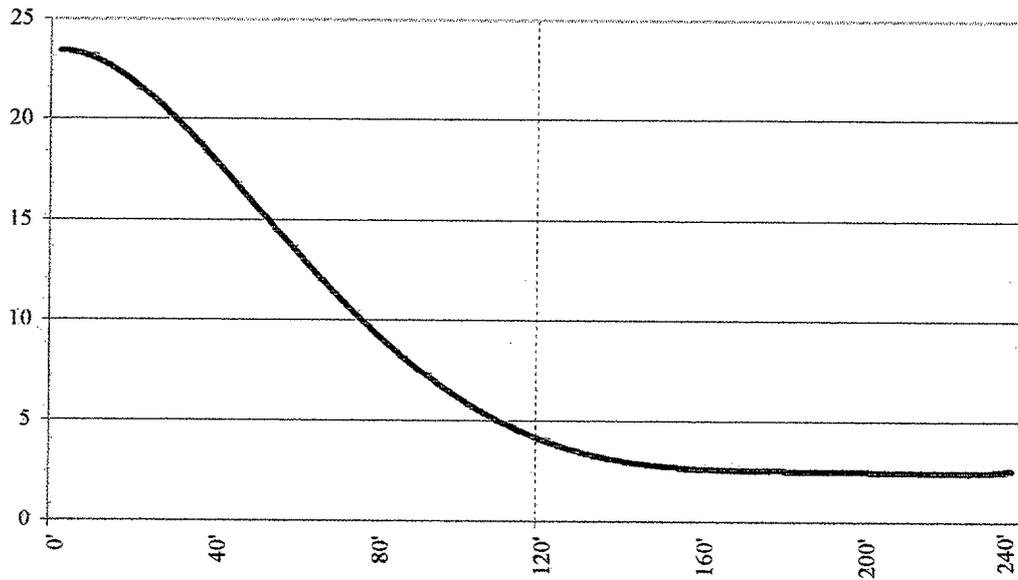
3. 6. 1. DESCONGELACIÓN

A los 2-3 días, los 2 meses y los 6 meses, se realizaban las tres descongelaciones previstas para cada lote de pajuelas, con el objetivo de comparar la efectividad de los distintos procedimientos de congelación evaluados, a corto y medio plazo.

La descongelación se realizaba en un baño María a 37°C durante 30 segundos, en un descongelador de pajuelas IMV-France. Tras la descongelación, la pajuela era secada para evitar que penetrara agua en el interior al abrirla, y su contenido vertido en un tubo de ensayo introducido en un baño María a 37°C.

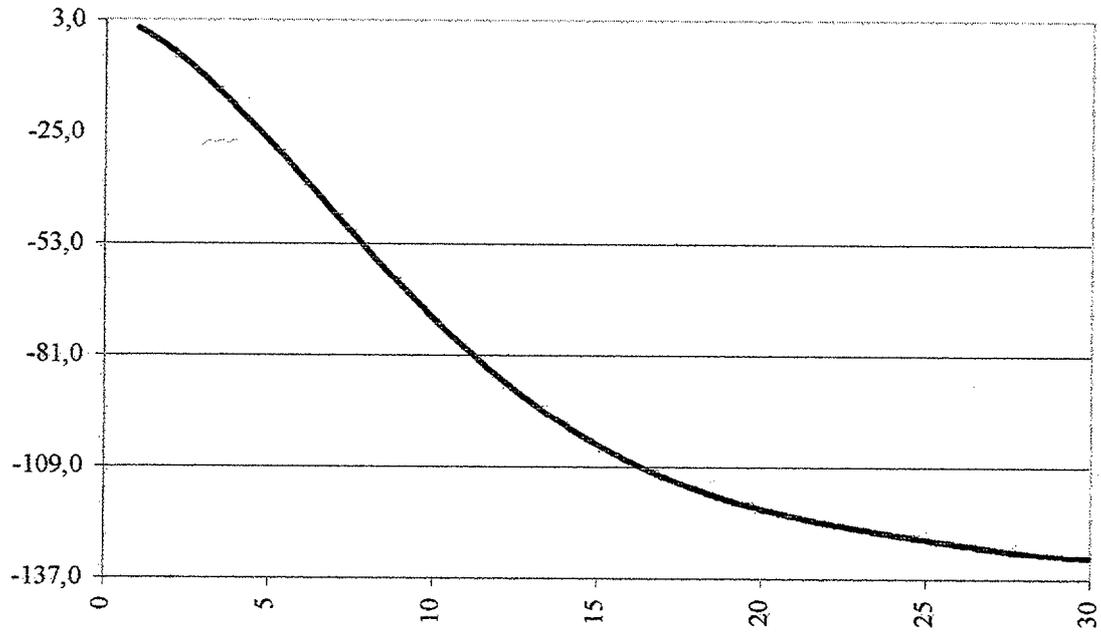
3. 6. 2. MOTILIDAD INDIVIDUAL PROGRESIVA TRAS LA DESCONGELACIÓN (MIPD)

Figura 6. Disminución gradual de temperatura sufrido por las pajuelas desde temperatura de laboratorio hasta temperaturas de refrigeración, y durante el período de equilibración.



En ordenadas, temperatura en grados centígrados. En abscisas, el tiempo en minutos.

Figura 7. Descenso de temperatura experimentado por las pajuelas durante la congelación propiamente dicha.



En ordenadas, temperatura en grados centígrados. En abscisas, el tiempo en minutos.

Descongelado el semen, se analizaba en primer lugar la motilidad individual progresiva de la misma forma descrita para el semen fresco, con la salvedad de que la dilución efectuada era menor (1:5-1:10), dada la menor concentración de éste. A continuación se procedía a analizar el porcentaje de espermatozoides vivos, y el de espermatozoides con acrosoma normal, según se describe a continuación:

3. 6. 3. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDEOS VIVOS (PEV)

El porcentaje de espermatozoides vivos se analizó mediante tinción con los colorantes eosina y nigrosina en la proporción descrita en la Tabla 8, mezclando sobre un portaobjetos a 37°C una gota de 4-5 mm de diámetro de dicha solución (mantenida a su vez en el baño María a 37°C), con otra de 5-6 mm de diámetro del semen descongelado diluido en solución salina y también mantenido en el baño María a 37°C. Una vez mezcladas ambas gotas, se realizaba una extensión con ayuda de otro porta que se deslizaba sobre el primero con un ángulo de 30-40°, se secaba rápidamente al aire, y se observaba al microscopio óptico a 400 aumentos. Los espermatozoides que mostraran algún indicio de coloración rosada en su estructura eran considerados como muertos, y los que se presentaban totalmente blancos, como vivos. Se contaba un mínimo de 100 espermatozoides en total, y se hallaba el correspondiente porcentaje.

Tabla 8. Tinción empleada para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos, según Blom (tomado de Barth y Oko, 1989)

Eosina B azulada	1 g
Nigrosina	8 g
dH ₂ O	hasta 100 ml

3. 6. 4. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDEOS CON ACROSOMA NORMAL (PEAN)

A 37°C, una gota de 2-3 mm de diámetro de semen diluido se mezclaba en un portaobjetos con otra del mismo tamaño de una solución de glutaraldehído en PBS (composición descrita en la Tabla 9), se aplicaba un

cubreobjetos, y se observaba a 1000 aumentos con el objetivo de inmersión, mediante un microscopio Olympus BH2-NIC-2 de contraste de interferencia diferencial (DIC). Se contaba un mínimo de 100 espermatozoides de cada muestra, distinguiendo entre espermatozoides con acrosoma normal y aquellos que presentaban alguna alteración de cualquier tipo en su estructura acrosómica.

3. 7. DISEÑO DE LA EXPERIENCIA

Durante los períodos de nueve semanas en los cuales se congelaba semen (18 sesiones de recogida), 6 sesiones se destinaban a congelar el semen obtenido centrifugándolo previamente con la solución SL (Tabla 6) empleada por Corteel en 1974, y utilizando el diluyente L (Tabla 5) a base de leche desnatada. En otras 6 sesiones de recogida, el semen se congeló “lavándolo” con la solución T (Tabla 7), y diluyendo en T-1.5, T-6 o T-12 (Tabla 5). Y en las 6 restantes, se procedía como en este último caso, pero prescindiendo el “lavado” antes de la dilución. En resumen, se congeló semen bajo 7 procedimientos diferentes que se resumen en la Tabla 10.

Tabla 9. Solución de glutaraldehído en PBS (tomado de Barth y Oko, 1989).

Solución NaH ₂ PO ₄ al 0,8%	30 ml
Solución Na ₂ HPO ₄ al 0,947%	70 ml
NaCl	0,450 g
Solución acuosa de glutaraldehído al 25%	1,6 ml

3. 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.8.1. SEMEN FRESCO

Para estudiar la evolución de los distintos parámetros seminales a lo largo del año en el semen fresco se realizó un análisis de varianza mediante el programa SPSS 7.5, en el que se incluían los factores macho (M=7), estación y año (E=5) y mes dentro de estación (mE=3). Los valores de

Tabla 10. Métodos de congelación y abreviaturas empleadas

Diluyente	L	T-1,5	T-6	T-12	T-1,5	T-6	T-12
“Lavado”	+	+	+	+	-	-	-
Solución de “lavado”	SL	T	T	T	-	-	-
Proporción de yema de huevo*	-	1,50%	6%	12%	1,50%	6%	12%
Concentración final de glicerol	7%	4%	4%	4%	4%	4%	4%
Abreviatura del método	LL	TL-1.5	TL-6	TL-12	TX-1.5	TX-6	TX-12

* En la fracción no glicerolada del diluyente

motilidad individual progresiva (MIPF), por tratarse de porcentajes, fueron sometidos antes a una transformación arcossénica según la fórmula:

$$\theta = a \operatorname{sen} \sqrt{p}$$

... donde θ es la nueva variable fruto de la transformación y p sería el porcentaje de motilidad.

La significación entre las distintas medias se halló mediante el test de Scheffe incluido en el mismo programa.

Se hallaron también mediante el mismo programa, correlaciones entre cada uno de los parámetros estudiados en el semen fresco y las condiciones ambientales del día de la recogida referidas a temperatura máxima, mínima y media, diferencia diaria de temperatura, humedad relativa y fotoperíodo, o las condiciones ambientales medias de los 3, 10, 30, 45, 60, 75 y 90 días antes de la recogida.

3. 8. 2. SEMEN DESCONGELADO

Como todas las variables analizadas en el semen descongelado eran expresadas en forma de porcentajes, todas ellas fueron sometidas a la misma transformación arcossénica descrita en el apartado anterior, para posteriormente ser estudiadas a través de otro análisis de varianza con el mismo programa (SPSS 7.5), usando esta vez como factores de variación el macho ($M=7$), el método de congelación ($Mt=7$), la época del año en que fue recogido y congelado el semen ($E=3$) y el tiempo de conservación ($tC=3$). La significación entre las medias se calculó igualmente mediante el test de Scheffe incluido en el mismo programa.

Tabla 11. Productos

Ácido cítrico anhidro	Sigma
Calcio Cloruro ($\text{CaCl}_2 \cdot 3^{1/2} \text{H}_2\text{O}$ aprox.)	Probus, S.A.
D(+)-Glucosa anhidra PA	Panreac
Eosina Azulada	Panreac
Formaldehído, solución al 35-40%	Riser, S.A.
Glicerina PA	Panreac
Glutaraldehído, solución acuosa al 25%	Sigma
Leche de vaca desnatada en polvo	Regilait
Magnesio Sulfato ($\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Probus, S.A.
Nigrosina soluble en agua	Sigma
Penicilina-Estreptomicina (Veterin-Micipen)	Hoechst-Roussel
Potasio di-Hidrógeno Fosfato (KH_2PO_4) PA	Panreac
Potasio Cloruro (KCl)	Panreac
Sodio Cloruro (NaCl)	Panreac
Sodio Fosfato Monobásico anhidro (NaH_2PO_4)	Sigma
di-Sodio Hidrógeno Fosfato 12 hidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	Panreac
di-Sodio Hidrógeno Fosfato anhidro (Na_2HPO_4) PRS	Panreac
Tris (Hidroximetil) Aminometano PA	Panreac

Tabla 12. Aparatos empleados

Microscopio Olympus, BH2-NIC-2
Sistema calefactor Minitüb GmbH, HT 200
Baño-María Selecta, Tectrón
Baño-María Selecta, Percistern
Espectrofotómetro IMV, Micro-Reader I
Descongelador de pajuelas IMV-France
Centrífuga Kubota 5100
Balanza de Precisión Cobos CM-360-SX
Agitador de tubos Heidolph REAX 2000
Agitador magnético Selecta, Agimatic-N
pH-metro de membrana Hanna Instruments, HI 8314
Estufa de desecación Selecta, Conterm
Termómetro Crison, 638 Pt
Criocontenedor MVE, XC 47/11-10
Criocontenedor Taylor Wharton 18 HC
Criocontenedor Taylor Wharton 10 HC

4. RESULTADOS

4. 1. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL SEMEN FRESCO

4. 1. 1. CARACTERÍSTICAS SEMINALES

El semen recogido a lo largo de la experiencia se caracterizó por un volumen eyaculado medio de 1,57 ml, una concentración espermática de $3,447 \cdot 10^9$ spz/ml, una motilidad individual progresiva del 65,0 %, $5,422 \cdot 10^9$ espermatozoides por eyaculado y $3,573 \cdot 10^9$ espermatozoides móviles por eyaculado.

4. 1. 2. ANÁLISIS DE VARIANZA

El ANOVA reveló un efecto significativo de la estación y año (E) sobre todos los parámetros estudiados en el semen íntegro (VE: $p < 0,01$, Cc: $p < 0,01$, MIPF: $p < 0,025$, NEE: $p < 0,01$ y NEME: $p < 0,01$). El efecto del animal (M) fue significativo sobre todas las variables estudiadas ($p < 0,01$) excepto motilidad individual progresiva (MIPF). El mes dentro de estación (mE) sólo influyó significativamente sobre el volumen eyaculado, la concentración espermática y el número de espermatozoides por eyaculado (VE: $p < 0,01$, Cc: $p < 0,01$ y NEE: $p < 0,025$). Una interacción macho-estación (M-E) se hizo patente en todos los casos ($p < 0,01$) excepto en el de la motilidad (MIPF, $p < 0,072$). Las Tablas 13-15 y las Figuras 8-17 muestran los resultados obtenidos a lo largo de la experiencia, según la estación (Tabla 13, Figuras 8-12), el mes de recogida (Tabla 14, Figuras 13-17) y el macho (Tabla 15).

4. 1. 3. EVOLUCIÓN A LO LARGO DEL AÑO

Como puede apreciarse en la Tabla 13 y las Figuras 8-12, la producción seminal, entendida como volumen eyaculado (VE), número de espermatozoides por eyaculado (NEE) y número de espermatozoides móviles por eyaculado (NEME), se incrementó de forma continuada a lo largo de toda la experiencia, desde la primavera de 1996 a la primavera de 1997. La concentración espermática (Cc), por el contrario, declinó desde la primavera de 1996 hasta el otoño y volvió a incrementarse hasta la primavera siguiente. La motilidad individual progresiva (MIPF) se mantuvo constante a lo largo de las tres primeras estaciones, se incrementó ligeramente en invierno, y registró sus valores mínimos a la primavera

Tabla 13. Características del semen recogido en las distintas estaciones (medias \pm SD)

Estación	VE (ml)	Cc ($\cdot 10^9$ /ml)	MIPF (%)	NEE ($\cdot 10^9$)	NEME ($\cdot 10^9$)
Primavera 96	0,89 \pm 0,49 ^a	4,080 \pm 1,301 ^c	65,6 \pm 16,0 ^b	3,622 \pm 2,283 ^a	2,389 \pm 1,583 ^a
Verano 96	1,36 \pm 0,59 ^b	3,351 \pm 0,927 ^{ab}	65,5 \pm 15,9 ^b	4,686 \pm 2,435 ^b	3,099 \pm 1,738 ^b
Otoño 96	1,75 \pm 0,77 ^c	3,056 \pm 0,804 ^a	65,4 \pm 13,7 ^{ab}	5,583 \pm 3,176 ^c	3,702 \pm 2,123 ^{bc}
Invierno 97	1,85 \pm 0,88 ^{cd}	3,423 \pm 0,874 ^b	68,1 \pm 12,1 ^b	6,435 \pm 3,708 ^c	4,290 \pm 2,4423 ^{cd}
Primavera 97	2,01 \pm 1,25 ^d	3,503 \pm 0,978 ^b	59,7 \pm 16,3 ^a	6,934 \pm 4,423 ^d	4,449 \pm 3,041 ^d
Media	1,57 \pm 0,89	3,447 \pm 1,020	65,0 \pm 15,0	5,422 \pm 3,414	3,573 \pm 2,311

VE: volumen eyaculado. **Cc:** concentración de espermatozoides en el eyaculado. **MIPF:** motilidad individual progresiva. **NEE:** número de espermatozoides por eyaculado. **NEME:** número de espermatozoides móviles por eyaculado.

Diferentes letras en la misma columna indica diferencia significativa ($p < 0,05$).

Figura 8. Volumen eyaculado (VE) a lo largo de la experiencia, por estaciones (ml). Medias \pm SD.

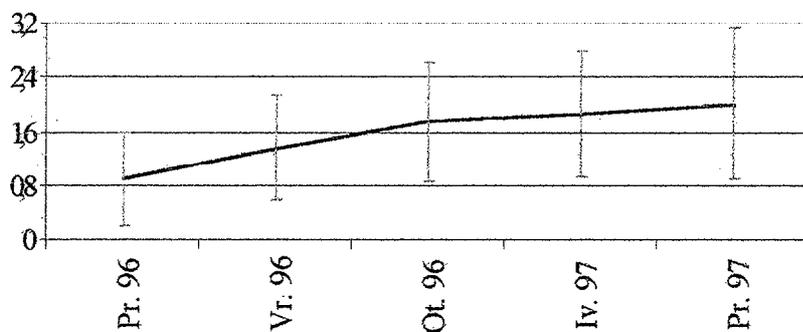


Figura 9. Concentración espermática (Cc) a lo largo de la experiencia, por estaciones ($\cdot 10^9$ /ml). Medias \pm SD.

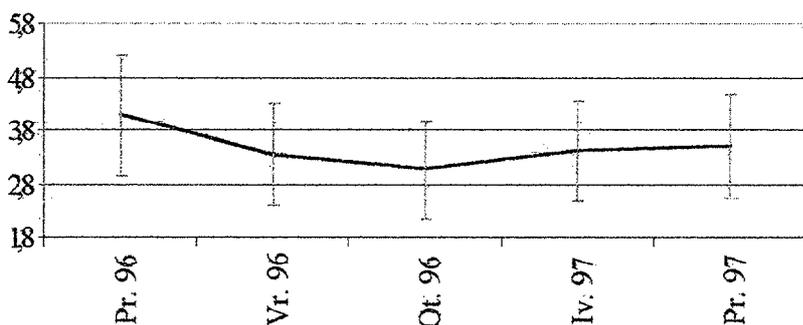


Figura 10. Motilidad individual progresiva (MIPF) a lo largo de la experiencia, por estaciones (%). Medias \pm SD.

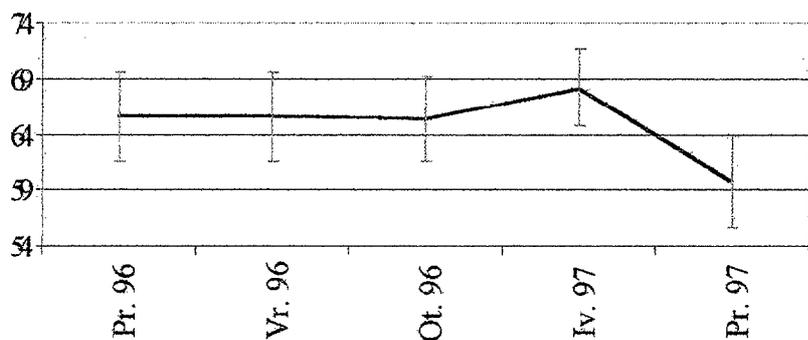


Figura 11. Número de espermatozoides por eyaculado (NEE) a lo largo de la experiencia, por estaciones ($\cdot 10^9$). Medias \pm SD.

