



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

108  
22j

INSEMINACION ARTIFICIAL EN GANADO CAPRINO  
(REVISION BIBLIOGRAFICA)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

CARLOS ALBERTO MORENO VELAZQUEZ

**m.v.z.**

Asesor: José de Lucas Tron

México, D. F.

1984



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**"INSEMINACION ARTIFICIAL EN GANADO CAPRINO"**

**(REVISION BIBLIOGRAFICA).**

**Presentado por el;**

**PMVZ. Carlos Alberto Moreno Velázquez.**

**ASESOR:**

**M.V.Z. José de Lucas Tron.**

## I N D I C E .

	PAG.
Capítulo I. INTRODUCCION.....	1
Capítulo II. RECOLECCION DE SEMEN.....	4
2.1 Electroeyacuación.	
2.2 Vagina Artificial.	
Capítulo III. EVALUACION DE SEMEN.....	10
III.I Características Macroscópicas.	
3.1.1 Volumen.	
3.1.2 Color y Densidad.	
3.1.3 pH.	
III.II Características Microscópicas.	
3.2.1 Motilidad.	
3.2.2 Concentración.	
3.2.3 Determinación de vivos y muertos.	
3.2.4 Determinación de espermatozoides anormales.	
Capítulo IV. DILUYENTES DEL SEMEN.....	26
4.1 Tipos de Diluyentes.	
4.2 Diluciones.	
Capítulo V. FORMAS DE CONSERVACION DEL SEMEN.....	35
5.1 Utilización inmediata (Fresco).	
5.2 Utilización en el transcurso del día (Refrigerado).	
5.3 Días o meses después de la recolección (Congelado).	

Capítulo VI.	LA INSEMINACION ARTIFICIAL.....	40.
6.1	Detección de Hembras en celo.	
6.2	Preparación del semen.	
6.3	Técnica Inseminador.	
Capítulo VII.	FACTORES QUE PUEDEN AFECTAR LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA	
7.1	Fallas Humanas.....	44.
7.1.1	Momento óptimo de la inseminación.	
7.1.2	Detección de celo.	
7.1.3	Concentración espermática a inseminar.	
7.1.4	Número de inseminaciones.	
7.1.5	Técnica inseminador.	
7.1.6	Sitio de deposición del semen.	
7.1.7	Epoca de recolección.	
7.1.8	Epoca de inseminación.	
7.1.9	Inseminación y la inducción o sincronización de celo.	
7.2	Fallas relacionadas con los animales.....	49.
	(Factores Bioclimáticos).	
7.2.1	Estación.	
7.2.2	Altas temperaturas.	
7.2.3	Edad.	
7.2.4	Raza.	
7.2.5	Nutrición.	
7.2.6	Líbido.	
CONCLUSIONES.....		53.
APENDICES (1,2,3,4).....		54.
BIBLIOGRAFIA.....		64.

## I. INTRODUCCION.

La inseminación artificial (I.A.), es una de las prácticas de manejo reproductivo más valiosas para el productor caprino. Debido a que se hace un uso eficaz de la producción espermática del macho, con el objeto de mejorar su producción a través de la utilización de animales genéticamente superiores. Es una de las técnicas más avanzadas, con un proceso histórico largo por lo que es difícil precisar el origen de éste método de fecundación. De acuerdo con las leyendas, parece que en la época pastoril se practicó la I.A. en ovejas, trasladando el semen del donante a la hembra receptora. Así como en los ovinos se considera a la URSS pionera de dicho método de reproducción animal, Francia lo es en las cabras. Actualmente se encuentra difundida en todo el mundo debido entre otras cosas a las posibilidades de conservación del semen caprino por largos períodos (Rodríguez, 1978).

La inseminación artificial, es uno de los adelantos en materia de producción animal que más beneficios le han dado al hombre, debido al mejoramiento genético rápido logrado en las especies domésticas (Foote, 1980), y que se han traducido en aumento de productos como son: pelo, leche o carne en la cabra.

La I.A. es una técnica que consiste concretamente en recolectar semen de individuos seleccionados, y que de acuerdo a sus características macroscópicas y microscópicas es diluido de tal forma que pueda ser utilizado a partir de una extracción en una gran cantidad de hembras. Según Bretzlaff (1983), la I.A. es el simple proceso de la deposición manual de semen dentro del tracto genital de una hembra,

que ha sido previamente elegida con la intención de que tanto la concepción como la preñez ocurran y prosigan normalmente.