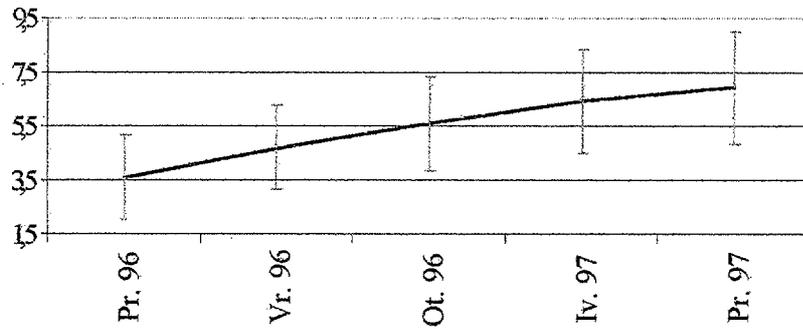


Figura 12. Número de espermatozoides móviles por eyaculado (NEME) a lo largo de la experiencia, por estaciones ($\cdot 10^9$). Medias \pm SD.

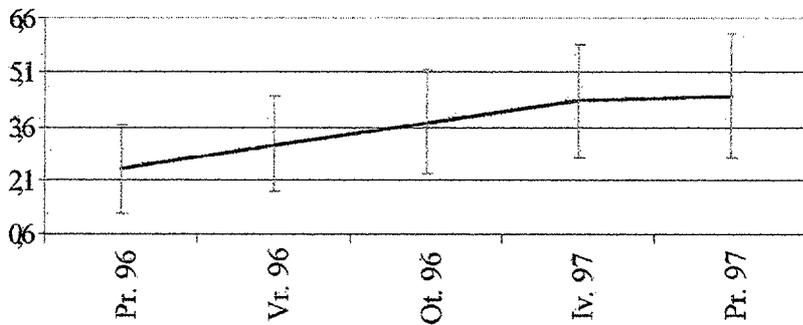


Tabla 14. Características del semen recogido durante los distintos meses.

Mes	VE (ml)	Cc ($\cdot 10^9$ /ml)	MIPF (%)	NEE ($\cdot 10^9$)	NEME ($\cdot 10^9$)
Abril 96	0,76 ^a	4,918 ^d	66,40 ^{ab}	3,735 ^{ab}	2,447 ^a
Mayo 96	0,85 ^a	4,030 ^c	65,98 ^{ab}	3,506 ^a	2,261 ^a
Junio 96	1,16 ^{ab}	3,295 ^{abc}	63,78 ^{ab}	3,949 ^{ab}	2,692 ^{ab}
Julio 96	1,11 ^{ab}	3,538 ^{abc}	66,32 ^{ab}	4,213 ^{abc}	2,856 ^{abc}
Agosto 96	1,46 ^{bc}	3,456 ^{abc}	67,41 ^{ab}	5,176 ^{abcde}	3,450 ^{abcd}
Septiembre 96	1,52 ^{bc}	2,878 ^a	63,72 ^{ab}	4,496 ^{abcd}	2,910 ^{abc}
Octubre 96	1,74 ^{cd}	3,134 ^{ab}	64,93 ^{ab}	5,793 ^{a abcde}	3,763 ^{abcd}
Noviembre 96	1,65 ^{bcd}	2,890 ^a	66,22 ^{ab}	5,035 ^{abcde}	3,365 ^{abcd}
Diciembre 96	2,07 ^d	3,253 ^{ab}	65,99 ^{ab}	6,785 ^{de}	4,498 ^{cd}
Enero 97	1,81 ^{cd}	3,303 ^{abc}	66,46 ^{ab}	6,091 ^{bcde}	3,963 ^{abcd}
Febrero 97	1,92 ^{cd}	3,394 ^{abc}	65,54 ^{ab}	6,564 ^{cde}	4,191 ^{bcd}
Marzo 97	1,83 ^{cd}	3,762 ^{bc}	72,05 ^b	6,836 ^{de}	4,848 ^d
Abril 97	1,86 ^{cd}	3,677 ^{bc}	54,06 ^a	6,965 ^e	4,487 ^{cd}
Mayo 97	2,13 ^d	3,224 ^{ab}	62,34 ^{ab}	6,839 ^{de}	4,226 ^{bcd}
Media	1,57	3,447	65,0	5,422	3,573

VE: volumen eyaculado. **Cc:** concentración de espermatozoides en el eyaculado. **MIPF:** motilidad individual progresiva. **NEE:** número de espermatozoides por eyaculado. **NEME:** número de espermatozoides móviles por eyaculado.

Diferentes letras en la misma columna indica diferencia significativa ($p < 0,05$).

Figura 13. Volumen eyaculado (VE) a lo largo de la experiencia, por meses (ml). Medias \pm SD.

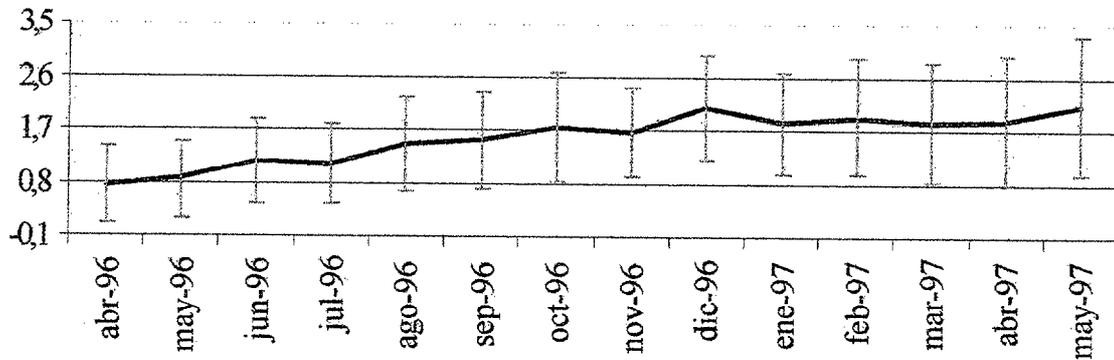


Figura 14. Concentración espermática (Cc) a lo largo de la experiencia, por meses ($\cdot 10^9$ spz/ml). Medias \pm SD.

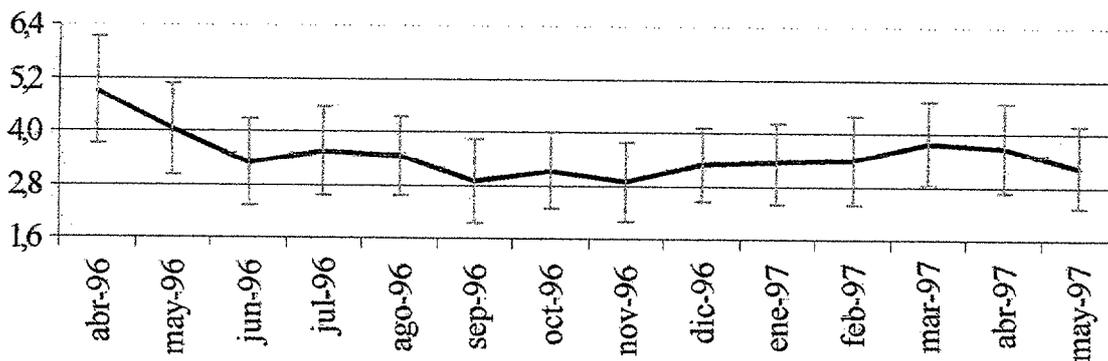


Figura 15. Motilidad individual progresiva (MIPF) a lo largo de la experiencia, por meses (%). Medias \pm SD.

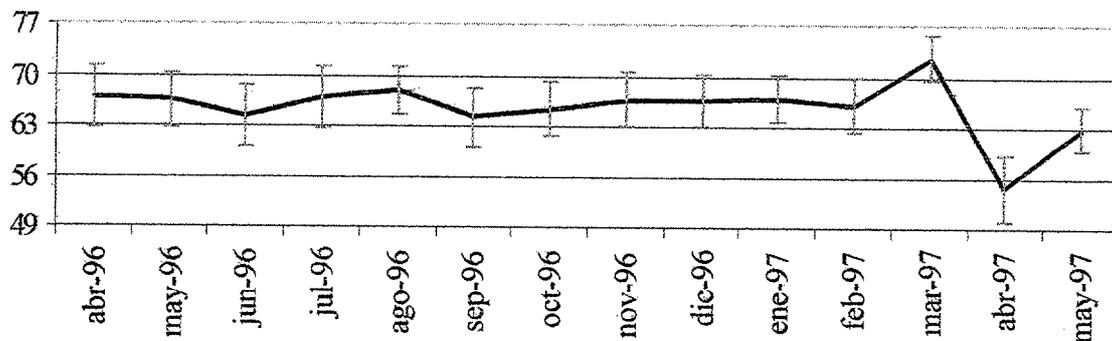


Figura 16. Número de espermatozoides por eyaculado (NEE) a lo largo de la experiencia, por meses ($\cdot 10^9$). Medias \pm SD.

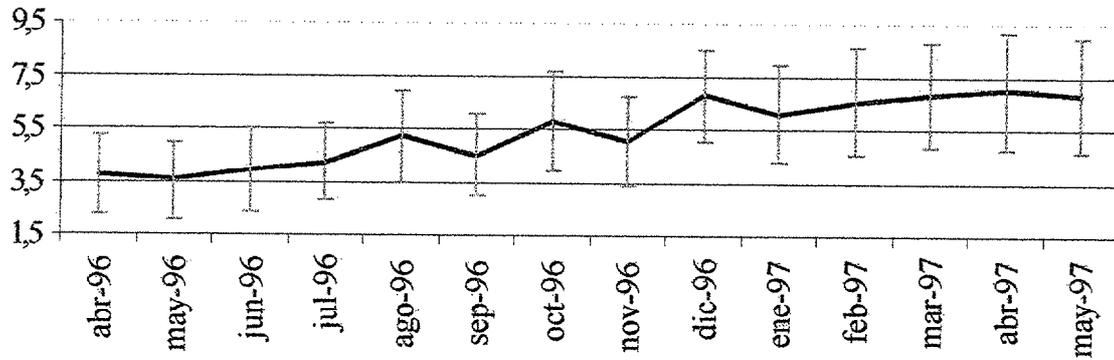


Figura 17. Número de espermatozoides móviles por eyaculado (NEME) a lo largo de la experiencia, por meses ($\cdot 10^9$). Medias \pm SD.

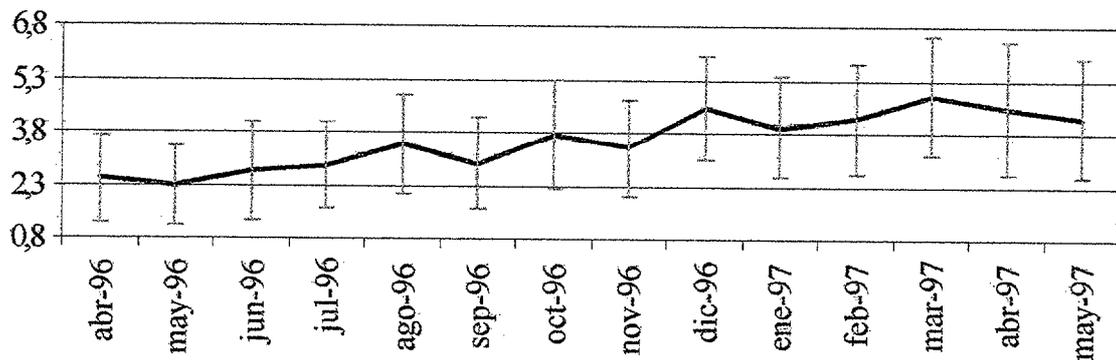


Tabla 15. Características seminales de los machos empleados en la experiencia.

Macho	VE (ml)	Cc ($\cdot 10^9$ /ml)	MIPF (%)	NEE ($\cdot 10^9$)	NEME ($\cdot 10^9$)
A	1,21 ^a	3,043 ^a	62,0 ^a	3,805 ^a	2,521 ^a
B	1,16 ^a	3,342 ^{ab}	63,8 ^a	3,868 ^a	2,461 ^a
C	2,21 ^{bc}	3,489 ^b	64,3 ^a	7,810 ^c	5,076 ^c
D	1,31 ^a	4,664 ^d	66,6 ^a	6,222 ^b	4,051 ^b
E	2,36 ^c	3,974 ^c	64,6 ^a	9,429 ^d	6,128 ^d
F	1,02 ^a	3,348 ^{ab}	67,2 ^a	3,235 ^a	2,246 ^a
G	1,96 ^b	3,080 ^{ab}	66,3 ^a	5,971 ^b	4,025 ^b
Media	1,57	3,447	65,0	5,422	3,573

VE: volumen eyaculado. **Cc:** concentración de espermatozoides en el eyaculado. **MIPF:** motilidad individual progresiva. **NEE:** número de espermatozoides por eyaculado. **NEME:** número de espermatozoides móviles por eyaculado.

Diferentes letras en la misma columna indica diferencia significativa ($p < 0,05$)

siguiente, coincidiendo con la estación más fría, según se puede apreciar en las Tabla 3 y 13, y Figura 10.

4. 1. 4. CORRELACIONES CON LOS FACTORES CLIMÁTICOS

4. 1. 4. 1. Correlaciones con las condiciones climáticas del día de la recogida

La concentración espermática (**Ce**) se mostraba correlacionada significativamente con todos los factores climáticos estudiados excepto la humedad relativa (**HR**), con valores más altos frente a la temperatura (**Tmin**, **Tmax**, **Tmed**, **DT**) que frente al fotoperíodo (**FP**) (Tabla 17 y Figuras 25-31).

La producción seminal, entendida como volumen eyaculado (**VE**), número de espermatozoides por eyaculado (**NEE**) y número de espermatozoides móviles por eyaculado (**NEME**), sólo se correlacionaba significativamente con el fotoperíodo, y en menor medida con la humedad relativa (Tablas 16, 18, 19 y Figuras 18-24 y 32-45).

La motilidad individual progresiva (**MIPF**) no se mostró significativamente correlacionada con ninguno de los factores climáticos controlados (se ha prescindido de su tabla y figuras correspondientes).

4. 1. 4. 2. Correlación con las condiciones climáticas medias de los 3, 10, 30, 45, 60, 75 o 90 días previos a la recogida

Al considerar las condiciones climáticas medias de varios días previos a la recogida, el valor de las correlaciones aumentaba en general conforme más días eran tenidos en cuenta. Así, por ejemplo, en la Tabla 16 y Figuras 18-21, puede apreciarse que el volumen eyaculado (**VE**) estaba más correlacionado con la temperatura media de los 90 días previos a la recogida, que con la del día de la recogida (0) o la de los 3, 10, 30, 45, 60 o 75 días previos a la recogida. Esto se cumplía tanto para la temperatura mínima (**Tmin**, Figura 19), como para la máxima (**Tmax**, Figura 18), la media (**Tmed**, Figura 20) o la diferencia diaria de temperatura (**DT**: **Tmax-Tmin**, Figura 21). En el mismo sentido, la humedad relativa media de los 90 días previos a la recogida fue más determinante que la del día de la recogida o los 3, 10, 30, 45, 60 o 75 días previos a la recogida (Figura 23),

mientras que en cuanto al fotoperíodo, la correlación fue máxima teniendo en cuenta la duración media del día durante los 60 días previos a la recogida (Figura 22). En síntesis, podemos decir, teniendo en cuenta los valores máximos de correlación frente a cada factor climático (señalados en negrita en la Tabla 16), que el volumen eyaculado se correlacionó más con la temperatura que con el fotoperíodo o la humedad relativa, y en mayor medida, con la diferencia diaria de temperatura que con la temperatura mínima, máxima o media.

Los valores de correlación observados entre la concentración espermática (Cc) y cada uno de los factores climáticos considerados, se muestran en la Tabla 17 y Figuras 25-31, donde se puede apreciar, en el mismo sentido, una mayor correlación con la temperatura que con el fotoperíodo o la humedad relativa (valores máximos resaltados en negrita), pero siendo más determinante la temperatura mínima registrada durante los 75 días previos a la recogida que la diferencia diaria de temperatura observada durante ese mismo período.

El número de espermatozoides por eyaculado (NEE) y el número de espermatozoides móviles por eyaculado (NEME), en la misma línea que el volumen eyaculado (VE), estuvieron más correlacionados con la temperatura y el fotoperíodo que con la humedad relativa. Los mayores valores de correlación se obtuvieron frente a la media de la diferencia diaria de temperatura durante los 90 días previos a la recogida, la temperatura mínima, media y máxima, en se orden; a continuación, la duración media del día durante ese mismo período de tiempo, y la media de la humedad relativa durante los 30 días previos a la recogida. En las Tablas 18 y 19 y Figuras 32-45 puede consultarse el valor de cada una de las correlaciones, habiéndose resaltado en negrita las más altas con respecto a cada factor climático considerado.

La motilidad individual progresiva (MIPF), al igual que ocurriera con las condiciones climáticas del mismo día de la recogida, no se mostró significativamente correlacionada con las condiciones climáticas medias de varios días previos a la recogida, por lo que se ha prescindido de su tabla y figuras asociadas correspondientes.

4. 1. 5. CORRELACIONES CON LA EDAD DE LOS MACHOS

Tabla 16. Correlaciones entre volumen eyaculado (VE) y las condiciones climáticas del día de la recogida (0) o la media de los 3, 10, 30, 45, 60, 75 y 90 días previos a la recogida.

	0	3	10	30	45	60	75	90
Tmin	0,0772 ns	0,0847 *	0,1026 *	0,1846 **	0,2461 **	0,2967 **	0,3357 **	0,3744 **
Tmax	0,0535 ns	0,0694 ns	0,0857 *	0,1549 **	0,2051 **	0,2548 **	0,2931 **	0,3379 **
Tmed	0,0692 ns	0,0804 ns	0,0977 *	0,1749 **	0,2304 **	0,2798 **	0,3181 **	0,3595 **
Dt	-0,0246 ns	-0,023 ns	-0,0369 ns	-0,0985 *	-0,1787 **	-0,2633 **	-0,3396 **	-0,3806 **
HR	-0,0957 *	-0,1022 *	-0,1387 **	-0,1552 **	-0,153 **	-0,1518 **	-0,1548 **	-0,1696 **
FP	-0,2251 **	-0,2276 **	-0,2353 **	-0,2512 **	-0,2575 **	-0,2601 **	-0,2598 **	-0,2565 **

Tmin: temperatura mínima. **Tmax:** temperatura máxima. **Tmed:** temperatura media. **dT:** diferencia de temperatura a lo largo del día (Tmax – Tmin). **HR:** humedad relativa. **FP:** fotoperíodo. ns: no significativo. * p<0,05. ** p<0,01

Figuras 18-23. Correlaciones entre volumen eyaculado (VE) y temperaturas máxima (■), mínima (◆) y media (○), diferencia de temperatura a lo largo del día (+), fotoperiodo (*) y humedad relativa (●), del mismo día de la recogida (0), o la media de varios días previos a la recogida. La línea de puntos (···) indica el límite de significación ($p=0,05$).

Figura 18

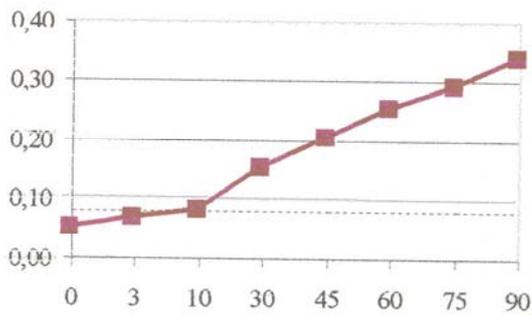


Figura 19

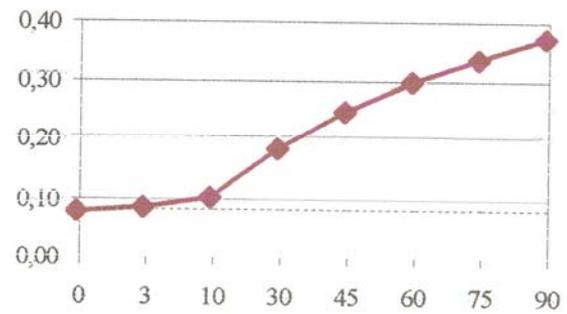


Figura 20

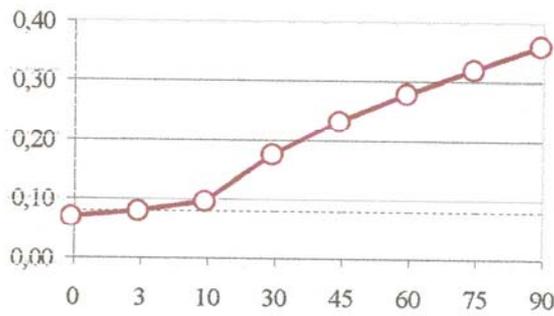


Figura 21

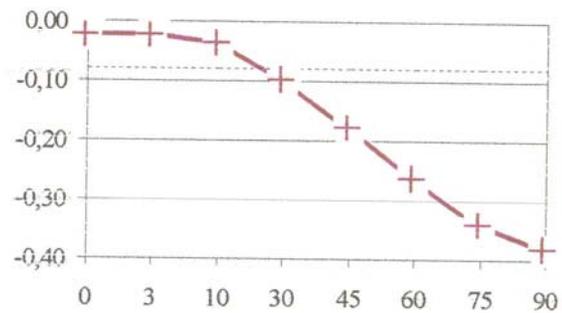


Figura 22

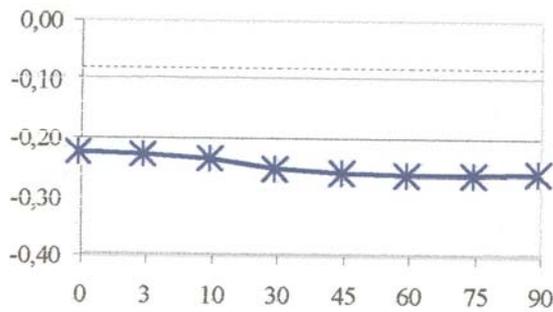


Figura 23

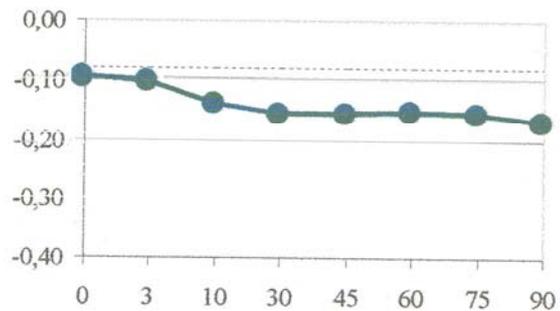


Figura 24. Representación conjunta de las correlaciones habidas entre VE y las condiciones climáticas del mismo día de la recogida (0), o las condiciones climáticas medias de varios días previos a la recogida, así como entre VE y edad de los machos en el momento de la recogida.