Las especies domésticas en que mayor difusión ha tenido la I.A. son sin lugar a duda: los bovinos con 90,000,000 de inseminaciones representando el 95% del total; seguido por los ovinos con 50,000,000, siendo menor en especies como los cerdos con 6,000,000, cabras con 15,000 y equinos (Foote, 1982).

La cabra es una especie que tradicionalmente ha sido relegada, debido a que se crearon leyendas en torno a ella como la generadora de erosión o por transmitir la Brucelosis o Fiebre de Malta (Arbiza, 1978). Este y otros aspectos, como el ser un animal de pobres, provocaron la falta de investigación profunda y consistente comparada con la hecha en otros animales domésticos. Sin embargo, la inseminación artificial caprina parece haber alcanzado una etapa económica importante en Europa (Eaton-Simmons, 1952).

La cabra ha demostrado ser un animal de una gran adaptación y con buenas posibilidades de producción, además de que puede lograr esto último bajo condiciones que son difíciles o prácticamente imposibles para otras especies. Es por esto, que en años recientes se ha desarrollado una intensa investigación y existe bastante información sobre todo en países como Noruega, Francia y EE.UU., con diversas razas, principalmente de origen suizo (Corteel, 1975a).

Se han estudiado los diversos aspectos que conciernen a la I.A. como son las formas de recolección y evaluación de semen, los diluyentes y sustancias crioprotectoras, así como variaciones en sus concentraciones. De igual forma se han revisado los aspectos que influyen



en la eficiencia de la inseminación y nuevas técnicas para la misma.

La información referente a la especie caprina en países de habla hispana es aún escasa, no obstante que en los últimos años ha despertado un enorme interés en todo el mundo, todavía se encuentra dispersa y difícil de consultar en este idioma. En éstos países el problema es agudo debido a la escasez de material e investigación, siendo por otra parte zonas potencialmente importantes para el desarrollo y aporte de productos en ésta especie. Un ejemplo claro de esto es México, que cuenta con una población considerable de cabras (Alrededor de 9 millones) y con bastas áreas aptas para su crianza, sin embargo, las producciones son pobres y se desconocen los sistemas más elementales de manejo reproductivo, sanitario y nutricional. De ésta forma, países como Francia con una población muy inferior es más eficiente, a manera de ejemplo baste decir que su producción láctea fué casi de 600 mil toneladas en 1981 (FAO), mientras que en México sóloamente 280 mil toneladas.

El presente trabajo tiene como objetivo llenar parte de la falta de información, a través de la recopilación de la investigación mundial sobre la inseminación artificial, con el objeto de que en un futuro cercano pueda extenderse ésta técnica y ser participes de sus beneficios. Por otro lado, el trabajo es continuación de las investigaciones bibliográficas previas; de Pérez Razo y de Lucas (1981) y Vega y Pérez Durán (1983).

## II. RECOLECCION DE SEMEN.

En la recolección de semen, los dos métodos más empleados son la electroeyaculación y la vagina artificial. Antiguamente se utilizaba la recolección vaginal pero presentaba entre otros problemas; pérdidas de semen y contaminación con descargas vaginales. Es por esto que han sido eliminados y sólo se trabaja con los dos sistemas señalados anteriormente que son descritos a continuación.

2.1 Electroeyaculación: Es una técnica que se basa en la estimulación de los nervios simpáticos lumbares y sacros dependientes del pudendo a través de descargas eléctricas, que provocan la erección, protusión y eyaculación. La técnica consiste en introducir por vía rectal un electrodo bipolar o electrodos multipolares, los cuales de acuerdo al aparato están conectados a un transformador que permite descargas rítmicas y controladas por el operador hasta que eyacula el animal. La electroeyaculación es un método fácil que requiere de un equipo mínimo el cual puede ser fácilmente utilizado. La elaboración y utilización del electrodo bipolar rectal, representa un progreso considerable en la colección de esperma por estimulación eléctrica. Este método de la electroeyaculación fué puesto en práctica por el australiano Gunn en 1936, seguido por el italiano Bonnadona en 1938, y por Falconianu en 1940 en Rumanía; actualmente es empleado en diferentes países (Rodríguez, 1978).