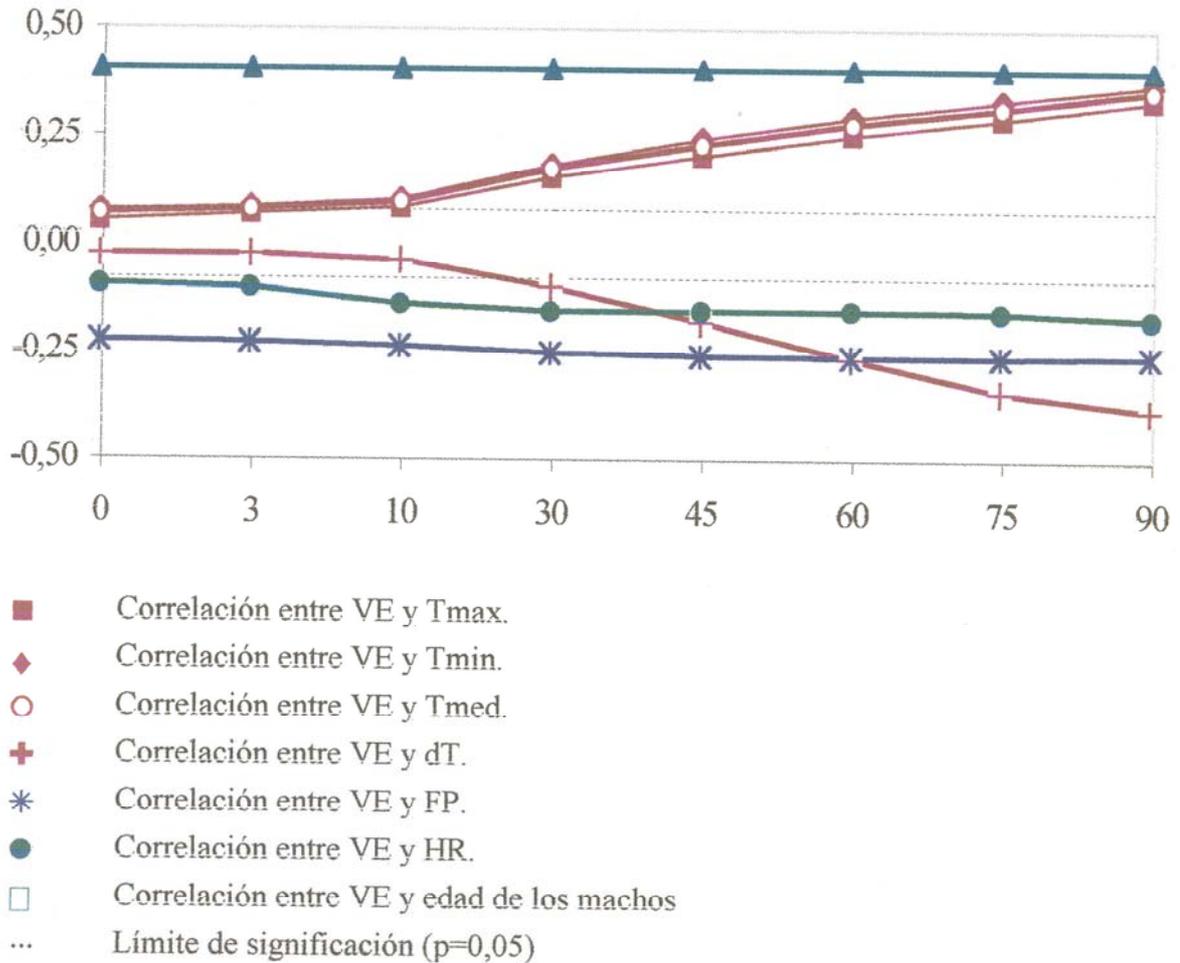


Tabla 17. Correlaciones entre concentración espermática (Cc) y las condiciones climáticas del día de la recogida (0) o la media de los 3, 10, 30, 45, 60, 75 y 90 días previos a la recogida.

	0	3	10	30	45	60	75	90
Tmin	-0,2691 **	-0,2771 **	-0,311 **	-0,3273 **	-0,3561 **	-0,3848 **	-0,3993 **	-0,3936 **
Tmax	-0,1314 **	-0,174 **	-0,2319 **	-0,2587 **	-0,3073 **	-0,3555 **	-0,381 **	-0,3862 **
Tmed	-0,2103 **	-0,2349 **	-0,2818 **	-0,3023 **	-0,3384 **	-0,3746 **	-0,3934 **	-0,3921 **
DT	0,1671 **	0,1679 **	0,1644 **	0,208 **	0,2319 **	0,2647 **	0,2966 **	0,2934 **
HR	0,0227 ns	-0,0357 ns	0,0111 ns	0,0107 ns	0,0432 ns	0,0582 ns	0,0677 ns	0,0731 ns
FP	0,1069 **	0,1046 *	0,0966 *	0,0714 ns	0,0479 ns	0,0214 ns	-0,0081 ns	-0,0386 ns

Tmin: temperatura mínima. **Tmax:** temperatura máxima. **Tmed:** temperatura media. **dT:** diferencia de temperatura a lo largo del día (Tmax – Tmin). **HR:** humedad relativa. **FP:** fotoperíodo. ns: no significativo. * p<0,05. ** p<0,01

Figuras 25-30. Correlaciones entre concentración espermática (Cc) y temperaturas máxima (■), mínima (◆) y media (○), diferencia de temperatura a lo largo del día (+), fotoperiodo (*) y humedad relativa (●), del mismo día de la recogida (0), o la media de varios días previos a la recogida. La línea de puntos (···) indica el límite de significación (p=0,05).

Figura 25

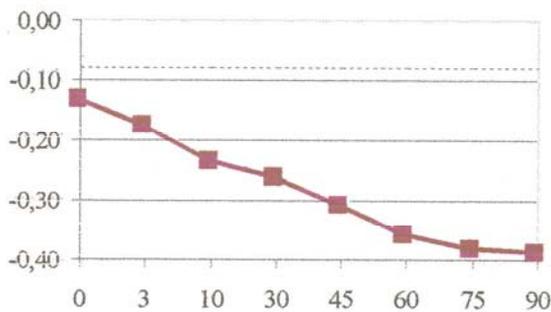


Figura 26

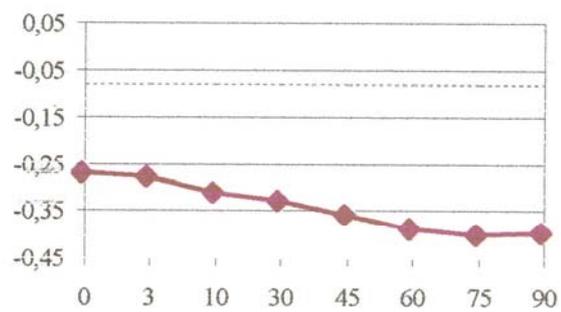


Figura 27

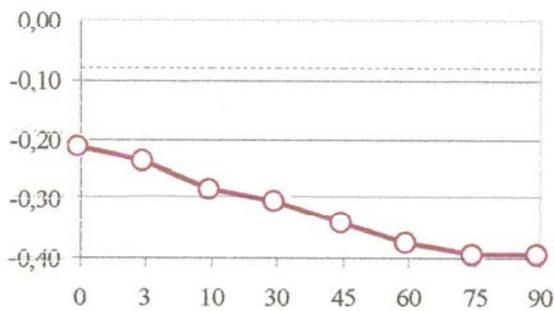


Figura 28

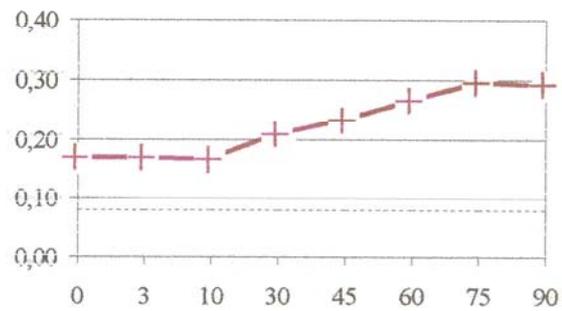


Figura 29

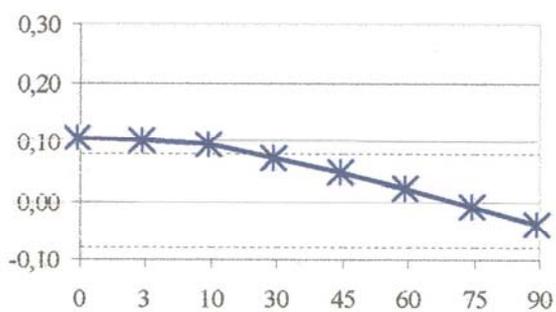


Figura 30

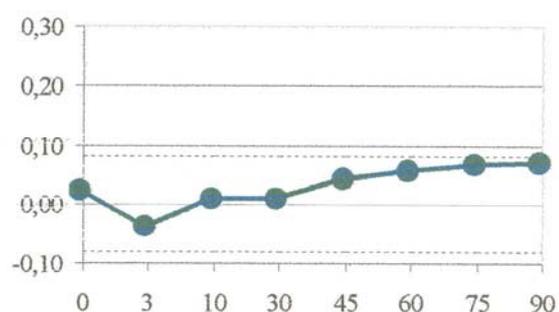


Figura 31. Representación conjunta de las correlaciones habidas entre Cc y las condiciones climáticas del mismo día de la recogida (0), o las condiciones climáticas medias de varios días previos a la recogida, así como entre Cc y edad de los machos en el momento de la recogida.

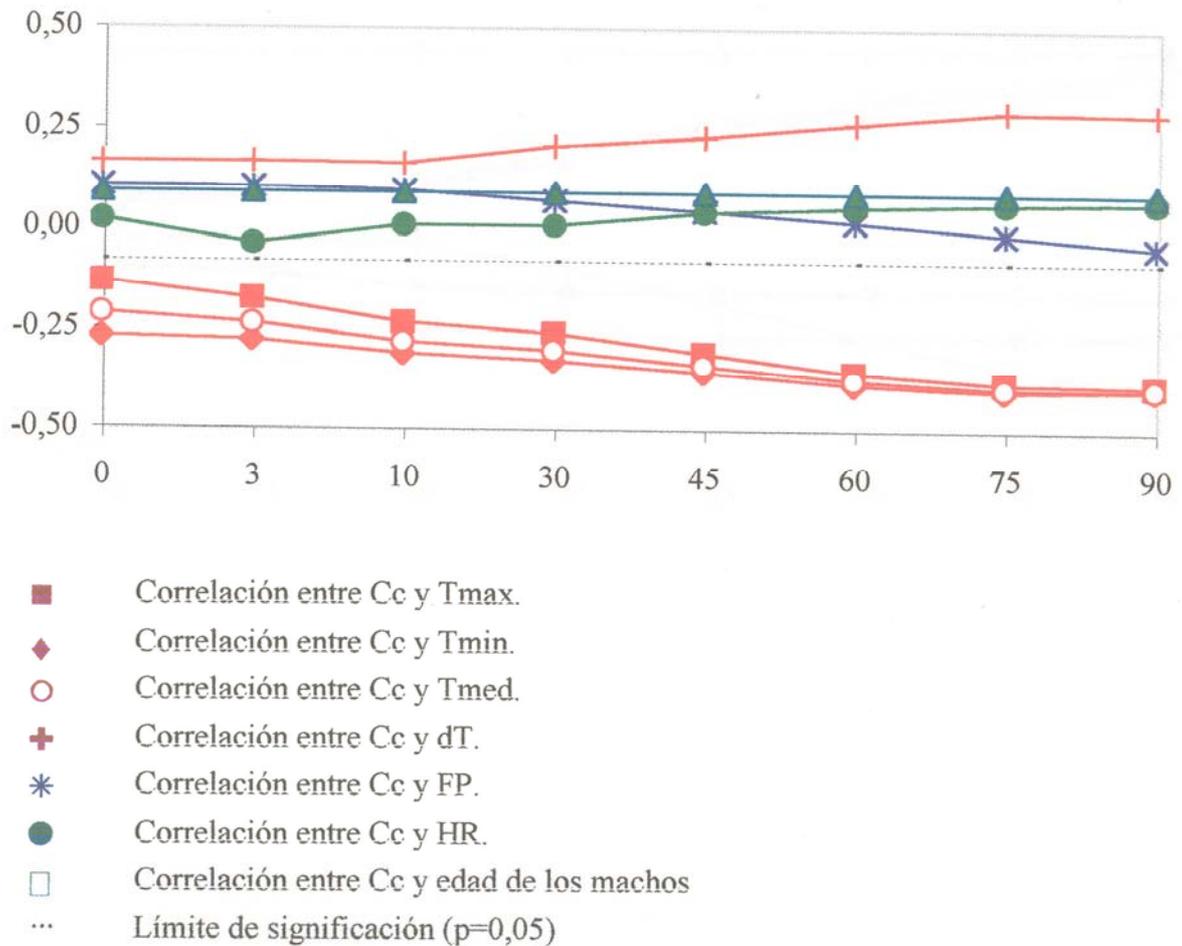


Tabla 18. Correlaciones entre número de espermatozoides por eyaculado (NEE) y condiciones climáticas del día de la recogida (0) o la media de los 3, 10, 30, 45, 60, 75 y 90 días previos a la recogida.

	0	3	10	30	45	60	75	90
Tmin	-0,0112 ns	-0,0044 ns	-0,007 ns	0,0579 ns	0,099 *	0,1273 **	0,1556 **	0,1911 **
Tmax	0,0191 ns	0,0189 ns	0,0125 ns	0,0624 ns	0,0859 *	0,1032 *	0,1255 **	0,1619 **
Tmed	0,005 ns	0,0077 ns	0,0027 ns	0,0616 ns	0,0943 *	0,1172 **	0,1427 **	0,1786 **
DT	0,0433 ns	0,0406 ns	0,0369 ns	-0,0021 ns	-0,0632 ns	-0,1319 **	-0,1919 **	-0,2306 **
HR	-0,0917 *	-0,1297 **	-0,1446 **	-0,1513 **	-0,1222 **	-0,103 *	-0,0952 *	-0,1014 *
FP	-0,15 **	-0,1528 **	-0,1619 **	-0,1835 **	-0,197 **	-0,2086 **	-0,2191 **	-0,2274 **

Tmin: temperatura mínima. **Tmax:** temperatura máxima. **Tmed:** temperatura media. **dT:** diferencia de temperatura a lo largo del día (Tmax – Tmin). **HR:** humedad relativa. **FP:** fotoperíodo. ns: no significativo. * p<0,05. ** p<0,01

Figuras 32-37. Correlaciones entre número de espermatozoides por eyaculado (NEE) y temperaturas máxima (■), mínima (◆) y media (○), diferencia de temperatura a lo largo del día (+), fotoperíodo (*) y humedad relativa (●), del mismo día de la recogida (0), o la media de varios días previos a la recogida. La línea de puntos (···) indica el límite de significación ($p=0,05$).

Figura 32

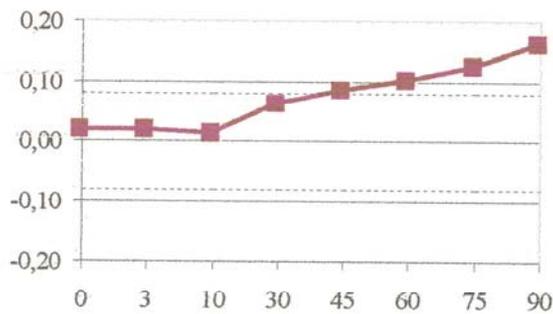


Figura 33

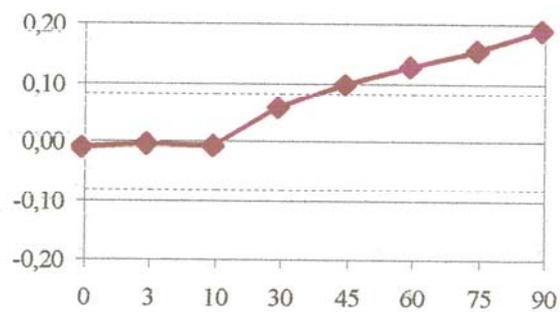


Figura 34

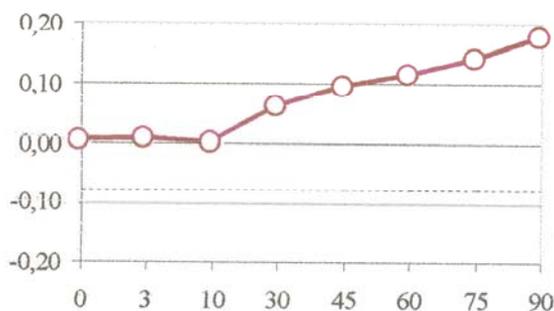


Figura 35

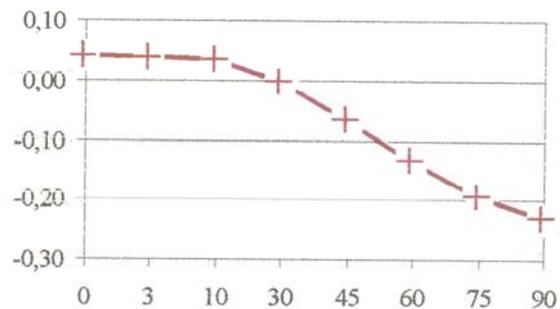


Figura 36

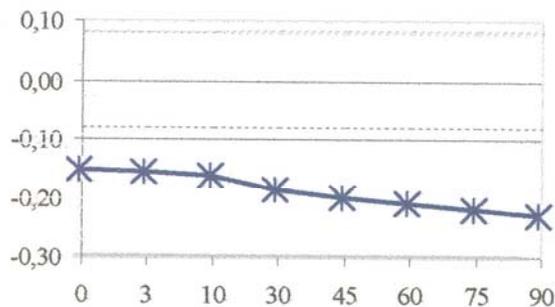


Figura 37

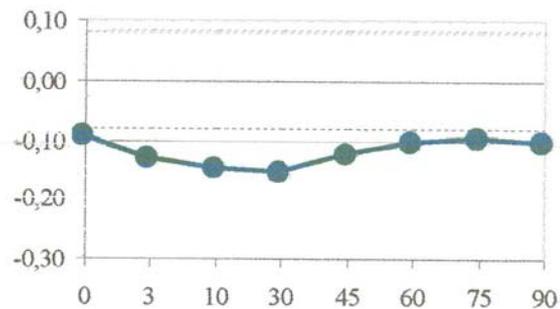
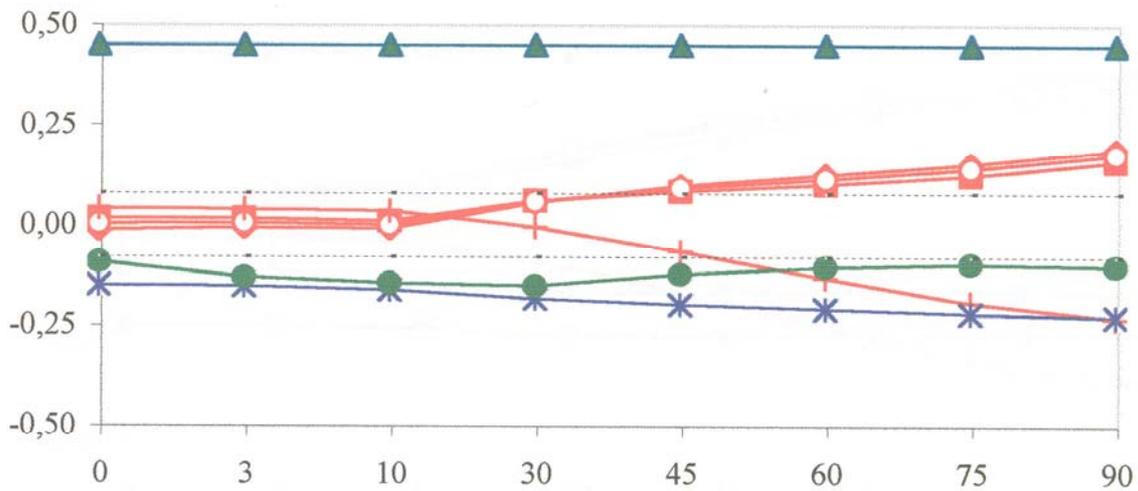


Figura 38. Representación conjunta de las correlaciones habidas entre NEE y las condiciones climáticas del mismo día de la recogida (0), o las condiciones climáticas medias de varios días previos a la recogida, así como entre NEE y edad de los machos en el momento de la recogida.