Los electroeyaculadores utilizados generalmente tienen una salida de 10 a 15 volts y se requieren normalmente de tres estímulos 2, 5 y 8 respectivamente para obtener la eyaculación (Dziuk, et al., 1954; Austin et al., 1968). Los primeros estímulos rítmicos son de 2 a 5 volts y los

últimos duran 5 segundos; el voltaje es gradualmente aumentado hasta producir la eyaculación, la cual ocurre por lo general a los 8 volts (Smith, 1980).

Antes de iniciar la recolección del semen, es recomendable remover la suciedad del pene limpiando el prepucio. La colección se puede realizar estando el animal de pie o recostado.

Existen algunos trabajos que nos muestran las desventajas de la electroeyaculación con respecto a la utilización de la vagina artificial, en cuanto a las características seminales entre las que destacan las siguientes:

- a) El semen obtenido con electroeyaculador contiene una mayor cantidad de plasma seminal, es decir, mayor volumen con menor concentración. El aumento de plasma seminal por lo tanto reduce la resistencia del espermatozoide al choque por frío, disminuyendo la supervivencia espermática al descongelado (Austin, et al., 1963).
- b) No existe una buena respuesta a los estímulos eléctricos si se desea una segunda o tercera recolección, además del peligro de contaminación con orina de la muestra de semen, se ha encontrado una gran concentración de sodio y potasio tanto en espermias como en plasma seminal (Quinn-White citados por Memon y Ott, 1981).

Existen también ventajas en cuanto al uso de la electroeyaculación ya que bajo ciertas condiciones se prefiere como método de colección de semen, que la vagina artificial. Se utiliza en machos que han quedado inválidos, que tienen una actividad sexual baja debido a la edad o que por otras razones son incapaces de servir a una vagina artificial (Bearden-Fuquay, 1982). Algunos machos cabríos nunca muestran ninguna conducta sexual y su semen no puede ser recolectado con

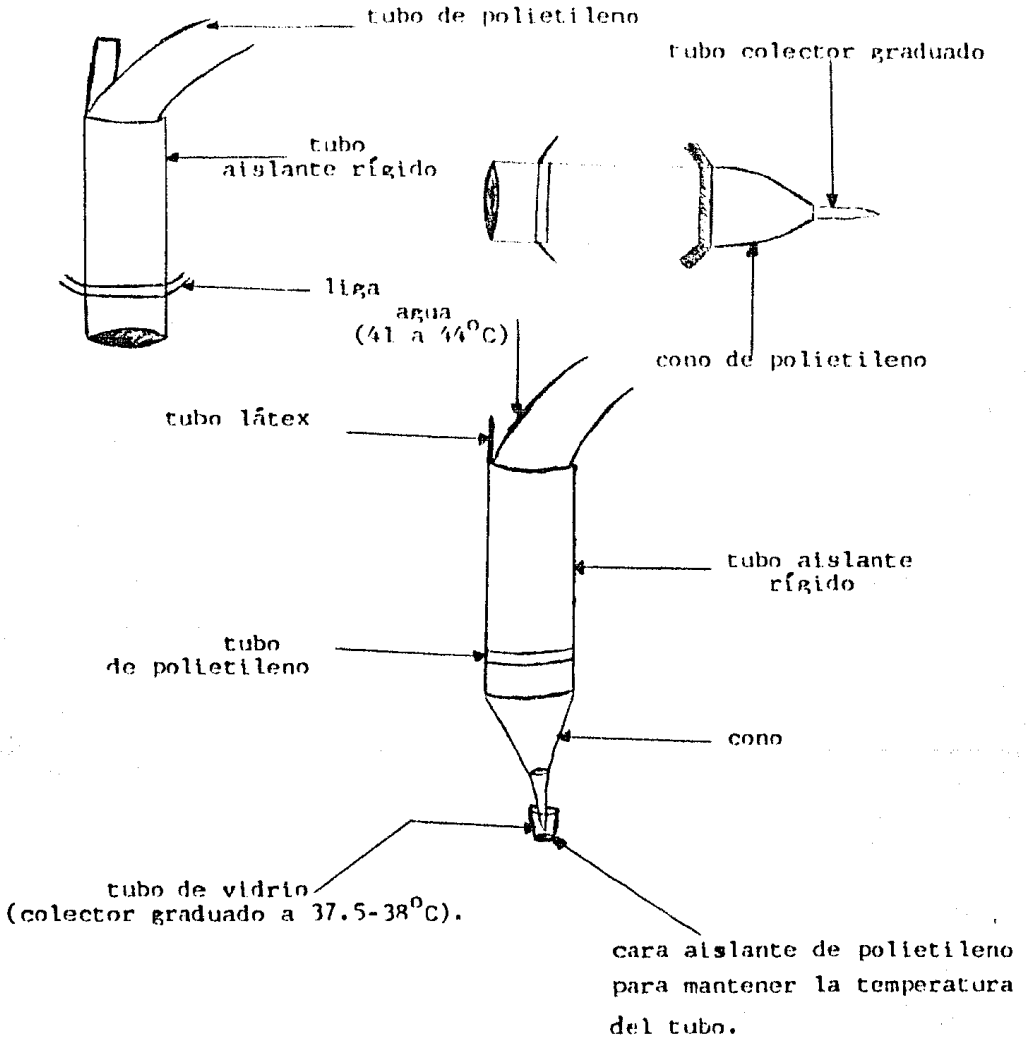
vagina artificial. Esta proporción es aproximadamente del 8.7% y ha sido tomada al azar utilizando 46 cabras de raza saanen y alpina las cuales no mostraron libido a los 6 meses de edad (Leboeuf, citado por Corteel, 1981).

**2.2 Vagina Artificial:** Es el método preferido para la recolección de semen (Smith, 1980). Es una técnica rápida e higiénica siendo una buena imitación de la vagina natural (Bearden-Fuquay, 1982). Sin duda es un método sencillo pero requiere conocerse bien, para no tener problemas tanto en la fase de preparación como en la de recolección de semen. Existen varios modelos y tamaños de vaginas dependiendo entre otras cosas del país donde han sido desarrolladas. A continuación se describe una de las que pueden ser empleadas:

La vagina artificial para caprinos, consiste en emplear un tubo aislante de unos 15 a 20 cm. de largo y 3.5 a 5 cm. de diámetro al cual se le coloca un tubo de látex y uno de polietileno, sujetados firmemente por un extremo y por el otro. Se le agrega agua a una temperatura de unos 41 a 44°C hasta llenar y sujetando el otro extremo formar una cámara, como se aprecia en la secuencia de figuras. En uno de los extremos se coloca un pequeño cono del mismo material al cual se encuentra unido el tubo colector que debe estar a una temperatura de 37.5 a 38°C. Antes de la recolección del semen se debe aplicar por la parte interna de la vagina artificial, un lubricante no tóxico, estéril y la temperatura durante la colección debe ser como se mencionó antes alrededor de los 41 a 44°C, por lo que se le agrega a la vagina artificial agua con una temperatura ligeramente superior (50°C). La alta temperatura puede provocar lesiones en el pene y la baja que el animal se muestre renuente a efectuar las montas. También se le dá presión aplicando aire con la boca o con una bomba manual dependiendo

del tipo de vagina que se utilice (Smith, 1980).

Material que se utiliza para la Vagina Artificial.



Se recomienda que el tubo colector se encuentre cubierto por un aislante que mantenga la temperatura a 38°C (Sumergido en baño María o sacado de la estufa), protegerlo de la luz y evitar que el esperma tenga contacto con el agua (Smith, 1980).

Para la recolección de semen con ésta técnica, debe realizarse un entrenamiento a los machos desde temprana edad y frecuentemente la colección de semen debe de ser mantenida a intervalos regulares a lo largo del año. La mayoría de los machos pueden ser entrenados fácilmente con hembras en celo, las cuales son previamente ovariectomizadas y estrogenizadas. La estimulación y preparación sexual con las falsas montas, pueden aumentar la cantidad y la calidad del eyaculado (Hafs, citado por Memon y Ott, 1981).