- Correlación entre NEE y Tmax.
- ◆ Correlación entre NEE y Tmin.
- Correlación entre NEE y Tmed.
- + Correlación entre NEE y dT.
- * Correlación entre NEE y FP.
- Correlación entre NEE y HR.
- Correlación entre NEE y edad de los machos
- ... Límite de significación ($p=0,05$)

Tabla 19. Correlaciones entre número de espermatozoides móviles por eyaculado (NEME) y las condiciones climáticas del día de la recogida (0) o la media de los 3, 10, 30, 45, 60, 75 y 90 días previos a la recogida.

	0	3	10	30	45	60	75	90
Tmin	-0,0065 ns	0,0003 ns	0,0035 ns	0,0607 ns	0,0974 *	0,1232 **	0,1504 **	0,1844 **
Tmax	0,0179 ns	0,0227 ns	0,0256 ns	0,0734 ns	0,0933 *	0,1054 *	0,1219 **	0,1569 **
Tmed	0,0067 ns	0,0122 ns	0,015 ns	0,0686 ns	0,0971 *	0,116 **	0,1382 **	0,1727 **
DT	0,0351 ns	0,0392 ns	0,0412 ns	0,0141 ns	-0,039 ns	-0,1093 **	-0,1815 **	-0,219 **
HR	-0,081 ns	-0,133 **	-0,1538 **	-0,1741 **	-0,1406 **	-0,1151 **	-0,1019 *	-0,1071 *
FP	-0,1507 **	-0,1533 **	-0,1615 **	-0,181 **	-0,1933 **	-0,2045 **	-0,2151 **	-0,2235 **

Tmin: temperatura mínima. **Tmax:** temperatura máxima. **Tmed:** temperatura media. **dT:** diferencia de temperatura a lo largo del día (Tmax – Tmin). **HR:** humedad relativa. **FP:** fotoperíodo. ns: no significativo. * p<0,05. ** p<0,01

Figuras 39-44. Correlaciones entre número de espermatozoides móviles por eyaculado (NEME) y temperaturas máxima (■), mínima (◆) y media (○), diferencia de temperatura a lo largo del día (+), fotoperiodo (*) y humedad relativa (●), del mismo día de la recogida (0), o la media de varios días previos a la recogida. La línea de puntos (···) indica el límite de significación ($p=0,05$).

Figura 39

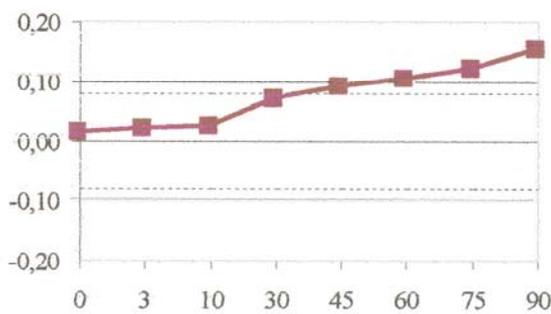


Figura 40

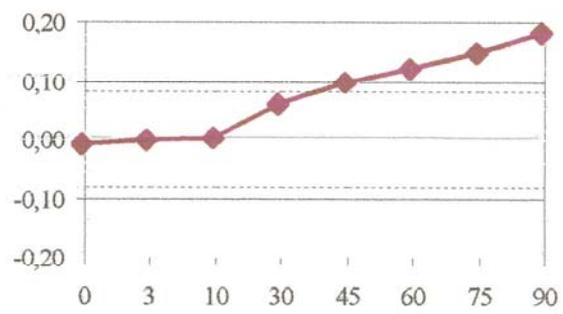


Figura 41

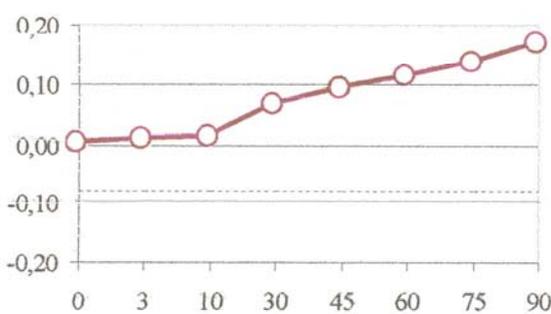


Figura 42

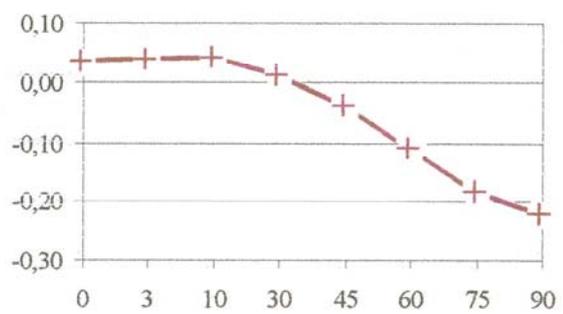


Figura 43

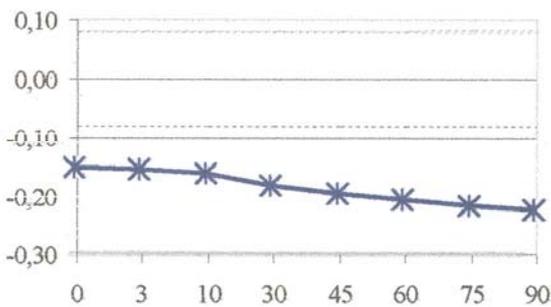


Figura 44

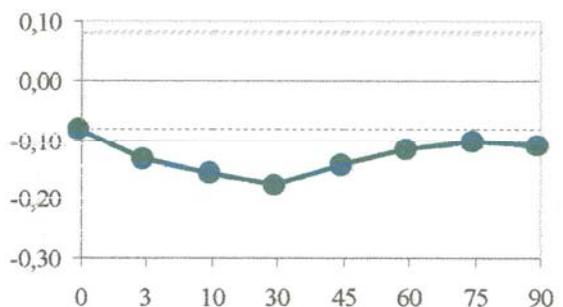
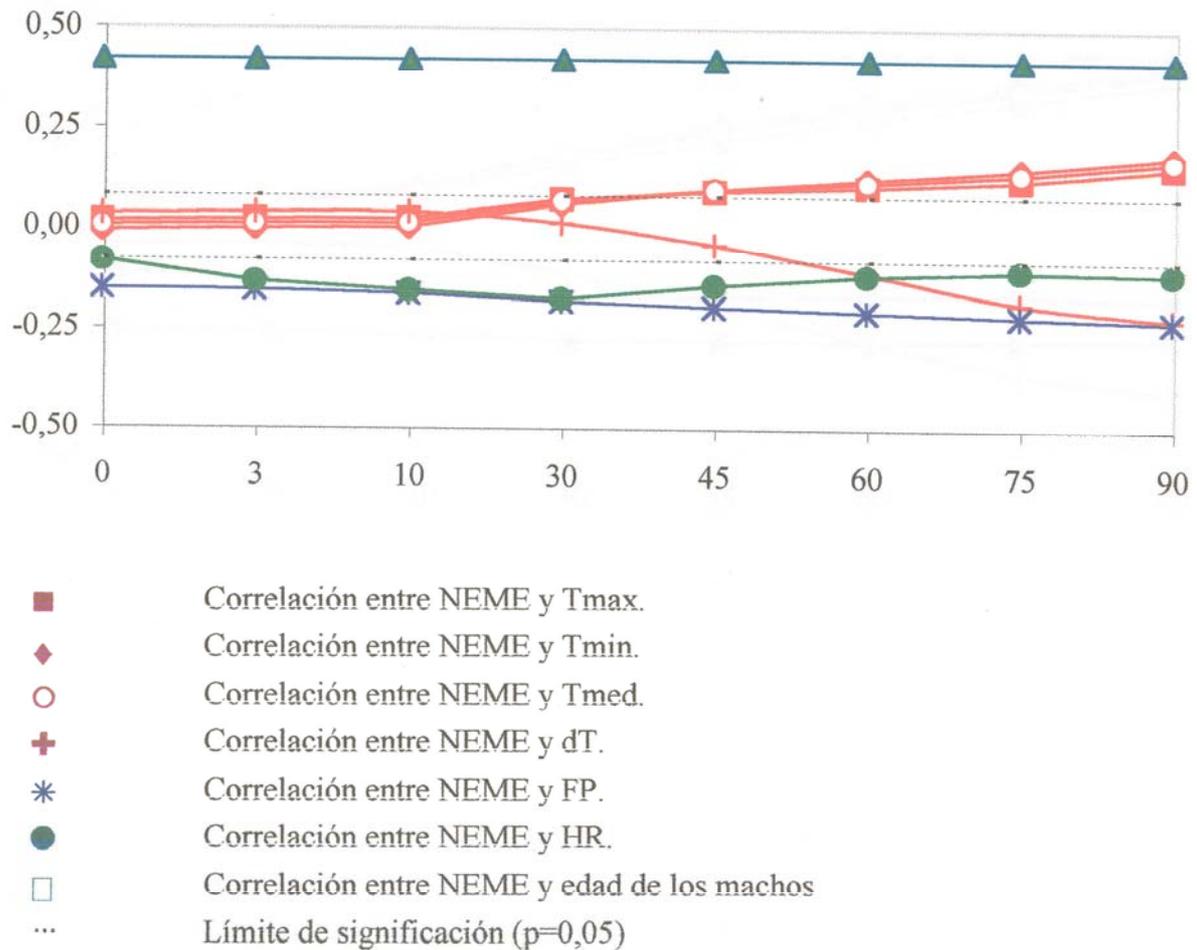


Figura 45. Representación conjunta de las correlaciones habidas entre NEME y las condiciones climáticas del mismo día de la recogida (0), o las condiciones climáticas medias de varios días previos a la recogida, así como entre NEME y edad de los machos en el momento de la recogida.



El volumen eyaculado (VE), el número de espermatozoides por eyaculado (NEE) y el número de espermatozoides móviles por eyaculado (NEME), estuvieron más correlacionados con la edad de los machos en el momento de la recogida que con cualquiera de los factores climáticos considerados anteriormente (0,40, 0,45 y 0,42 respectivamente, $p < 0,01$), mientras que la concentración espermática (Ce) lo estuvo en menor grado (0,09, $p < 0,05$). En las Figuras 24, 38 y 45 puede apreciarse que la producción seminal se correlacionó más con la edad de los machos que con cualquiera de los factores climáticos estudiados, no siendo así en el caso de la concentración espermática (Figura 31).

4. 2. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL SEMEN CONGELADO-DESCONGELADO

4. 2. 1. ANÁLISIS DE VARIANZA

El análisis de varianza reveló un efecto significativo del factor individual (M, $p < 0,01$) y del método de congelación (Mt, $p < 0,01$) sobre todos los parámetros estudiados en el semen descongelado (MIPD, PEV y PEAN). Un efecto significativo de la estación o época de recogida (E) solamente fue observado en el caso del porcentaje de espermatozoides vivos (PEV, $p < 0,05$) y con acrosoma normal (PEAN, $p < 0,01$). El tiempo transcurrido desde la congelación hasta la descongelación (tC: 2-3 días, 2 meses y 6 meses) sólo tuvo efecto significativo sobre el porcentaje de acrosomas normales ($p < 0,05$). Los resultados obtenidos en semen descongelado se muestran en las Tablas 20-28, distribuidos según el macho (M), el método de congelación (Mt), la estación o época de recogida (E) y el tiempo de conservación (tC).

Se detectó interacción macho-estación (M-E, $p < 0,05$), macho-método de congelación (M-Mt, $p < 0,01$) método-estación (Mt-E, $p < 0,01$), y macho-método-estación (M-Mt-E, $p < 0,025$) para todas las características del semen descongelado. Sin embargo, pese a estas diferencias, en todos los machos se observó un efecto beneficioso del “lavado” ante concentraciones medias o bajas de yema de huevo en el diluyente, mientras que ante concentraciones del 12% la respuesta fue más individualizada, habiendo machos en los que el semen “lavado” mostraba mejor calidad, y otros en los que no. En cuanto a la proporción de yema en el diluyente a base de Tris, sólo uno de ellos mostró mejores resultados al emplear un 6% en lugar de un 12%, aunque la diferencia en ese caso no fue significativa;

el resto de los machos mostró mejor calidad seminal conforme aumentaba la proporción de yema en el diluyente (TX-12 vs TX-6 o TX-1.5). Tablas 20-28.

4. 2. 2. DIFERENCIAS ENTRE MÉTODOS DE CONGELACIÓN (Mt)

4. 2. 2. 1. Efecto del “lavado”

Según se puede observar en las tablas 20-28, la calidad del semen “lavado” y diluido en Tris con un 1,5% de yema (TL-1.5) fue superior a la del semen íntegro diluido en el mismo diluyente (TX-1.5). A medida que la concentración de yema en el diluyente se incrementaba, las diferencias entre el semen “lavado” y el no “lavado” antes de la dilución se reducían, de modo que en el semen diluido en Tris con un 12% de yema (TL-12 y TX-12), la diferencia ya no era significativa, o incluso se invertía a favor del semen no “lavado” (TX-12) para el porcentaje de espermatozoides vivos (PEV) y el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal (PEAN). En las Tablas 20-22 se aprecia que durante el tercer período de congelaciones (invierno), el “lavado” con Tris antes de la dilución sólo reportó ventajas cuando el diluyente utilizado contenía tan solo un 1,5% de yema; cuando la concentración de yema aumentaba, las diferencias se invertían a favor del semen íntegro. Por otro lado, mientras que con el resto de las técnicas empleadas se observó una mejora general de la calidad del semen congelado-descongelado, al “lavar” con Tris antes de la dilución (TL-1,5, TL-6 y TL-12) se apreciaba una considerable pérdida de calidad en el semen congelado-descongelado con respecto a las dos épocas anteriores (Tablas 20-22).

4. 2. 2. 2. Efecto de la proporción de yema de huevo en el diluyente

La calidad del semen “lavado” o no “lavado” y diluido en Tris, mejoraba claramente conforme se incrementaba la proporción de yema en el diluyente, en todas las épocas (Tablas 20-22) y todos los machos en general (Tablas 26-28).

4. 2. 2. 3. Efecto del diluyente

Comparando los dos diluyentes empleados (Tris y Leche desnatada), observamos que la calidad del semen “lavado” y diluido en leche desnatada

(LL) superaba a la del semen “lavado” o no “lavado” diluido en Tris con un 1,5% de yema de huevo (TL-1.5 y TX-1.5), pero no la del diluido en Tris con un 12% de yema (TL-12 y TX-12) (Tablas 20-28). Concretamente, la calidad del semen “lavado” y diluido en leche desnatada se mantenía entre la del semen diluido directamente en Tris con un 6% de yema (TX-6) y la del diluido en el mismo diluyente pero recurriendo antes al “lavado” de los espermatozoides (TL-6). No obstante, los valores obtenidos al “lavar” y diluir el semen en leche (LL) mejoraron durante el tercer período de congelaciones, con lo que ya fueron comparables a los obtenidos al diluir el semen en Tris con un 12% de yema, con o sin “lavado” previo (TL-12 y TX-12).

4. 2. 3. EFECTO DE LA ESTACIÓN O ÉPOCA DE RECOGIDA (E)

Aunque el efecto de la época o estación de recogida fue significativo, la diferente evolución de los distintos métodos de congelación a lo largo de los tres períodos (primavera-verano, verano-otoño e invierno) evitó que la diferencia global entre las tres medias se hiciera significativa para el porcentaje de espermatozoides móviles (MIPD) (Tabla 20) y el de vivos (PEV) (Tabla 21), pero sí para el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal (PEAN) (Tabla 22). Sin embargo, dentro de método de congelación sí que se observó diferencia significativa entre períodos de congelación, sobre todo en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal, pero también para motilidad individual progresiva y porcentaje de espermatozoides vivos. En general, durante el tercer período de congelaciones (invierno) mejoró la calidad del semen congelado-descongelado (Tablas 20-22), correspondiéndose con la mayor motilidad registrada en el semen fresco durante esta época (Tabla 13). Así, mientras que durante los dos primeros períodos (primavera-verano y verano-otoño) la calidad del semen “lavado” y diluido en Tris superó a la del no “lavado” (TL-1.5, TL-6 y TL-12 vs TX-1.5, TX-6 y TX-12), durante el tercero (invierno), el semen “lavado” y diluido en Tris experimentó una pérdida considerable de calidad con respecto a los dos períodos anteriores, que supuso que el “lavado” sólo fuera recomendable cuando la concentración de yema en el diluyente a base de Tris fuera del orden del 1,5%. Contrariamente a lo observado en el semen “lavado” y diluido en Tris, la calidad del semen “lavado” y diluido en leche desnatada mejoró considerablemente durante el tercer período de congelaciones.

4. 2. 4. EFECTO DEL TIEMPO DE CONSERVACIÓN (tC)

La conservación del semen en nitrógeno líquido a lo largo de 6 meses, en general trajo consigo una ligera disminución de la calidad del semen descongelado a los dos meses, calidad que se recuperaría parcialmente una vez pasados los 6 meses (Tablas 23-25). Sin embargo, esta apreciación sólo fue significativa en el caso del porcentaje de acrosomas normales (Tabla 25).

Tabla 20. Motilidad Individual Progresiva media, por métodos y épocas de congelación

Método	Época 1	Época 2	Época 3	Media
LL	14,31% ^{b 1}	15,91% ^{bc 1}	22,56% ^{e 1}	17,53% ^c
TL-1.5	10,91% ^{ab 1}	14,87% ^{bc 1}	8,94% ^{bc 1}	11,37% ^b
TX-1.5	5,77% ^{a 1}	4,74% ^{a 1}	5,32% ^{a 1}	5,26% ^a
TL-6	22,70% ^{c 1}	22,35% ^{cd 1}	12,30% ^{bc 1}	19,35% ^c
TX-6	9,74% ^{ab 1}	9,77% ^{ab 1}	14,35% ^{cd 1}	11,05% ^b
TL-12	26,47% ^{c 1}	30,14% ^{d 1}	20,06% ^{de 1}	25,71% ^d
TX-12	24,75% ^{c 1}	22,06% ^{cd 1}	23,97% ^{e 1}	23,63% ^d
Media	15,54% ¹	16,91% ¹	16,80% ¹	16,38%

Diferentes letras en la misma columna o números en la misma fila indica diferencia significativa ($p < 0,05$)

Tabla 21. Porcentaje medio de espermatozoides Vivos por métodos y épocas de congelación

Método	Época 1	Época 2	Época 3	Media
LL	13,79% ^{ab 1}	15,80% ^{ab 1}	25,64% ^{cd 2}	18,32% ^b
TL-1.5	12,20% ^{a 2}	11,60% ^{a 12}	6,86% ^{a 1}	10,20% ^a
TX-1.5	6,73% ^{a 1}	4,81% ^{a 1}	6,08% ^{a 1}	5,85% ^a
TL-6	23,73% ^{bc 2}	24,30% ^{bc 2}	10,26% ^{ab 1}	19,75% ^{bc}
TX-6	12,52% ^{a 1}	11,17% ^{a 1}	19,36% ^{bc 2}	14,10% ^b
TL-12	25,36% ^{c 2}	30,44% ^{c 2}	14,45% ^{ab 1}	23,68% ^c
TX-12	30,03% ^{c 1}	28,03% ^{c 1}	31,55% ^{d 1}	29,87% ^d
Media	16,63% ¹	17,60% ¹	18,23% ¹	17,45%

Diferentes letras en la misma columna o números en la misma fila indica diferencia significativa ($p < 0,05$)

Tabla 22. Porcentaje medio de espermatozoides con acrosoma normal, por métodos y épocas de congelación

Método	Época 1	Época 2	Época 3	Media
LL	39,46% ^{c 1}	35,30% ^{bc 1}	45,98% ^{c 2}	40,23% ^{cd}
TL-1.5	30,77% ^{abc 1}	34,13% ^{bc 1}	32,28% ^{ab 1}	32,25% ^{bc}
TX-1.5	19,06% ^{a 1}	17,75% ^{a 1}	23,50% ^{a 2}	20,13% ^a
TL-6	35,67% ^{bc 2}	35,70% ^{bc 2}	26,63% ^{ab 1}	32,87% ^b
TX-6	25,36% ^{ab 1}	31,13% ^{b 12}	35,03% ^{b 2}	29,57% ^b
TL-12	36,56% ^{bc 12}	37,69% ^{bc 2}	28,73% ^{ab 1}	34,49% ^{bc}
TX-12	42,55% ^{c 1}	44,39% ^{c 12}	52,94% ^{c 2}	46,51% ^d
Media	33,76% ¹	33,95% ¹²	37,39% ²	34,99%

Diferentes letras en la misma columna o números en la misma fila indica diferencia significativa ($p < 0,05$)

Tabla 23. Motilidad Individual Progresiva media tras la Descongelación por métodos de congelación y tiempos de conservación

Método	2 días	2 meses	6 meses	Media
LL	18,13% ^{bc 1}	16,73% ^{bc 1}	17,72% ^{bcd 1}	17,53% ^c
TL-1.5	11,56% ^{ab 1}	9,99% ^{ab 1}	12,56% ^{abc 1}	11,37% ^b
TX-1.5	5,52% ^{a 1}	4,96% ^{a 1}	5,30% ^{a 1}	5,26% ^a
TL-6	20,83% ^{cd 1}	17,41% ^{bc 1}	19,81% ^{cde 1}	19,35% ^c
TX-6	11,13% ^{ab 1}	11,00% ^{ab 1}	11,01% ^{ab 1}	11,05% ^b
TL-12	27,00% ^{d 1}	23,79% ^{c 1}	26,36% ^{e 1}	25,71% ^d
TX-12	24,65% ^{cd 1}	23,81% ^{c 1}	22,43% ^{de 1}	23,63% ^d
Media	17,04% ¹	15,54% ¹	16,56% ¹	16,38%

Diferentes letras en la misma columna o números en la misma fila indica diferencia significativa ($p < 0,05$)

Tabla 24. Porcentaje medio de espermatozoides Vivos tras la Descongelación por métodos de congelación y tiempos de conservación

Método	2 días	2 meses	6 meses	Media
LL	19,08% ^{bcd 1}	17,01% ^{bc 1}	18,86% ^{bc 1}	18,32% ^{cd}
TL-1.5	10,17% ^{ab 1}	9,37% ^{ab 1}	11,06% ^{ab 1}	10,20% ^{bc}
TX-1.5	5,71% ^{a 1}	5,54% ^{a 1}	6,29% ^{a 1}	5,85% ^a
TL-6	20,76% ^{bcd 1}	18,34% ^{bc 1}	20,14% ^{bc 1}	19,75% ^b
TX-6	13,00% ^{abc 1}	13,77% ^{abc 1}	15,54% ^{abc 1}	14,10% ^b
TL-12	23,49% ^{cd 1}	22,89% ^{cd 1}	24,66% ^{cd 1}	23,68% ^{bc}
TX-12	28,94% ^{d 1}	28,35% ^{d 1}	32,32% ^{d 1}	29,87% ^d
Media	17,51% ¹	16,47% ¹	18,38% ¹	17,45%

Diferentes letras en la misma columna o números en la misma fila indica diferencia significativa ($p < 0,05$)

Tabla 25. Porcentaje medio de espermatozoides con acrosoma normal, por métodos de congelación y tiempos de conservación

Método	2 días	2 meses	6 meses	Media
LL	42,19% ^{bc 2}	38,28% ^{bc 1}	40,22% ^{bc 12}	40,23% ^{cd}
TL-1.5	34,46% ^{abc 1}	31,71% ^{ab 1}	30,57% ^{ab 1}	32,25% ^{bc}
TX-1.5	21,51% ^{a 1}	20,34% ^{a 1}	18,54% ^{a 1}	20,13% ^a
TL-6	35,69% ^{bc 2}	30,41% ^{ab 1}	32,52% ^{b 12}	32,87% ^b
TX-6	30,72% ^{ab 1}	28,32% ^{ab 1}	29,67% ^{ab 1}	29,57% ^b
TL-12	35,74% ^{bc 21}	31,63% ^{ab 1}	36,09% ^{b 2}	34,49% ^{bc}
TX-12	44,76% ^{c 1}	46,08% ^{c 1}	48,68% ^{c 1}	46,51% ^d
Media	36,39% ²	33,55% ¹	35,01% ¹²	34,99%

Diferentes letras en la misma columna o números en la misma fila indica diferencia significativa ($p < 0,05$)

Tabla 26. Motilidad Individual Progresiva media tras la Descongelación por machos

Método	Macho						
	A	B	C	D	E	F	G
LL	17,46% ^{bc}	20,85% ^{ab}	15,69% ^{bc}	22,90% ^{cd}	15,91% ^{abc}	14,56% ^a	14,22% ^{ab}
TL-1.5	14,03% ^{abc}	13,46% ^{ab}	10,53% ^{ab}	10,64% ^{ab}	11,87% ^{ab}	10,5% ^a	10,75% ^{ab}
TX-1.5	5,15% ^a	8,42% ^a	3,31% ^a	3,61% ^a	5,5% ^a	6,79% ^a	5,94% ^a
TL-6	21,07% ^{cd}	21,67% ^{ab}	17,03% ^{bcd}	17,19% ^{bc}	19,56% ^{bc}	31,67% ^b	18,25% ^{ab}
TX-6	12,32% ^{ab}	17,42% ^{ab}	12,33% ^{ab}	12,08% ^{ab}	10,13% ^{ab}	8,69% ^a	12,67% ^{ab}
TL-12	29,72% ^d	29,58% ^b	26,19% ^d	25,97% ^{cd}	26,03% ^c	20,25% ^{ab}	21,67% ^b
TX-12	21,11% ^{cd}	27,17% ^b	23,17% ^{cd}	31,31% ^d	19,64% ^{bc}	22,83% ^{ab}	16,17% ^{ab}
Media	17,05% ¹²	19,95% ²	15,37% ¹²	18,79% ¹²	15,56% ¹²	14,93% ¹²	13,86% ¹

Diferentes letras en la misma columna o números en la misma fila indica diferencia significativa ($p < 0,05$)

Tabla 27. Porcentaje medio de espermatozoides Vivos tras la Descongelación por machos

Método	Macho						
	A	B	C	D	E	F	G
LL	16,79% ^{ab}	22,58% ^a	14,25% ^{ab}	23,26% ^{bc}	19,74% ^{abc}	15,36% ^{bc}	15,94% ^a
TL-1.5	11,78% ^a	12,75% ^a	11,61% ^{ab}	10,83% ^{ab}	9,49% ^{ab}	7,78% ^{ab}	10,17% ^a
TX-1.5	6,82% ^a	11,83% ^a	2,94% ^a	5,89% ^a	3,94% ^a	6,27% ^a	6,33% ^a
TL-6	16,73% ^{ab}	28,56% ^a	18,61% ^{bc}	18,28% ^{abc}	21,22% ^{bc}	35,00% ^c	9,83% ^a
TX-6	17,86% ^{ab}	19,91% ^a	18,83% ^{bc}	14,72% ^{ab}	14,11% ^{abc}	13,58% ^{ab}	11,67% ^a
TL-12	26,50% ^b	29,33% ^a	29,06% ^c	27,00% ^c	21,22% ^{bc}	15,00% ^{abc}	14,33% ^a
TX-12	23,83% ^b	28,83% ^a	33,43% ^c	41,89% ^d	28,35% ^c	28,87% ^{bc}	22,50% ^a
Media	17,89% ¹²	23,38% ²	17,74% ¹²	21,74% ²	18,15% ¹²	17,04% ¹²	13,33% ¹

Diferentes letras en la misma columna o números en la misma fila indica diferencia significativa ($p < 0,05$)

Tabla 28. Porcentaje medio de espermatozoides con acrosoma normal, por machos

Método	Macho						
	A	B	C	D	E	F	G
LL	32,85% ^{ab}	43,13% ^a	49,41% ^d	42,13% ^{bc}	39,46% ^{abc}	38,77% ^{ab}	28,44% ^a
TL-1.5	32,67% ^{ab}	35,58% ^a	32,17% ^{bc}	32,44% ^b	39,78% ^{abc}	30,44% ^{ab}	36,33% ^a
TX-1.5	17,17% ^a	35,67% ^a	12,44% ^a	14,94% ^a	24,67% ^a	13,17% ^a	31,33% ^a
TL-6	31,93% ^{ab}	37,67% ^a	25,83% ^{ab}	31,22% ^{ab}	43,06% ^{bc}	32,67% ^{ab}	23,67% ^a
TX-6	36,95% ^{ab}	36,16% ^a	31,67% ^{bc}	33,09% ^{ab}	31,28% ^{ab}	33,67% ^{ab}	28,00% ^a
TL-12	36,22% ^b	49,33% ^a	30,83% ^{bc}	37,50% ^b	35,56% ^{abc}	24,67% ^{ab}	35,17% ^a
TX-12	41,09% ^b	47,33% ^a	41,07% ^{cd}	54,00% ^c	48,94% ^c	49,93% ^b	36,33% ^a
Media	34,14% ¹	43,94% ²	37,10% ¹²	38,00% ¹²	39,42% ¹²	36,36% ¹²	30,87% ¹

Diferentes letras en la misma columna o números en la misma fila indica diferencia significativa ($p < 0,05$)

5. DISCUSIÓN

5. 1. SEMEN FRESCO

5. 1. 1. CARACTERÍSTICAS SEMINALES

El **volumen eyaculado** medio registrado durante la experiencia se corresponde con uno de los más altos encontrados en la bibliografía, rondando los citados por Lima et al. (1994) en Saanen. Lo mismo puede decirse del número de **espermatozoides por eyaculado** (Delgadillo et al., 1993 en Saanen y Alpina; Lima et al., 1994 en Saanen y Anglonubiana) y el número de **espermatozoides móviles por eyaculado** (Roca et al., 1992a en Murciano-Granadina; Lima et al., 1994 en Saanen y Anglonubiana).

La **concentración** espermática es comparable con la encontrada en razas como la West African Dwarf (Mann, 1981), la Murciano-Granadina (Roca et al., 1992a), la Malabari (Patil y Raja, 1978), la Jamnapari (Sinha et al., 1981) o la Zaraibi (Ibrahim y Yousri, 1992). La **motilidad** individual progresiva rondaba valores cercanos a los citados en Moxoto (Feliciano-Silva et al., 1992), o Malabari (Patil y Raja, 1978).

5. 1. 2. VARIACIÓN INDIVIDUAL

El significativo efecto del animal encontrado en el análisis de varianza pone en evidencia la variabilidad que podemos encontrar en los parámetros seminales de nuestros machos, concordando con lo obtenido en otras experiencias de producción seminal (Chemineau, 1986b; Roca et al., 1992a, 1992b; Pérez y Mateos, 1996, 1997). Pérez y Mateos (1996, 1997), como en nuestro caso, detectaron mayor diferencia entre machos para producción seminal que para motilidad, y Saxena y Tripathi (1980), en la misma línea, encontraron también diferencias en cuanto al número de espermatozoides por eyaculado, pero no en cuanto a motilidad. Mohan et al. (1980), sin embargo, encontraron diferencia entre machos en cuanto a volumen, concentración, número de espermatozoides por eyaculado y porcentaje de motilidad.

Es importante señalar también la interacción macho-estación encontrada, de acuerdo con lo obtenido en otras experiencias sobre machos cabrío (Roca et al., 1992a), y poniendo de manifiesto la distinta evolución que a lo largo del año puede observarse en los diferentes machos.

Dada la gran variabilidad individual que podemos encontrar en las características seminales del macho cabrío de la A.C.C. (variedad Majorera) así como la interacción macho-estación puesta de manifiesto, la selección de los machos en base a sus caracteres reproductivos podría conducir a una considerable mejora en la fertilidad de los rebaños, idea también compartida por Chemineau (1986b), Roca et al. (1992a) o Pérez y Mateos (1996, 1997) entre otros.

5. 1. 3. EVOLUCIÓN A LO LARGO DEL AÑO

El hecho de haber podido prolongar las recogidas seminales a lo largo de todo el período experimental, confirma la posibilidad de poder utilizar el macho de la variedad Majorera de la Agrupación Caprina Canaria para la reproducción durante todo el año, al igual que ocurre en otras razas de clima tropical-subtropical como la Jamnapari (Sinha et al., 1981), la West African Dwarf (Mann, 1981), la Beetal (Mittal, 1987b), la Marwari (Mittal, 1987b), la Moxoto (Feliciano-Silva et al., 1992), o la Murciano-Granadina (Roca et al., 1992a, 1992b). No obstante, se ha detectado variación significativa de la **concentración** (Cc) a lo largo del año (Tabla 13), sugiriendo cierto patrón estacional con valores mínimos en otoño y máximos en primavera, tal y como ocurre tanto en razas de marcada estacionalidad como en otras menos estacionales, donde la llegada de la época reproductiva (generalmente otoño) se caracteriza por aumentos en el volumen eyaculado y producción seminal, así como disminuciones en la concentración (Loubser y Van Niekerk, 1983 en Angora; Ahmad y Noakes, 1996 en cabras Británicas; Pérez y Mateos, 1996, 1997 en Verata y Malagueña; Karatzas et al., 1997 en Alpina, Saanen y Damascus).

Se detectaron también diferencias significativas entre las diferentes estaciones para **VE**, **NEE** y **NEME**, aunque por la evolución observada en ellos no podrían atribuirse al efecto estacional propiamente dicho, ya que generalmente estos parámetros seminales fueron aumentando de forma continuada a lo largo de toda la experiencia desde la primavera de 1996 a la de 1997, obedeciendo quizá a la propia maduración sexual de los machos o a la ganancia de peso con la edad (Sinha et al., 1981; Summermatter y Fuschini, 1995). Tampoco Pérez y Mateos (1996, 1997), en Malagueña (37°N), encontraron que el volumen eyaculado o el número de espermatozoides por eyaculado estuvieran influenciados por el fotoperíodo, pero sí la concentración. Estos resultados observados tanto en nuestro caso como en

el de la Malagueña entre otros, nos hacen pensar que en realidad el parámetro que está sujeto a variación estacional no es la producción de espermatozoides, sino la de plasma seminal (el otro factor del que depende la concentración). Y tal vez esa estacionalidad en la producción de plasma seminal esté relacionada con las variaciones en la calidad, también estacionales, observadas tanto en semen fresco como en congelado-descongelado, en virtud de la presencia de EYCE (Iritani et al., 1964; Corteel, 1980; Ritar y Salamon, 1991; Tuli y Holtz, 1995).

La **motilidad** (MIPF) registró valores máximos en invierno y mínimos durante la primavera de 1997, valores mínimos que no se observaron durante la primavera de 1996. La única diferencia apreciable en cuanto a las condiciones climáticas de una y otra primavera para dar explicación a esta distinta evolución observada en la motilidad, radica en las bajas temperaturas registradas durante la primavera de 1997, inferiores incluso a las del invierno; por lo que tal vez fuera ésta la razón del significativo descenso observado en la motilidad. Como en nuestro caso, Roca et al (1992a, 1992b) en Murciano-Granadina o Skalet et al. (1988) en Nubiana, obtenían valores mínimos de motilidad y máximos de morfoanomalías y acrosomías durante la estación más fría. Otros como Ibrahim y Yousri (1992) en Zaraibi obtuvieron valores máximos de motilidad durante esta época, pero atribuidos en este caso concreto al mayor aporte de forraje verde proporcionado a los animales.

Con el ejemplo de la distinta evolución observada en la motilidad a lo largo de dos primaveras diferentes, queda constancia de la importancia de controlar las condiciones climáticas de la región donde tengan lugar las recogidas mientras se prolonguen las experiencias de valoración seminal, sobre todo en especies como el caprino o el ovino donde la dependencia de factores ambientales es evidente. La fecha de recogida, por sí sola, no sería por tanto una referencia completamente fiable para definir las épocas de mayor o menor producción o calidad seminal en estos animales, teniendo en cuenta las diferencias que podrían existir entre unos y otros años, al menos en climas donde las diferencias climáticas entre las distintas estaciones no son tan evidentes, como es el caso de Canarias.

Hemos admitido que los valores mínimos observados en motilidad durante la primavera de 1997 podrían deberse a las bajas temperaturas registradas durante esta época considerando lo ocurrido en casos similares (Roca et al., 1992a, 1992b; Skalet et al., 1988). Sin embargo habría que

llevar a cabo un estudio más amplio para atribuir estas variaciones al efecto de la estación o al clima, ya que el estudio de las correlaciones no reveló asociación significativa alguna de la motilidad con ninguno de los factores climáticos estudiados, por lo que el descenso sufrido por la motilidad al final de la experiencia bien podría deberse perfectamente a otros factores no controlados en el estudio.

5. 1. 4. RELACIÓN CON LOS FACTORES CLIMÁTICOS

Los **valores** de correlación fueron en general bajos, comparados con los observados en razas como la Boer (Greyling y Grobbelaar, 1983) o la Murciano-Granadina (Roca, 1989); lo cual podría atribuirse a la poca dependencia del factor estación que podría tener esta raza, o bien a que en ningún caso las condiciones climáticas locales a las que está expuesta no llegan a ser ni mucho menos extremas.

Por otro lado, generalmente, los valores de correlación fueron mayores cuando se tenía en cuenta las condiciones climáticas medias de **varios días antes de la recogida** que cuando sólo se atendía a las condiciones climáticas del mismo día de la recogida. Esto parece lógico dada la duración de la espermatogénesis, aunque muy pocas veces se ha tenido en cuenta a la hora de hallar este tipo de correlaciones, reduciéndose lo encontrado, al carnero (Bruckner y Bauer, 1972). Efecto a largo plazo de la temperatura sobre la calidad seminal y la fertilidad sí se ha demostrado (Yokoki y Ogasa, 1977; Kishore y Rao, 1983), pero casi siempre refiriéndose a temperaturas extremas y bajo condiciones experimentales.

En base a las correlaciones obtenidas (Tablas 16-19, valores resaltados en **negrita**), podría decirse que en nuestras condiciones, la mayor producción seminal y la menor concentración podríamos obtenerla tras 75-90 días de temperaturas moderadamente altas con pocas oscilaciones a lo largo del día, 30-90 días de humedad relativa baja, y 1-90 días cortos. En el caso de Canarias, la acción de los alisios y la proximidad del océano evitan las altas temperaturas frecuentes en latitudes similares durante el verano, por lo que éstas se dejan sentir algo más tarde y no de forma tan intensa, sin llegar por tanto a afectar de forma seria la calidad del semen, como se ha comprobado en otras condiciones (Yokoki y Ogasa, 1977; Corteel, 1981; Kishore y Rao, 1983; Casu et al., 1991; Patil y Kaikini, 1992). En base a los resultados obtenidos bajo nuestras condiciones, podría entenderse que las altas temperaturas se corresponderían con un aumento en la producción

seminal que se haría efectiva meses más tarde. De este modo, la mayor producción y calidad seminal podríamos obtenerla a finales del otoño o principios del invierno, cuando se dan las condiciones idóneas comentadas anteriormente (Tabla 3). Quizá sería conveniente según estos resultados y a falta de más estudios que corroboren este hecho, procurar una temperatura mínima medianamente alta en los corrales durante los meses fríos, para asegurar un comportamiento óptimo de los sementales a largo plazo durante todo el año.