Para la recolección de semen normalmente la vagina artificial es sostenida con la mano derecha entre las piernas del animal, dirigida a un ángulo de 45° para que en la erección del pene ésta sea introducida aplicando ligera presión con la mano izquierda. Después de la eyaculación la vagina artificial se coloca con la boca hacia arriba, de manera que el semen drene hacia el tubo colector (Rodríguez, 1978). Debido a que los machos poseen un lapso muy breve de reacción, el colector debe estar preparado para trabajar con rapidez colocando y sujetando la vagina artificial correctamente (Baker, 1978).

En base a los trabajos reportados, se puede deducir que el método de elección para la recolección de semen por sus características seminales es la vagina artificial (Memon y Ott, 1981).

A continuación se muestran algunas diferencias en cuanto a muestras de semen colectadas por ambos métodos mencionados anteriormente, siendo notoria la diferencia sobre todo en volumen seminal.

Características de muestras de semen colectadas por medio de  
Vagina Artificial (V.A.) y ElectroEyaculador (E.E.).

	<u>V.A.</u>	<u>E.E.</u>
Número de muestras.....	119	119
Volumen, ml.....	.84	1.98
Concentración espermática X $10^6$ /ml..	2,456	1,197
Total de espermatozoides X $10^6$ .....	2,050	2,354
Motilidad proporcional.....	3.85	3.51
% de motilidad espermática.....	80	75
% de espermatozoides vivos.....	79.5	87.1
% de espermatozoides normales.....	92.8	93.7

Tomado de Austin, et al., (1968).

### III. EVALUACION DE SEMEN.

El semen ha sido estudiado muy intensamente desde la introducción y desarrollo de la inseminación artificial. Se han realizado investigaciones en los diferentes aspectos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, así como numerosos métodos de coloración; todo esto con el objeto de determinar y pronosticar la fertilidad del macho (Zemjanis, 1981).

Para una buena fertilidad en la hembra, se requiere de una adecuada producción de semen por parte del macho. Un gran número de espermatozoides de alta calidad es indispensable para el éxito del apareamiento natural o la inseminación artificial. Se ha obtenido éxito utilizando dosis que contengan aproximadamente de 100 a 125 X 10<sup>6</sup> espermatozoides normales (Corteel, 1976).

La evaluación de semen para un mejor estudio es conveniente dividirla en 2 grupos: Características macroscópicas y Características microscópicas.

#### III.I CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS.

Estas constan de la evaluación del volumen, densidad, color y pH de un eyaculado.

3.1.1 Volumen: El volumen seminal en los caprinos es normalmente de 0.7 a 2.0 ml con un promedio de 1.0 ml. Aunque se han observado variaciones que van de 0.25 hasta 5 ml (Memon y Ott, 1981).

El volumen del eyaculado es medido utilizando un tubo de ensayo graduado durante la colección. El semen en los caprinos posee un bajo



volumen con alta concentración de espermatozoides (Eaton-Simmons, 1952; Fraser, 1962; Hulet y Shelton, 1980).

Se ha observado que el volumen seminal varía de acuerdo a la época del año (Corteel, 1977). Pero cuando el volumen tiene fluctuaciones, lo que realmente varía es la calidad del plasma seminal (Corteel, 1981). Existen otras causas que modifican el volumen y que son discutidas posteriormente.

T A B L A 1

Características de un semen normal y especificaciones de Inseminación Artificial para Cabras.

	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>
Volumen (ml)....	.8 a 1.0	0.1-1.5	0.5-1.0	0.94 0.32
Conc. esp. X 10 <sup>9</sup> ..	4 a 5	2-6	2.5-3	3420 140.3
Motilidad (%).....	3.5-4.0 (70-80%)	60-80	80-85	60 17.9
Esp. anorm. (%)..	16 a 20	11	3-15	5.8 2.9
Esp./Inseminación .	150 a 300	100-150	125	---
Vol/Inseminación ..	0.2	0.02-0.2	0.2	---
Sitio de Insem. ..	Cérvix	Cérvix o Utero	Cérvix.	Cérvix.

- I) Tomado de Corteel,(1981).
- II) " " Hulet y Shelton (1980).
- III) " " Smith (1980).
- IV) " " Trejo et al., (1983).