Greyling y Grobbelaar (1983) encontraron correlación no significativa entre porcentaje de espermatozoides anormales y duración del día de la recogida (0,65), así como entre porcentaje de espermatozoides anormales y temperatura (0,61). Roca (1989) encontró también que el diámetro testicular, la motilidad, el porcentaje de morfoanomalías y el de acrosomas dañados se correlacionaban significativamente con la temperatura (0.79, 0.62, 0.47 y 0.53 respectivamente), pero no el volumen eyaculado, el cual sí se correlacionó con la humedad relativa (0,44). Esto concuerda en parte con los resultados obtenidos en nuestra experiencia, ya que el **volumen eyaculado** tampoco se correlacionó significativamente con la temperatura del mismo día de la recogida y sí, aunque de forma muy leve, con la humedad relativa. Sin embargo, al considerar la temperatura media de varios días previos a la recogida, se observó que ésta sí se correlacionaba positivamente con el volumen eyaculado, y más que con la humedad relativa. La importancia de factores como la temperatura o la humedad relativa ha sido confirmada en la bibliografía (Corteel, 1981; Casu et al., 1991; Chemineau, 1993), más aún cuando la acción única del fotoperíodo es incapaz de explicar el patrón reproductivo estacional en razas de clima templado desplazadas de su entorno natural (Chemineau, 1992), o en el caso de razas con localización en áreas geográficas donde no existe una marcada variación fotoperiódica a lo largo del año.

Roca (1989) encontró la **concentración espermática** más correlacionada con el fotoperíodo que con la temperatura o la humedad relativa. En nuestra experiencia, los valores de correlación con la humedad relativa fueron también pequeños, pero sin embargo la concentración se correlacionó más con la temperatura que con la duración del día, tal vez debido a que la diferencia fotoperiódica a lo largo del año en nuestra latitud (3,5 horas a 28° N) es menor que la registrada a 37° N (5,5 horas). Ésta y otras diferencias climáticas evidentes entre una y otra localización

geográfica, pueden explicar, junto con diferencias raciales, las discrepancias encontradas entre uno y otro caso.

En esta experiencia no se encontró la **motilidad** significativamente correlacionada con ninguno de los factores climáticos estudiados, manteniéndose a niveles muy constantes a lo largo de toda la experiencia, apenas disminuyendo al final de ésta.

5. 1. 5. RELACIÓN CON LA EDAD

La producción seminal (VE, NEE y NEME) estuvo más correlacionada con la edad de los machos que con cualquiera de los factores climáticos estudiados, ya fuera temperatura (máxima, mínima, media o diferencia de temperatura a lo largo del día), humedad relativa, o fotoperíodo. A esta causa atribuimos el aumento continuado de la producción seminal a lo largo de toda la experiencia desde la primavera de 1996 a la de 1997, sin ningún patrón estacional definido. Quizá el empleo de machos algo más maduros o experiencias más largas puedan evidenciar algún patrón estacional en este caso.

La concentración espermática (Ce), por el contrario, estuvo menos correlacionada con la edad que con factores como la temperatura o el fotoperíodo, a lo que atribuimos el que sí mostrara variaciones estacionales a lo largo de la experiencia, con valores mínimos en otoño y máximos en primavera.

Autores como Corteel (1981), Sinha et al. (1981) o Summermatter y Fuschini (1995), también han apreciado variaciones en las características seminales de los machos con la edad, especialmente en lo que concierne a la producción seminal, aumentando generalmente conforme se incrementaba la edad de los machos.

5. 2. SEMEN CONGELADO-DESCONGELADO

5. 2. 1. VARIACIÓN INDIVIDUAL

Al igual que ocurriera con el semen fresco, la diferencia significativa encontrada entre machos o las interacciones macho-estación y en este caso también macho-método, ponen de relieve la variabilidad individual que

podemos encontrar entre nuestros animales, por lo que la selección de éstos podría conducir no sólo a una mejora de la calidad del semen congelado-descongelado, sino también a una mayor constancia a lo largo del año. La interacción macho-método de congelación, sin embargo, obliga a valorar individualmente cada macho para cada uno de los métodos de congelación, pudiendo un método representar importantes mejoras de la calidad del semen congelado-descongelado en un macho, pero no en otros. Diferencias entre machos, interacciones macho-época de recogida o interacciones macho-método de congelación también han sido citadas en la bibliografía en cuanto a la calidad del semen congelado-descongelado (Ritar y Salamon, 1982, 1991), aunque otras veces no se han detectado (Tuli y Holtz, 1995) o se ha optado por la mezcla de eyaculados para simplificar el proceso de congelación, por lo que no ha podido determinarse (Memon et al., 1985; Dunner y Vázquez, 1991; Pintado et al., 1991b, 1992; Dunner, 1993; Ritar y Ball, 1993). La posibilidad de que exista una marcada diferencia entre la calidad del semen de los distintos machos utilizados para la experiencia así como una importante interacción macho-método de congelación, nos obliga a replantear la mezcla de eyaculados, ya que entonces no se detectarían estas importantes diferencias, o incluso podríamos estar extendiendo el éxito de una técnica de congelación al conjunto de los machos, cuando en realidad podría darse el caso de que no fuera tan exitosa para algunos de ellos, y acaben éstos por ser calificados como no aptos para la congelación de su semen.

En resumen, como dijéramos también para el semen fresco, es importante tener en cuenta la gran variabilidad que podemos encontrar entre nuestros machos en cuanto a la calidad del semen congelado-descongelado, su evolución a lo largo del año y el empleo de diferentes técnicas de congelación, para ir mejorando los resultados tras la inseminación artificial.

5. 2. 2. DIFERENCIAS ENTRE LOS DISTINTOS MÉTODOS DE CONGELACIÓN

5. 2. 2. 1. Efecto del “lavado”

En la experiencia llevada a cabo durante tres épocas distintas a lo largo del año, se ha podido comprobar en general un efecto beneficioso del “lavado” sobre la calidad del semen a la descongelación, pero dependiendo

dicho efecto de la proporción de yema contenida en el diluyente y de la época del año (Tablas 20-28):

A medida que la concentración de yema en el diluyente aumentaba, la diferencia disminuía con respecto a la calidad del semen no “lavado”, no haciéndose significativa la diferencia o invirtiéndose ésta entre el semen “lavado” y el no “lavado” cuando la proporción de yema contenida en el diluyente pasaba a ser del 12% (TL-1.5, TL-6 y TL-12 vs TX-1.5, TX-6 y TX-12). La mala congelabilidad del semen caprino ha sido atribuida muchas veces a la interacción entre enzimas del plasma seminal y la yema de huevo del diluyente (Roy, 1957; Iritani et al., 1961, 1964; Iritani y Nishikawa, 1963, 1964, 1972; Ritar y Salamon, 1982; Memon et al., 1985), pero según esto, cuanto más yema de huevo contuviera el diluyente, mayor sería la necesidad de eliminar el plasma seminal por “lavado” para evitar dicha interacción. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la incorporación de yema de huevo al diluyente hasta concentraciones del 12% mejoran la calidad del semen congelado-descongelado, y de hecho, el “lavado” se mostraba efectivo ante concentraciones de yema del orden del 1,5%, pero ya a niveles del 12% se hacía innecesario. El hecho de que la efectividad del “lavado” se redujera conforme aumentaba la concentración de yema del diluyente, podría tener su explicación en que la yema jugaba también un papel protector frente al agente que pretendía eliminarse con el “lavado”, por lo que ya a concentraciones del 12%, el “lavado” sería prácticamente innecesario, suponiendo entonces sólo un mayor estrés celular, como demuestra el menor porcentaje de espermatozoides vivos y el de espermatozoides con acrosoma normal observado en el semen “lavado” frente al no “lavado” (TL-12 vs TX-12) (Tablas 20-28). Con respecto a esto, muchos son los autores que también han comprobado un efecto beneficioso de la yema de huevo añadida al diluyente (Deka y Rao, 1986a; Ritar y Salamon, 1991), y otros tantos los que la utilizan en sus técnicas habituales de conservación (Memon et al., 1985; Tuli y Holtz, 1992, 1994; Singh et al., 1995, 1996). Sin embargo, las diferentes conclusiones a las que han llegado otros autores advirtiendo del efecto tóxico de la yema de huevo (Roy, 1957; Iritani et al., 1961, 1964; Iritani y Nishikawa, 1963, 1964, 1972; Ritar y Salamon, 1982; Memon et al., 1985), hacen pensar que la conveniencia o no del “lavado” y la utilización de yema de huevo, dependería de múltiples factores como la raza, el individuo, la estación, el método de recogida, o la técnica empleada por cada autor (Ritar y Salamon, 1982; Tuli y Holtz, 1994).

Al menos la yema de huevo no parece ser el único componente implicado en la mala congelabilidad del semen caprino, ya que Courtens et al. (1984) encontraron interacción entre algunos componentes de la leche y el plasma seminal que llevaba a la destrucción de la estructura acrosómica del espermatozoide, y Memon et al. (1985) hallaron una mayor efectividad del “lavado” al utilizar leche, que utilizando lactosa-yema o Tris-yema. Además, Chauhan y Anand (1990) han comprobado que las enzimas del plasma seminal no hidrolizan al menos los fosfolípidos más abundantes de la yema de huevo. Según esto, la efectividad del “lavado” y por tanto la conveniencia o no de llevarlo a cabo, dependerá del tipo de diluyente utilizado, y no debería centrarse únicamente en la presencia o no de yema de huevo en su constitución.

Se observó una clara mejora en la calidad del semen íntegro congelado en invierno con respecto a los dos períodos anteriores (TX-6 y TX-12) (Tablas 20-22). Esta mejora podría tener su explicación en una menor actividad de la EYCE, lo cual explicaría también la mayor calidad observada en el semen recogido durante esta época, cuando se obtuvo la mayor motilidad (Tabla 13). La menor actividad de la EYCE explicaría el hecho del aumento en la calidad del semen íntegro diluido en Tris con un 6% y un 12% de yema (TX-6 y TX-12). Pero también cambios estructurales de los espermatozoides debieron ocurrir durante ese tercer período de congelaciones (invierno) en cuanto a que los espermatozoides se volvieron en general más sensibles al “lavado” con Tris pero no al “lavado” con SL, por lo que se apreció un marcado descenso del semen “lavado” y diluido en Tris (TL-1.5, TL-6 y TL-12) con respecto a las dos anteriores épocas de congelación (primavera-verano y verano-otoño), mientras que la calidad del semen “lavado” con la solución SL y diluido en leche (L) mejoró considerablemente con respecto a los dos períodos anteriores (LL) (Tablas 20-22).

Variación estacional en la actividad de la EYCE ha sido descrita también por Iritani et al. (1964), Corteel (1980) o Ritar y Salamon (1991), coincidiendo todos menos el primero de ellos, en que la actividad de la EYCE es mayor fuera de la temporada de cría. Si la mayor o menor actividad de la EYCE es una de las causas por las cuales se manifiestan variaciones en la calidad del semen a lo largo del año, la razón del porqué lavando se sigan apreciando dichas diferencias, podríamos encontrarla en que por un lado el doble “lavado” no elimina totalmente la presencia de plasma seminal (Iritani et al., 1961), y por otro, en que la estación influye

también sobre las características iniciales del eyaculado y su sensibilidad frente al “lavado”.

Confirmación del hecho de una estacionalidad en la composición y cantidad del plasma seminal, podemos encontrarla en los resultados observados en las características del eyaculado, donde ya se planteó una estacionalidad de la producción de plasma seminal más que de la producción de espermatozoides, atendiendo al hecho de que ésta no sufrió variaciones estacionales a lo largo del año mientras que la concentración espermática sí.

Efectos beneficiosos sobre la calidad del semen “lavado” han sido descritos ampliamente en la bibliografía (Westhuysen, 1978; Ritar y Salamon, 1982, 1991; Memon et al., 1985; Deka y Rao, 1986c; Ritar y Salamon, 1991; Dunner, 1993), aunque también otros muchos son los autores que no han encontrado diferencia alguna, o incluso si ésta la había, lo era a favor del semen no “lavado” (Ritar y Salamon, 1983; Deka y Rao, 1987b, 1988; Strohmeyer, 1988; Tuli y Holtz, 1994). Factores raciales, individuales, estacionales o metodológicos podrían justificar tales contradicciones, por lo que la situación actual exigiría un estudio más detallado (Tuli y Holtz, 1995).

5. 2. 2. 2. Efecto de la proporción de yema

Se observó que el incremento de la proporción de yema en el diluyente a base de Tris (del 1,5 al 12%) se traducía en una clara mejora de la calidad en el semen íntegro. De los 7 machos empleados para la experiencia, en ninguno de ellos se observó que la calidad del semen congelado-descongelado declinara conforme aumentaba la proporción de yema en el diluyente, con lo cual, por ahora, no puede confirmarse el hecho de que algunos machos de la variedad Majorera de la A.C.C. no pudieran tolerar concentraciones de yema de huevo superiores al 1,5% en el diluyente, como confirmaran Ritar y Salamon en 1982 y 1991 en Angora (Tablas 26-28)). Esto es comprensible, en cuanto a que estos autores relacionaban este hecho con la finalización de la temporada de cría, cuando supuestamente aumenta la actividad de la EYCE; situación que en realidad no se dio en los animales utilizados, ya que mantuvieron una actividad reproductiva constante a lo largo de toda la experiencia. En el semen “lavado” antes de la dilución en Tris, sí que se observó sin embargo que en algún que otro macho una concentración de yema del 6% presentaba mejores resultados que una del 12%, aunque por el poco número de casos y

la escasa diferencia, ésta no fue significativa y habría que ampliar la experiencia para confirmarlo, pudiendo haberse debido simplemente a la calidad inicial del eyaculado.

En definitiva, la yema de huevo hasta concentraciones del 12% en el diluyente, mejora la calidad del semen a la descongelación tanto en el semen íntegro como en el “lavado”. Ritar y Salamon (1982) obtenían resultados similares tras la descongelación en semen no “lavado”, pero tras la incubación a 37°C la motilidad mejoraba a medida que la concentración de yema en el diluyente era menor (del 12 al 0%). En la misma experiencia, sin embargo, la motilidad del semen “lavado” tras la descongelación e incubación mejoraba con la incorporación de yema de huevo, aunque la diferencia no fue muy notable. En estudios posteriores, Ritar y Salamon (1991) obtuvieron resultados comparables con los de esta experiencia, comprobando que la calidad del semen a la descongelación mejoraba conforme aumentaba la proporción de yema de huevo en el diluyente, tanto en el semen “lavado” como en el que no, pero tan sólo recogiendo semen de principios de temporada, cuando la concentración ideal de yema de huevo era del 12%. A medida que avanzaba la temporada de cría, la adición de yema de huevo al diluyente se traducía en pérdidas de calidad del semen descongelado, como se demostrara en otra experiencia paralela sobre semen íntegro. Lo observado por Ritar y Salamon en 1991 a principios de temporada, se advirtió en los machos utilizados en nuestra experiencia para todo el año, dado que éstos no estaban sujetos a tan fuertes variaciones estacionales como aquellos. Por tanto, y a falta de estudios más detallados que involucren la incubación del semen a 37°C (donde la EYCE ejerce su mayor actividad) y su inseminación, podemos afirmar que la calidad del semen congelado-descongelado de la variedad Majorera de la A.C.C., mejora al incorporar yema de huevo al diluyente hasta concentraciones del 12%, tanto en semen íntegro como en el “lavado”.

5. 2. 2. 3. Efecto del diluyente

El semen diluido en leche desnatada (LL) mostró en general resultados comparables a los del semen diluido en Tris con un 6% de yema de huevo (TL-6 y TX-6), viéndose mejorados por los del semen diluido en Tris con un 12% de yema (TL-12 y TX-12) y superando los del diluido en Tris con un 1,5% de yema (TL-1.5 y TX-1.5) (Tablas 20-28). No obstante,

durante el tercer período de congelaciones, en concordancia con lo observado de forma general con las otras técnicas, la calidad del semen diluido en leche mejoró considerablemente, adoptando valores comparables a los del diluido en Tris con un 12% de yema (TL-12 y TX-12). Hay que tener en cuenta que el diluyente compuesto básicamente por leche no contenía yema de huevo, por lo que estos resultados quizá podrían mejorar añadiendo yema de huevo a la leche como lo han hecho otros autores (Westhuysen et al., 1980; Deka y Rao, 1985b; Chauhan y Anand, 1990), así como podría simplificarse el método, recurriendo el “lavado” con soluciones más sencillas que la propuesta por Corteel (1974), obteniendo otros autores resultados satisfactorios con otros tipos de “lavado” (Ritar y Salamon, 1982, 1991; Memon et al., 1985; Mukherjee y Nelson, 1987; Pintado et al., 1991b, 1992; Tuli y Holtz, 1994; Singh et al., 1995, 1996; Sinha et al., 1995).

5. 2. 3. EFECTO DE LA ESTACIÓN O LA ÉPOCA DE RECOGIDA (E)

De forma global, no se observó diferencia significativa alguna entre las tres épocas durante las cuales se congeló semen, ni para porcentaje de espermatozoides móviles (MIPD) (Tabla 20), ni en el caso de porcentaje de espermatozoides vivos (PEV) (Tabla 21). Sí se observó sin embargo un aumento significativo del porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal (PEAN) (Tabla 22) durante el tercer período de congelaciones (invierno), coincidiendo con el aumento de la motilidad individual progresiva en el semen de origen (MIPF) (Tabla 13). Ese aumento global en la calidad del semen congelado podría haber sido incluso más espectacular, si no fuera porque el “lavado” con Tris se manifestó no recomendable durante este último período. Durante ese tercer período de congelaciones (invierno), posiblemente la menor actividad de la EYCE y una mejor calidad inicial, fueron las razones que condujeron a una mejora de la calidad en el semen íntegro (TX-1.5, TX-6 y TX-12) y en el “lavado” y diluido en leche (LL), mientras que una mayor sensibilidad o intolerancia al “lavado” con Tris (T) se reflejaba en un deterioro de la calidad del semen “lavado” con Tris (TL-1.5, TL-6 y TL-12).

Como en esta experiencia, Pintado et al. (1992) diluyendo en Tris con un 20% de yema, tampoco detectaron diferencia significativa entre diferentes estaciones sobre la motilidad postdescongelación (MIPD) pero sí sobre el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal (PEAN) y la capacidad de endósmosis (menor en primavera y verano frente a otoño e

invierno). Tuli y Holtz (1995), empleando también diluyente Tris con un 20% de yema y sin recurrir al “lavado”, observaron en Boer valores máximos de motilidad y porcentaje de espermatozoides vivos antes y después de la congelación en invierno, en el mismo sentido que nuestros resultados.

5. 2. 4. EFECTO DEL TIEMPO DE CONSERVACIÓN

No se observó diferencia significativa entre tiempos de conservación (2-3 días, 2 meses y 6 meses) para motilidad individual progresiva (MIPD) (Tabla 23) ni porcentaje de espermatozoides vivos (PEV) (Tablas 24), contrariamente a lo observado por Corteel y Baril (1975), quienes además atribuían mayor pérdida al semen no “lavado” que al “lavado”. Sí se observó diferencia significativa entre tiempos de conservación para el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal (PEAN) (Tabla 25), disminuyendo ligeramente tras un período de conservación de 2 meses, y recuperándose parcialmente a los 6 meses. Pero dicha apreciación tuvo lugar tanto en semen íntegro como en el “lavado”, como advirtieran también Deka y Rao (1987b) o Ritar y Salamon (1991). Quizá con tiempos de conservación superiores o un mayor número de casos se podría observar un descenso significativo de la motilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos como apreciaran también Deka y Rao (1987b) o Samouilidis et al. (1982), ya que los resultados apuntan hacia un patrón similar al observado en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal, con ligero descenso tras dos meses de conservación en nitrógeno líquido y parcial recuperación a los 6 meses. Tal vez el descenso en los parámetros del semen descongelado tras dos meses de conservación y su parcial recuperación tras 6 meses pongan de manifiesto que durante la conservación en nitrógeno líquido el semen sigue sufriendo una serie de transformaciones que no conviene interrumpir a los dos meses de congelado el semen, sino esperar al menos hasta los seis si pretendemos conseguir algo más de calidad. Tuli y Holtz (1992) citan una reducción en los porcentajes de motilidad progresiva, y espermatozoides vivos así como aumento en la liberación de GOT descongelando a los 15 minutos de congelar, que se recuperaban parcialmente a los 7 días. Y Ritar y Salamon (1991) también apreciaron una ligera disminución de la calidad del semen en torno al 4º mes de conservación que se recuperaría pasados 5 meses.

6. CONCLUSIONES

1. El macho de la variedad Majorera de la A.C.C. es capaz de producir cantidades aceptables de semen y de calidad suficiente durante todo el año.
2. La calidad del semen de la variedad Majorera de la A.C.C. se sitúa entre los valores medios típicos de la especie, mientras que su producción seminal se corresponde con una de las más altas.
3. No se apreció patrón estacional en la producción seminal pero sí en la concentración espermática, con valores mínimos durante el otoño y máximos durante la primavera.
4. El estudio de las correlaciones entre las características seminales y las condiciones climáticas en nuestra latitud, pone en evidencia la importancia del efecto a medio plazo que tiene el clima sobre la producción y calidad seminal, y en especial la temperatura.
5. Se ha encontrado gran variabilidad entre machos en cuanto a sus características seminales, su evolución a lo largo del año, y el método de congelación más apropiado.
6. El "lavado" de los espermatozoides antes de la dilución en Tris se tradujo en una clara mejora de la calidad del semen congelado-descongelado sólo cuando la concentración de yema de huevo en el diluyente era del 1,5%.
7. La calidad del semen congelado-descongelado diluido en Tris mejoraba conforme se incrementaba la proporción de yema de huevo en el diluyente hasta un 12%.
8. La calidad del semen congelado-descongelado diluido en leche desnatada fue comparable a la del diluido en Tris con un 6% de yema.
9. En el semen congelado durante el invierno se observó una ligera mejora de la calidad con respecto al congelado en otras épocas, en concordancia con la mayor motilidad del semen fresco registrada durante esta época.
10. La calidad del semen empeoró ligeramente tras dos meses de conservación en nitrógeno líquido, recuperándose parcialmente a los 6 meses.

7. RESUMEN

RESUMEN

Se recogió semen a 7 machos de la variedad Majorera de la Agrupación Caprina Canaria (A.C.C.) durante 14 meses consecutivos para estudiar posibles diferencias estacionales en la calidad del eyaculado, y se congeló el obtenido durante tres épocas distintas a lo largo del año para detectar en el mismo sentido diferencias estacionales en la calidad del semen congelado-descongelado. Los parámetros valorados en el primer caso fueron volumen eyaculado (VE), concentración espermática (Cc), motilidad individual progresiva (MIPF), número de espermatozoides por eyaculado (NEE) y número de espermatozoides móviles por eyaculado (NEME). No se observó diferencia atribuible al efecto de la estación en el caso de la producción seminal (VE, NEE y NEME), pero sí en el de la concentración espermática (Cc), con valores mínimos durante el otoño y máximos durante la primavera. El estudio de las correlaciones entre estos parámetros y las condiciones climáticas acontecidas en torno a la recogida, reveló una mayor importancia de las condiciones climáticas medias de varios meses previos a la recogida, que de las simples condiciones climáticas del día de la recogida. A su vez, el efecto de la temperatura fue predominante sobre el del fotoperíodo, y éste sobre el de la humedad relativa.

En cuanto a la congelación del semen, se valoró la efectividad del “lavado” de los espermatozoides antes de la dilución, y la de 4 diluyentes, 3 de ellos a base de Tris con diferentes concentraciones de yema de huevo (del 1,5% al 12%) y uno a base de leche desnatada en polvo. El “lavado” mejoraba la calidad del semen diluido en Tris con un 1,5% de yema de huevo, pero no la del diluido en Tris con un 12% de yema. La calidad del semen congelado-descongelado mejoraba conforme aumentaba la proporción de yema de huevo añadida al diluyente, y se apreció mejor calidad en el semen congelado durante el invierno, coincidiendo con la mayor motilidad registrada en los eyaculados recogidos durante esa época.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, N., Noakes, D.E., 1996.** Seasonal variations in the semen quality of young British goats. *British Veterinary Journal* 152: 225-236.
- Ali, B.H., Mustafa, A.I., 1986.** Semen characteristics of Nubian goats in the Sudan. *Anim. Reprod. Sci.* 12: 63-68.
- Austin, A.J.S., Kanakaraj, P., Edwin, M.J., 1992.** Influence of cryoprotectives on acrosomal damage on deep frozen buck spermatozoa. *Cheiron* 21: 60-62.
- Azawi, O.I., Dahash, S.Y.A., Juma, F.T., 1993.** Effect of different diluents on Shami goat semen. *Small Rum. Res.* 9: 347-352.
- Baril, G., Remy, B., Vallet, J.C., Beckers, J.P., 1992.** Effect of repeated use of progestagen-PMSG treatment for oestrus control in dairy goats out of breeding season. *Reprod. Dom. Anim.* 27: 161-168.
- Baril, G., Leboeuf, B., Saumande, J., 1993.** Synchronization of oestrus in goats: The relationship between time of occurrence of oestrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology* 40: 621-628.
- Baril, G., Remy, B., Leboeuf, B., Beckers, J.F., Saumande, J., 1996.** Synchronization of oestrus in goats: the relationship between eCG binding in plasma, time of occurrence of oestrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology* 45: 1553-1559.
- Barth, A.D., Oko, R.J., 1989.** Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa, Iowa State University Press, Ames.
- Berger, T., Drobnis, E.Z., Foley, L., Metzler, J.K., Horton, M., 1994.** Evaluation of relative fertility of cryopreserved goat sperm. *Theriogenology* 41: 711-717.
- Bon Durant, R.H., Darrien, B.J., Munro, C.J., Stabenfeldt, G.H., Wang, P., 1981.** Photoperiod induction of fertile oestrus and changes in LH and progesterone concentrations in yearling dairy goats (*Capra hircus*). *J. Reprod. Fert.* 63: 1-9
- Bongso, T.A., Fatimah, I., Dass, S., 1982.** Synchronisation of oestrus of goats treated with progestagen impregnated intravaginal sponges and PMSG, and reproductive performance following natural mating or A.I. with frozen semen. *Anim. Reprod. Sci.* 5: 111-116.

- Borgohain, A.C., Rajkonwar, C.K., Deka, B.C., 1983.** Sperm abnormalities in buck. *Indian J. Anim. Sci.* 53: 909-911.
- Borgohain, A.C., Deka, B.C., Rajkonwar, C.K., 1985.** Preservation of buck semen. *Indian Vet. J.* 62: 81-82.
- Camp, J.C., Wildt, D.E., Howard, P.K., Stuart, L.D., y Chakraborty, P.K., 1983.** Ovarian activity during normal and abnormal length estrous cycles in the goat. *Biol. Reprod.* 28: 673-681.
- Capote, J., 1985.** Agrupación Caprina Canaria. En: I Simposio de la Explotación Caprina en Zonas Áridas, Fuerteventura, 17-30.
- Capote-Álvarez, J., Darmanin-Garrido, N., Delgado-Bermejo, J.V., Fresno-Baquero, M.R., López, J.L., 1992.** Agrupación Caprina Canaria (A.C.C.), Consejería de Agricultura y Pesca del Gobierno de Canarias.
- Capote, J., Fresno, M., Delgado, J.V., Darmanin, N., Lorenzo, M., Molina, A., 1996.** Importancia de los conocimientos tradicionales en el manejo del ganado caprino dentro de una estrategia de desarrollo local. *Canarias Agraria y Pesquera* 33: 40-44.
- Casu, S., Cappai, P., Naitana, S., 1991.** Effects of high temperatures on reproduction in small ruminants. In: Animal husbandry in warm climates, Pudoc, Wageningen, 103-111.
- Chandler, J.E., Painter, C.L., Adkison, R.W., Memon, M.A., Hoyt, P.G., 1988.** Semen quality characteristics of dairy goats. *J. Dairy Sci.* 71: 1638-1646.
- Chauhan, M.S., Anand, S.R., 1990.** Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Theriogenology* 34: 1003-1013.
- Chemineau, P., 1986a.** Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. I. Female oestrus behaviour and ovarian activity. *Reprod. Nutr. Dev.* 26: 441-452.
- Chemineau, P., 1986b.** Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. II. Male mating behaviour, testis diameter, ejaculate characteristics and fertility. *Reprod. Nutr. Dev.* 26: 453-460.

- Chemineau, P., 1993.** Environment and animal reproduction. *World Animal Review* 77: 2-14.
- Chemineau, P., Xandé, A., 1982.** Reproductive efficiency of Creole meat goats permanently kept with males. Relationship to a environment. *Trop. Anim. Prod.* 7: 98-104.
- Chemineau, P., Normant, E., Ravault, J.P., Thimonier, J., 1986.** Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goat after a treatment combining a skeleton photoperiod, melatonin and the male effect. *J. Reprod. Fertil.* 78: 497-504.
- Chemineau, P., Pelletier, J., Guerin, Y., Colas, Ravault, J.P., Toure, G., Almeida, G., Thimonier, J., Ortavant, R., 1988.** Photoperiodic and melatonin treatments for the control of seasonal reproduction in sheep and goats. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 28: 409-422.
- Chemineau, P., Daveau, A., Maurice, F., Delgadillo, J., 1992.** Seasonality of oestrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod. *Small Rum. Res.* 8: 299-312.
- Corteel, J.M., 1973.** L'insemination artificielle caprine: bases physiologiques, état actuel et perspectives d'avenir. *World Rev. Anim. Prod.* 9: 73-99.
- Corteel, J.M., 1974.** Viabilité des spermatozoïdes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal: effet du glucose. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 14: 741-745.
- Corteel, J.M., 1975.** The use of progestagens to control the oestrus cycle of the dairy goat. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 15: 353-363.
- Corteel, J.M., 1976.** Variations de la motilité et de la fécondance des spermatozoïdes de bouc. *Ann. Zootech.* 25: 567-571.
- Corteel, J.M., 1978.** Seasonal variations in motility and fertilising ability of goat spermatozoa. *Anim. Breed. Abstr.* 46: 41.
- Corteel, J.M., 1980.** Effets du plasma séminal sur la survie et la fertilité des spermatozoïdes conservés in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 20: 1111-1123.
- Corteel, J.M., 1981.** Collection, processing and artificial insemination of

goat semen. In: C. Gall (Ed.) Goat production, Academic Press, London, 171-191.

Corteel, J.M., Baril, G., 1975. Effet du "lavage" sur la conservation des spermatozoides de bouc a basse temperature. *Elevage et insemination* 146: 26-30.

Corteel, J.M., Leboeuf, B., Baril, G., 1988. Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Rum. Res.* 1: 19-35.

Courtens, J.L., Nunes, J.F., Corteel, J.M., 1984. Induction of the acrosome reaction in the spermatozoa of the goat by secretions of the male accessory glands and milk. *Gamete Research* 9: 287-302.

Das, K.K., Rajkonwar, C.K., 1994. Morphological changes of acrosome during equilibration and after freezing of buck semen with raffinose egg yolk glycerol extender. *Indian Vet. J.* 71: 1098-1102.

Das, K.K., Rajkonwar, C.K., 1996. Acrosomal changes of buck spermatozoa after equilibration and freezing in egg yolk citrate glycerol extender. *Indian Vet. J.* 73: 35-40.

Daudu, C.S., 1984. Spermatozoa output, testicular sperm reserve and epididymal storage capacity of the Red Sokoto goats indigenous to northern Nigeria. *Theriogenology* 21: 317-324.

Deka, B.C., Rao, A.R., 1985a. Effect of extenders on freezability of buck semen. *Indian J. Anim. Sci.* 55: 1038-1040.

Deka, B.C., Rao, A.R., 1985b. Effect of extenders on sperm motility and acrosomal integrity of frozen buck semen. *Indian Vet. J.* 62: 414-417.

Deka, B.C., Rao, A.R., 1986a. Effect of egg-yolk levels on quality on frozen buck semen. *Indian Vet. J.* 63: 909-912.

Deka, B.C., Rao, A.R., 1986b. Effect of glycerol level in Tris-based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. *Theriogenology* 26: 231-240.

Deka, B.C., Rao, A.R., 1986c. Motility of buck spermatozoa during preservation at 5°C with and without seminal plasma. *Indian Vet. J.* 63.

169-170.

Deka, B.C., Rao, A.R., 1987a. Effect of cooling time on quality of frozen goat semen. *Indian J. Anim. Reprod.* 8: 25-27.

Deka, B.C., Rao, A.R., 1987b. Effect of storage at -196°C on quality of goat semen frozen with and without seminal plasma in Tris based extender. *Cheiron* 16: 65-69.

Deka, B.C., Rao, A.R., 1987c. Effect of extender and thawing method on post thawing preservation of goat semen. *Indian Vet. J.* 64: 591-594.

Deka, B.C., Rao, A.R., 1989. Effect of washing on the fertility of frozen goat semen. *Indian Vet. J.* 66: 268-269.

Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P., 1991. Decrease in the seasonality of sexual behaviour and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology* 36: 755-770.

Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P., 1992a. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. *Small Rum. Res.* 9: 47-59.

Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P., 1993. Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles. *Reprod. Nutr. Dev.* 33: 609-617.

Deshpande, S.B., Mehta, V.M., 1991. Effect of dilutors and different glycerol levels on pre-freeze sperm motility and live sperm count in Surti buck semen. *Indian J. Anim. Sci.* 61: 1093-1095.

Drilleau, L., 1991. Comment grouper les mise-bas precoces. *La Chevre* 186: 17-19.

Drobnis, E.Z., Nelson, E.A., Burrell, M.J., 1980. Effect of several variables on motility and glutamic oxalacetic transaminases levels for frozen goat semen. II. *Washing. J. Anim. Sci.* 51: 439-440.

Dunner, S., 1993. Freezing buck semen diluted in amine-organic buffers. *Anim. Prod.* 56: 387-391.

Dunner, S., Vazquez, I., 1991. Effets de milieux de conservation a base de

substances amino-organiques sur la qualite de la semence de bouc mesuree in vitro apres conservation a +15°C ou +5°C. *Arch. Zootec.* 40: 391-401.

Eaton, O.N., Simmons, V.L., 1952. A semen study of goats. *Am. J. Vet. Res.* 13: 537-544.

Feliciano-Silva, A.E.D., Nunes, J.F., Riera, G.S., 1992. Características espermáticas relacionadas con la morfología escrotal en caprinos de la raza Moxoto en el Nordeste del Brasil. *Terra Arida* 11: 121-126.

Freitas, V.J.F., Baril, G., Saumande, J., 1996. Induction and synchronization of oestrus in goats: the relative efficiency of one versus two fluorogestone acetate-impregnated vaginal sponges. *Theriogenology* 46: 1251-1256.

Fresno, M., Martín, M., Capote, J., Corbella, M., Darmanin, N., China, N., 1992. Caracterización de los tipos étnicos de la Agrupación Caprina Canaria respecto a la fracción nitrogenada de la leche, calcio y fósforo. *Terra Árida* 11: 83-98.

Gibbons, A., Cueto, M., Willems, P., 1992. Inseminación artificial con semen congelado en cabras de raza Angora, sobre los celos concentrados post incorporación del efecto macho. *Revista de Medicina Veterinaria Buenos Aires* 73: 122-128.

Godfrey, S.I., Walkden-Brown, S.W., Martin, G.B., Speijers, E.J., 1996. Immunization of goat bucks against GnRH to prevent seasonal reproductive and agonistic behaviour. *Anim. Reprod. Sci.* 44: 41-54.

González-Stagnaro, C., 1975a. Inseminación artificial en cabras con semen congelado. *Ciencias Veterinarias, Venezuela* 5: 85-103.

González-Stagnaro, C., 1975b. Inseminación artificial en cabras con semen congelado. *Zootecnia* 24: 151-163.

González-Stagnaro, C., García, B.O., Castillo, J., 1974. Actividad sexual estacional y fertilidad en cabras de razas puras de una zona tropical de Venezuela. *Ciencias veterinarias, Venezuela* 4: 233-248.

González-Stagnaro, C., García, B.O., Castillo, M.J., 1975. Inseminación artificial en cabras con semen congelado importado. *Ciencias Veterinarias, Venezuela* 5: 119-140.



- Goonewardene, L.A., Whitmore, W., Jaeger, S., Borchet, T., Okine, E., Ashmawy, O., Emond, S., 1997. Effect of prebreeding maintenance diet on subsequent reproduction by artificial insemination in Alpine and Saanen goats. *Theriogenology* 48: 151-159.
- Greyling, J.P.C., Grobbelaar, J.A.N., 1983. Seasonal variation in semen quality of Boer and Angora goat rams using different collection techniques. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 13: 250-252.
- Howland, B.E., Sandford, L.M., Palmer, W.M., 1985. Changes in the serum levels of LH, FSH, prolactin, testosterone and cortisol associated with season and mating in male Pygmy goats. *J. Androl.* 6: 89-96.
- Ibrahim, S.A.M., Yousri, R.M., 1992. The effect of dietary zinc, season and breed on semen quality and body weight in goats. *Int. J. Anim. Sci.* 7: 5-12.
- Iritani, A., Nishikawa, Y., 1962. Studies on the egg-yolk coagulating factor (enzyme) in goat semen III. Coagulation action to the fraccionated yolk. *Veterinary Zootechnology* 17: 322-325.
- Iritani, A., Nishikawa, Y., 1963. Studies on the egg-yolk coagulating enzymes in goat semen. III. Release of some acids accompanied by the coagulating phenomena. *Jap. J. Anim. Reprod.* 8: 109-112.
- Iritani, A., Nishikawa, Y., 1964. Studies on the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen IV. On the chemical properties of the ejaculated semen and the secretion of accessory sexual organs in the goat. *Jap. J. Anim. Reprod.* 10: 44-51.
- Iritani, A., Nishikawa, Y., 1972. Studies on the egg-yolk coagulating enzyme (phospholipase) in goat semen. IX. Enzyme concentration in the semen collected from the Cowper's gland-removed goat. *Mem. Coll. Agr. Kyoto Univ.* 101: 57-63.
- Iritani, A., Nishikawa, Y., Fukuhara, R., 1961. Studies on the egg-yolk coagulating factor in goat semen I. Localization of the coagulating factor and decline of pH following coagulation. In: Proc. Silver Jubilee Lab. Anim. Husb., Kyoto Univ., 89-96.
- Iritani, A., Nishikawa, Y., Nagasawa, S., 1964. Studies on the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen VII. Variations in the enzyme activity

of the semen between breeding season and non-breeding season, and in each ejaculate collected three times successively. *Jap. J. Anim. Reprod.* 10: 52-56.

Jordana, J., Sánchez, A., Jansa, M., Mahe, M.F., Grosclaude, F., 1991. Estudio comparativo de razas caprinas españolas en relación a las variantes de la caseína as1. *I.T.E.A.* 11: 598-600.

Joseph, M., Nai, K.P., 1989. Effect of frequency of ejaculation on semen characteristics, libido and fertility in cross-bred bucks. *Indian J. Anim. Reprod.* 10: 127-133.

Karatzas, G., Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Brikas, P., 1997. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology* 48: 1049-1059.

Kishore, P-N., Rao, A.R., 1983. Effect of induced testicular degeneration on semen characteristics of bucks. *Indian Vet. J.* 60: 281-286.

La Chevre, 1992. Traitement éponge/PMSG répété: une étude dans 19 élevages. *La Chevre* 189: 19-21.

Lawrenz, R., 1986. Artificial insemination of Angora and Boer goats with frozen semen. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 57: 109-111.

Lima, S., Vanini-de-Moraes, G., Marques-Moreira, H.L., Fonseca-de-Masedo-de, A., Pego-de-Macedo, L.G., 1994. Availacao de epocas do ano sobre as características do semen antes e apos a congelação. *Revista UNIMAR* 16: 181-194.

Llewelyn, C.A., Oгаа, J.S., y Obwolo, M.J., 1993. Plasma progesterone profiles and variation in cyclic ovarian activity throughout the year in indigenous goats in Zimbabwe. *Anim. Reprod. Sci.* 30: 301-311.

Loubser, P.G., Niekerk-van, C.H., 1983. Seasonal changes in sexual activity and semen quality in the Angora ram. 2. Semen volume, quality and freezability. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 13: 161-163.

Loubser, P.G., Greyling, J.P.C., Viljoen, K.S., 1983a. Artificial insemination of Angora goat does with pelleted deep-frozen semen. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 13: 134-135.