3.1.2 Color y Densidad: Al momento de obtener el semen, podemos observar su color blanco o pajizo con aspecto cremoso, y su viscosidad que varía de fina a gruesa dependiendo entre otras cosas del número de espermatozoides. Las variaciones pueden indicar una serie de anomalías como por ejemplo; un color lechoso está asociado a baja concentración de espermatozoides, el caso contrario sería un color cremoso. Esto lo podemos encontrar a la observación visual. Por el color podemos también detectar anomalías como por ejemplo; una coloración roja o rosa indica presencia de sangre o un color amarillo puede estar asociado con orina o pus (Rodríguez, 1978). Las fuentes de sangre pueden ser lesiones del prepucio, pene, glándulas sexuales accesorias, epidídimo, testículos y del aparato urinario (riñones, vejiga urinaria y uretra).

La densidad o consistencia del semen depende de la relación entre la parte celular y la plasmática, coincidiendo estrechamente con el color. En otras especies se ha encontrado que entre el color y la concentración, existe una gran relación cosa similar sucede en cabras pero que no ha sido cuantificado como en ovinos o bovinos (Holy, 1983).

3.1.3 pH: Una prueba anexa de valor práctico muy discutida es la comprobación del pH del eyaculado, como indicador del grado de la calidad del semen.

La evaluación exacta es posible hacerla con la ayuda del medidor - del pH, con microelectrodos o con papeles indicadores graduados que brindan un margen de errores relativamente pequeños (Holy, 1983).

El pH en caprinos como en otros mamíferos es ligeramente ácido por lo que se considera como normal un pH de 6.6 (Varshney, et al., 1977). Valores más altos indican por lo general una mayor secreción de las glándulas accesorias del tracto genital (como sucede en la electroeyaculación

o bien puede ser a consecuencia de orina en el eyaculado.

### III.II CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS.

Como vemos la observación del semen al microscopio, nos ayuda a complementar la evaluación que se inició en forma macroscópica por lo que exige un personal de laboratorio especializado y con experiencia, el equipo correspondiente y medio ambiente constante (temperatura) especialmente cuando se trabaja con semen vivo.

La valoración del semen al microscopio comprende dos etapas. La primera, que requiere atención inmediata que incluye el examen del semen fresco no teñido. La otra, que puede hacerse después, consiste en el examen del frotis teñido (Zemjanis, 1981).

Son 4 las características que se buscan con mayor interés: la motilidad, concentración, % de vivos y muertos y el % de espermatozoides anormales. Aunque esto no quita el poder hacer otras pruebas, generalmente de menor importancia para el objetivo de la Inseminación Artificial. A continuación se hace una breve descripción de la forma para evaluar cada una de ésta características.

**3.2.1 Motilidad:** Se considera que la prueba de motilidad proporciona datos muy importantes acerca de la calidad del semen. La técnica comprende el manejo de células vivas que son extremadamente sensibles a influencias extrínsecas. Estas pueden destruir las células espermáticas o perjudicar y alterar su motilidad. Es recomendable protegerse contra la adición de agua, sustancias químicas y soluciones no isotónicas con el semen (Zemjanis, 1981).

En los caprinos una motilidad del 85% o más es lo deseable en un

eyaculado; y menos del 60% se considera inadecuada (Smith, 1980). La motilidad como en otras especies se puede evaluar a través de:

- 1) Motilidad masal.
- 2) Motilidad progresiva.
- 3) Microfotografía.
- 4) Métodos electrónicos.

En la muestra de semen vivo, se valora el movimiento masivo de los espermatozoides, con el fin de establecer un valor de movimiento de células espermáticas vivas lo que es de extraordinaria importancia para la dilución final del semen (Holy, 1983).