- Loubser, P.G., Niekerk-van, C.H., Botha, L.J.J., 1983b. Seasonal changes in sexual activity and semen quality in the Angora ram. 1. Libido and male hormone concentrations. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 13: 131-133.
- Machado, R., Simplicio, A.A., 1994. Sincronização do estro em cabras usando cloprostenol. Modificações ovarianas e fertilidade após inseminação artificial. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 18: 81-91.
- Maeda, K.I., Mori, Y., Kano, Y., 1986. Superior cervical ganglionectomy prevents gonadal regression and increased plasma prolactin concentrations induced by long days in goats. *J. Endocr.* 110: 137-144.
- Maeda, K.I., Mori, Y., Kano, Y., 1988. Involvement of melatonin in the seasonal changes of the gonadal function and prolactin secretion in female goats. *Reprod. Nutr. Dev.* 28: 487-497.
- Malpaux, B., Maurice-Mandon, F., Daveau, A., Chemineau, P., 1995. Utilisation de la lumière et de la melatonine pour la maîtrise de la reproduction des ovins et des caprins. Dans: II Rencontres Autour des Recherches sur les Ruminants, Institut de l'Élevage, Paris, 379-385.
- Mann, J., 1981. Spermatological investigations in African dwarf goats (*Capra hircus* L.) kept in Germany. *Anim. Res. Develop.* 14: 86-100.
- M.A.P.A., 1985. Manual de Normas Técnicas para la Congelación de Semen en la Especie Bovina, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, 11-14.
- Martin, G.B., Walkden-Brown, S.W., 1995. Nutritional influences on reproduction in mature male sheep and goats. *J. Reprod. Fert.* 49: 437-449.
- Martin, G.B., Walkden-Brown, S.W., Boukhlip, R., Tjondronegoro, S., Miller, D.W., Fisher, J.S., Hötzel, M.J., Restall, B.J., Adams, N.R., 1994. Non-photoperiodic inputs into seasonal breeding in male ruminants. In: K.G. Davey, R.E. Peter, S.S. Tobe (Ed.), Perspectives in Comparative Endocrinology, National Research Council of Canada, Ottawa, 574-585.
- Martin, G.B., Walkden-Brown, S.W., Scaramuzi, R.J., Nancarrow, C.D., Doberska, C., 1995. Nutritional influences on reproduction in mature male sheep and goats. *J. Reprod. Fert.* 49: 437-449.
- Matthew, J., Raja, C.K.S.V., Nair, K.P., 1984. Preservation of buck

- semen in Tris yolk diluent. *Indian Vet. J.* 61: 964-968.
- Meco, J., 1992.** Los ovicaprinos paleocanarios de Villaverde, Dirección General de Patrimonio Histórico, Viceconsejería de Cultura y Deportes, Gobierno de Canarias.
- Meco, J., 1994.** Orígenes de la cabra paleo-canaria de Villaverde (Fuerteventura), Excmo. Cabildo Insular de Fuerteventura.
- Memon, M.A., Bretzlaff, K.N., Ott, R.S., 1985.** Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen thawed goat spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 46: 473-475.
- Memon, M.A., Bretzlaff, K.N., Ott, R.S., 1986.** Comparison of semen collection techniques in goats. *Theriogenology*, 26: 823-827.
- Misra, D.N., Deka, B.C., Borgohain, B.N., 1996.** Effect of glycerol on preservation of goat semen at +5°C. *Int. J. Anim. Sci.* 11: 319-321.
- Mittal, J.P., 1982.** Seasonal variation in semen quality of Barbari bucks. *Indian Vet. J.* 59: 957-959.
- Mittal, J.P., 1985.** Libido and semen quality of Jamnapari bucks under arid conditions. *Indian Vet. J.* 62: 179.
- Mittal, J.P., 1986.** Reproductive characteristics of indigenous and crossbred bucks maintained under desert conditions. *Indian J. Anim. Sci.* 56: 688-692.
- Mittal, J.P., 1987a.** Male reproductive characteristics of indigenous and crossbred goats under Indian arid zone. *Indian J. Anim. Sci.* 57: 158-161.
- Mittal, J.P., 1987b.** Male reproductive characteristics of the Beetal goat in the Indian arid zone. *Indian Vet. J.* 64: 575-578.
- Mittal, J.P., Ghosh, P.K., 1985.** Characteristics of Parbatsar breed of goat from Rajasthan desert. *Indian J. Anim. Sci.* 55: 673-678.
- Mohan, G.N.K., Majumder, N.K., Goswami, K.K., 1980.** Note of semen characteristics in Indian Pashmira goats. *Indian J. Anim. Sci.* 50: 898-900.
- Moore, R.W., Lynch, P.R., Miller, C.M., Bigham, M.L., Bowen, G.M., 1987.** Synchronization of female goats for artificial insemination and

- natural mating. *Annual Report 1985-1986*, Ministry of Agriculture and Fisheries of New Zealand, Research Division, Wellington, 83-84. Abstract.
- Mukherjee, T.K., Nelson, E.A., 1987.** Comparison of two diluents for freezing semen of local and F1 goats. *Pertanika* 10: 113-116.
- Okere, C., Chiboka, O., Montsma, G., 1986.** Effect of frequent ejaculation of West African dwarf goat on semen characteristics. *Anim. Reprod. Sci.* 11: 249-258.
- Ozsar, S., Guven, B., Celebi, M., Kalkandelen, G., Van de Wiel, D.F.M., 1990.** Testosterone and LH concentrations in the male Angora goat during puberty. *Anim. Reprod. Sci.* 23: 319-326.
- Patil, R.V., Raja, C.K.S.V., 1978.** Effect of season on the semen characteristics of Malabari bucks. *Indian Vet. J.* 55: 761-766.
- Patil, R.K., Kaikini, A.S., 1992.** Effect of scrotal insulation of increasing duration on the semen picture and testicular and epididymal tissue in goats. In: *XII Int. Congr. Anim. Reprod.*, The Hage, 1740-1742.
- Pérez, B., Mateos, E., 1996.** Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malagueña breeds. *Small Rum. Res.* 22: 163-168.
- Pérez, B., Mateos, E., 1997.** Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malagueña breeds. *Small Rum. Res.* 23: 23-28.
- Pérez, B., Mateos, E., Pintado, B., 1991.** Características seminales del ganado caprino de la raza Verata. *I.T.E.A.* 11: 40-42.
- Peskovatskov, A.P., 1985.** Artificial insemination of goats using frozen semen. *Ovtsevodstvo* 4: 19. Abstract.
- Pintado-Sanjuanbenito, B., Pérez-Llano, B., 1992.** Effect of glutaraldehyde concentration and fixative temperature on the number of spermatozoa with normal acrosomes in goat semen. *Theriogenology* 38: 527-533.
- Pintado, B., Pérez, B., Gil, L., 1991a.** Efecto de 5 diluyentes en la conservación in vitro de semen de macho cabrío Verato. *I.T.E.A.* 11: 31.

- Pintado, M.B., Pérez, B., Gil, L., 1991b.** Efecto del método de congelación sobre la calidad in vitro del semen de macho cabrío Verato. *Av. Aliment. Mej. Anim.* 31: 269-272.
- Pintado, B., Pérez-Llano, B., Gil, L., Gutiérrez, A., 1992.** Seasonal evolution of in vitro viability from goat ejaculates during freezing. In: XII Int. Congr. Anim. Reprod., The Hage, 1478-1480.
- Prasad, S.P., 1981.** Conception rate with goat milk as semen dilutor in Barbari goats in different seasons. *Indian J. Anim. Sci.* 51: 1056-1058.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A., 1974.** Glutaraldehyde fixations of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology* 1: 638-641.
- Reddy, K.K., Rao, A.R., Rao, P.N., Krishnamacharyulu, E., 1989.** Effect of season and age on the seminal attributes of local bucks. *Indian J. Anim. Sci.* 59: 107-109.
- Ritar, A.J., 1991.** Seasonal changes in LH, androgens and testes in the male Angora goat. *Theriogenology* 36: 959-972.
- Ritar, A.J., Ball, P.D., 1991.** Fertility of young cashmere goats after laparoscopic insemination. *J. Agr. Sci.* 117: 271-273.
- Ritar, A.J., Ball, P.D., 1993.** The effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at a high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 31: 249-262.
- Ritar, A.J., Salamon, S., 1982.** Effects of seminal plasma and its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* 35: 305-312.
- Ritar, A.J., Salamon, S., 1983.** Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* 36: 49-59.
- Ritar, A.J., Salamon, S., 1991.** Effect of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. *Small Rum. Res.* 4: 29-37.
- Ritar, A.J., Maxwell, W.M.C., Salamon, S., 1984.** Ovulation and LH secretion in the goat after intravaginal progestagen sponge-PMSG treatment. *J. Reprod. Fert.*, 72: 559-563.

- Ritar, A.J., Salamon, S., Ball, P.D., O'May, P.J., 1989. Ovulation and fertility in goats after intravaginal device-PMSG treatment. *Small Rum. Res.* 2: 323-331.
- Ritar, A.J., Ball, P.D., O'May, P.J., 1990a. Artificial insemination of cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. *Reprod. Fert. Develop.* 2: 377-384.
- Ritar, A.J., Ball, P.D., O'May, P.J., 1990b. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reprod. Fert. Develop.* 2: 27-34.
- Ritar, A.J., Mendoza, G., Salamon, S., White, I.G., 1992. Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (*Capra hircus*). *J. Reprod. Fert.* 95: 97-102.
- Roca, J., 1989. Parámetros reproductivos del macho cabrío de raza Murciano-Granadina. Estudio experimental. Tesis. Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia.
- Roca, J., Martínez, E., Vázquez, J.M., Coy, P., 1992a. Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. *Anim. Reprod. Sci.* 29: 255-262.
- Roca, J., Martínez, E., Sánchez-Valverde, M.A., Ruiz, S., Vázquez, J.M., 1992b. Seasonal variations of semen quality in male goats: study of sperm abnormalities. *Theriogenology* 38: 115-125.
- Rossouw, A.F., 1974. 'N voorlopige mededeling oor die bevriësing van Boerboksemen. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 4: 165-166. Abstract.
- Roy, A., 1957. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature* 179: 318-319.
- Salisbury, G.W., Vandemark, N.L., Lodge, J.R., 1978. Principles and techniques of freezing spermatozoa. In: Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle. Freeman and Company, San Francisco, 494-538.
- Sahni, K.L., 1987. Practical aspect of artificial insemination of goats in India. In: IV International Conference on Goats, EMBRAPA-DDT, Brasilia, Vol. I: 549-569.

Sahni, K.L.; Roy, A., 1972a. A note on seasonal variation in the occurrence of abnormal spermatozoa in different breeds of sheep and goat under tropical conditions. *Indian J. Anim. Sci.* 42: 501-504.

Sahni, K.L.; Roy, A., 1972b. A note on the application of cold-shock test for determining the resistance (quality) of sheep and goat spermatozoa. *Indian J. Anim. Sci.* 42: 498-501.

Sahni, K.L.; Roy, A., 1972c. A note on the effect of two storage temperatures on the keeping quality of sheep and goat semen in different diluents. *Indian J. Anim. Sci.* 42: 580-583.

Sahni, K.L.; Roy, A., 1972d. A study on the effect of deep-freezing (-79°C) on post-thawing revival of sheep and goat spermatozoa. *Indian J. Anim. Sci.* 42: 102-105.

Salamon, S., Ritar, A.J., 1982. Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 35: 295-303.

Samouilidis, S., Hahn, R., 1972. Ein Beitrag zur Tiefkühlkonservierung von Schaf- und Ziegenbocksamen mit Hilfe des Paillettenverfahrens. *Zuchthygiene* 7: 111-116.

Samouilidis, S., Hahn, R., Foukos, A., Tsakalof, P., 1982a. Die Befruchtungsfähigkeit von elfjährigem Ziegenbocktiefkühlsperma. *Zuchthygiene* 17: 9-12.

Saxena, V.B., Tripathi, S.S., 1980. Note on physico-chemical and morphological attributes of semen of Jamnapari bucks. *Indian J. Anim. Sci.* 50: 775-777.

Shelton, M., 1978. Reproduction and breeding of goats. *J. Dairy Sci.* 61: 994-1010.

Simplicio, A.A., Machado, R., 1991a. Fertilidade em cabras inseminadas com semen congelado durante o estro natural ou sincronizado com MGA, eCG e cloprostenol. Em: IX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Colegio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, Vol. II: 362.

Simplicio, A.A., Machado, R., 1991b. Fertilidade em cabras inseminadas com semen congelado durante o estro natural ou sincronizado com MGA,

hCG e cloprostenol. Em: IX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Colegio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, Vol. II: 363.

Singh, L.P., Purbey, L.N., 1994. Effect of season on reaction time and physical characteristics of indigenous buck semen. *Indian Vet. J.* 71: 729-730.

Singh, L.P., Purbey, L.N., 1996. Preservability of goat spermatozoa in Tris and citrate extenders at -196°C and 5°C . *Indian J. Anim. Sci.* 66: 1139-1141.

Singh, L.P., Meur, S.K., Purbey, L.N., 1993. Leakage of transaminases during preservation of buck semen. *Indian J. Anim. Sci.* 63: 963-965.

Singh, M.P., Sinha, A.K., Singh, B.K., 1995. Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology* 43: 1047-1053.

Singh, M.P., Sinha, A.K., Singh, B.K., Prasad, R.L., 1996. Effect of cryoprotectans on release of various enzymes from buck spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 45: 405-416.

Sinha, N.K., Wani, G.M., Sahni, K.L., 1981. Effect of seasons and age on seminal attributes of Jamnapari bucks. *Indian Vet. J.* 58: 963-965.

Sinha, S.N., Singh, B.K., Sinha, A.K., 1987. Post-thaw motility and fertility of frozen sperms of bucks of different breeds. *Indian J. Anim. Reprod.* 8: 28-31.

Sinha, S., Deka, B.C., Tamuli, M.K., Borgohain, B.N., 1991. Effect of extenders on quality of frozen goat semen. *Indian J. Anim. Reprod.* 12: 146-148.

Sinha, M.P., Sinha, A.K., Singh, B.K., 1995. Effect of methylxanthines on motility and fertility of frozen-thawed goat semen. *Theriogenology* 44: 907-914.

Sinha, M.P., Sinha, A.K., Singh, B.K., Prasad, R.L., 1996. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Anim. Reprod. Sci.* 41: 237-243.

Skalet, L.H., Rodrigues, H.D., Goyal, H.O., Maloney, M.A., Vig, M.M.,

Noble, R.C., 1988. Effects of age and season on the type and occurrence of sperm abnormalities in Nubian bucks. *Am. J. Vet. Res.* 49: 1284-1289.

Strohmeier, M., 1988. Tiefgefrierung von Ziegenbocksperma unter besonderer Berücksichtigung der Saisonalität sowie der Zentrifugation und der Verwendung eines Detergens. Thesis. Tierärztliche Hochschule, Hannover. Abstract.

Suga, T., Takahashi, T., Higaki, S., 1972. Studies on uterine secretions in the cow. III Time of insemination and longevity of spermatozoa in the genital tract of the cow and goat. *Bulletin of the National Institute of Animal Industry, Japan* 25: 1-9.

Summermatter, P., Fuschini, E., 1995. Spermaproduktion bei Bocken von schweizerischen Ziegenrassen. *Reprod. Domest. Anim.* 30: 129-132.

Tamanini, C., Bono, G., Cairolì, F., Chiesa, F., 1985. Endocrine responses induced in anoestrus goats by the administration of different hormones after a fluorogestone acetate treatment. *Anim. Reprod. Sci.* 9: 357-364.

Tuli, R.K., Holtz, W., 1992. The effect of zwitterion buffers on the freezability of Boer goat semen. *Theriogenology* 37: 947-951.

Tuli, R.K., Holtz, W., 1994. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology* 42: 547-555.

Tuli, R.K., Holtz, W., 1995. Effect of season on the freezability of Boer goat semen in the northern temperate zone. *Theriogenology* 43: 1359-1363.

Tuli, R.K., Schmidt-Baulain, R., Holtz, W., 1991. Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxalacetic transaminase in frozen semen from Boer goats. *Anim. Reprod. Sci.* 25: 125-131.

Waide, Y., Niwa, T., Asanuma, R., 1977. Studies on preservation of liquid and frozen semen of domestic animals. 3. Viability and fertility of frozen goat spermatozoa. *Jap. J. Anim. Reprod.* 23: 129-137.

Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Henniawati, 1993. The male effect in the Australian cashmere goat. 3. Enhancement with buck nutrition and the use of oestrus females. *Anim. Reprod. Sci.* 32: 69-84.

Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Norton, B.W., Scaramuzzi, R.J., Martin, G.B., 1994a. Effect of nutrition on seasonal patterns of LH, FSH and testosterone concentration, testicular mass, sebaceous gland volume and odour in Australian cashmere goats. *J. Reprod. Fert.* 102: 351-360.

Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Norton, B.W., Scaramuzzi, R.J., 1994b. The "female effect" in Australian cashmere goats: effect of season and quality of diet on the LH and testosterone response of bucks to oestrus does. *J. Reprod. Fert.* 100: 521-531.

Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Taylor, W.A., 1994c. Testicular and epididymal sperm content in grazing cashmere bucks: seasonal variation and prediction from measurements in vivo. *Reprod. Fert. Develop.* 6: 727-736.

Watson, P.F., 1975. Use of Giemsa stain to detect changes in the acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet. Rec.* 97: 12-14.

Westhuysen-van der, J.M., 1978. Observations on the deep-freezing of Angora goat semen. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 8: 111-113.

Westhuysen-van der, J.M., Wentzel, D., Viljoen, K.S., Loubser, P.G., 1980. Conception rates of Angora ewes inseminated with deep frozen semen. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 10: 237-238.

Yokoki, Y., Ogasa, A., 1977. Effects of hyperthermia on semen production in goats. *Jap. J. Anim. Reprod* 23: 93-98.

9. ABREVIATURAS EMPLEADAS

Abs	Absorbancia de una muestra registrada mediante un espectrofotómetro
A.C.C.	Agrupación Caprina Canaria.
ANOVA	Análisis de varianza.
Cc	Concentración espermática en spz/ml.
CIDR	Dispositivo interno controlado, liberador de fármaco.
C.U.E.	Diluyente de la Universidad de Cornell.
E	Factor estación o época de recogida.
E-Mt	Interacción entre la estación o época de recogida, y el método de congelación.
eCG	Gonadotropina coriónica equina o PMSG.
EYCE	Enzima coaguladora de la yema de huevo.
FGA	Acetato de fluorogestona
FSH	Hormona estimuladora de los folículos
hCG	Gonadotropina coriónica humana.
IMV	Instruments de Médecine Vétérinaire, Francia.
L	Diluyente cuya base es la leche desnatada en polvo.
LH	Hormona luteinizante
LL	Método de congelación del semen, que incluye el “lavado” de los espermatozoides con SL y su dilución en L.
M	Factor individual, animal o macho.
mE	Factor mes dentro de estación.
M-E	Interacción macho-estación o macho-época de recogida.
M-Mt	Interacción macho-método de congelación.

MIPF	Motilidad individual progresiva en el semen fresco.
MIPD	Motilidad individual progresiva en el semen descongelado.
MPA	Acetato de medroxiprogesterona.
Mt	Factor método de congelación.
NEE	Número de espermatozoides por eyaculado.
NEME	Número de espermatozoides móviles por eyaculado.
θ	Variable surgida de la transformación de otra expresada en porcentaje.
p	Valor de una variable expresada en porcentaje, y que será sujeto a transformación arcossénica para cumplir los requisitos del análisis de varianza.
p	Nivel de significación.
PEAN	Porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal tras la descongelación.
PEV	Porcentaje de espermatozoides vivos tras la descongelación.
PMSG	Gonadotropina del suero de la yegua preñada o eCG.
SD	Desviación estándar.
SL	Solución de “lavado” según Corteel (1974).
spz	Espermatozoides
T	Solución de “lavado” cuyo componente principal es el Tris, y que a su vez sirvió de base para la preparación de los diluyentes T-1.5, T-6 y T-12.
T-1.5	Diluyente cuya base es el Tris (T), con un 1,5% de yema de huevo.
T-6	Diluyente cuya base es el Tris (T), con un 6% de yema de huevo.

T-12	Diluyente cuya base es el Tris (T), con un 12% de yema de huevo.
Tmax	Temperatura máxima.
Tmed	Temperatura media.
Tmin	Temperatura mínima.
tC	Tiempo de conservación del semen congelado en nitrógeno líquido.
TL-1.5	Método de congelación que consiste en “lavar” el semen en T y diluirlo en T-1.5.
TL-6	Método de congelación que consiste en “lavar” el semen en T y diluirlo en T-6.
TL-12	Método de congelación que consiste en “lavar” el semen en T y diluirlo en T-12.
Tris	Abreviatura del Tris (hidroximetil) aminometano, o del diluyente cuyo componente principal es éste.
TX-1.5	Método de congelación que consiste en diluir el semen íntegro (sin “lavar”) en T-1.5.
TX-6	Método de congelación que consiste en diluir el semen íntegro (sin “lavar”) en T-6.
TX-12	Método de congelación que consiste en diluir el semen íntegro (sin “lavar”) en T-12.
VE	Volumen del eyaculado