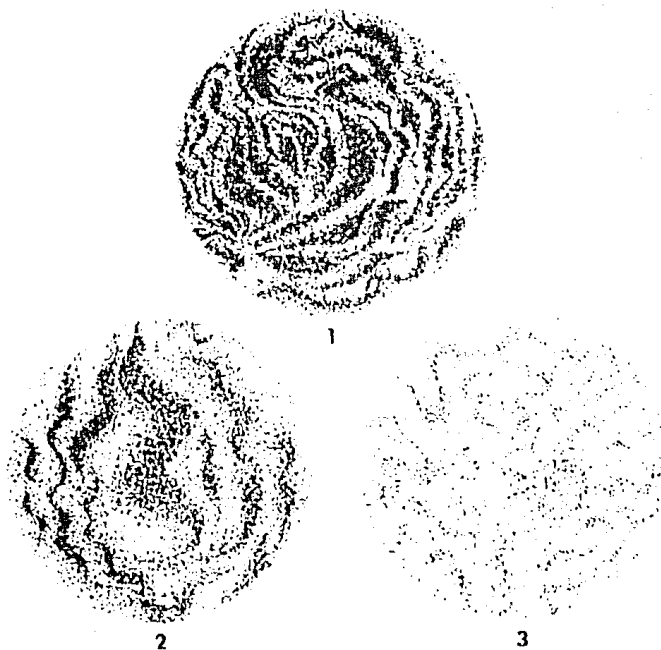
La motilidad masal, consiste en colocar una gota de semen no diluido en un portaobjetos que previamente ha sido calentado a 37 - 40°C, en cajas térmicas o platinas calentables y observar en el microscopio con un aumento de 10 X 10 y 10 X 40 (Holy, 1983).

La actividad masal es normalmente descrita por grado o valor que va de 0 a 5 como se muestra en la tabla II (Salisbury-Vandermark, 1978; y Campbell-Lasley, 1975). Es una de las pruebas más ampliamente usadas - para la calidad seminal (Cortee, 1977).

El movimiento masivo también está caracterizado por la presentación de remolinos y ondas espermáticas que se forman y desaparecen rápidamente (Fig. 1). Como en otras especies según la intensidad del movimiento de los remolinos y las ondas, se valoran tanto la densidad como el % de los espermatozoides vivos y el grado de su actividad. Cuanto mayor es la intensidad en la formación de los remolinos y ondas, tanto más grande es la motilidad y el número de espermatozoides móviles (Holy, 1983).

Evaluación Microscópica.

FIG. 1



Evaluación microscópica de la densidad del semen en gota según la formación de remolinos (aumento microscópico menos de 100).

- 1.- Semen muy denso con un contenido de más de 1 millón de epz./ml<sup>3</sup>.
- 2.- Semen denso con la concentración de 0.3 a 1 millón de epz./ml<sup>3</sup>.
- 3.- Semen con baja densidad alrededor de 0.5 de millón de epz./ml<sup>3</sup>.

Tomado de Holy, (1983).

T A B L A II.

<u>(%) Porcentaje</u>	<u>Escala Numérica</u>	<u>Característica.</u>
0	0	No hay motilidad.
30%	1	<u>Pobre motilidad.</u> - menos del 30% resultando en una motilidad pesada y lenta.
15-30%	2	<u>Poca motilidad.</u> - sólo se mueve un 30 a 50%, el mov. es lento y oscilatorio, no hay ondas ni remolinos.
50-70%	3	<u>Buena motilidad.</u> - el 50-70% de las células están en mov., éste es vigoroso, las ondas y remolinos se mueven lentamente.
70-80%	4	<u>Muy buena.</u> - los espermatozoides se encuentran en mov. rápido y vigoroso. Ondas y remolinos forman una gota rápida.
80%	5	<u>Excelente.</u> - el 80% o más de los espermatozoides presentan movimiento vigoroso, los giro y remolinos son rápidos y cambiantes.

Tomado de Salisbury-Vandermark, (1978)  
y Campbell-Lasley, (1975).

Una variación a la determinación de la motilidad, es la de diluir el semen en un preparado de citrato de sodio al 2.9% (9.9 c.c. de solución de citrato y 0.1 c.c. de semen lo que dá una dilución de 1:100) y nuevamente observar en el objetivo de 40 X 10; se lo conoce como motilidad progresiva. Las determinaciones igual que el caso anterior, son en forma subjetiva y varía entre técnicos, por lo cual se hacen determinaciones aproximadas en porcentaje o valor. Es recomendable que el exámen del semen se haga lo más pronto posible después de la recolección (Salisbury-Vandermark, 1978).

El objetivo de diluir el semen es el de poder observar y evaluar la motilidad individual. Igual que en el caso anterior, dado que la evaluación es subjetiva se necesita cierto grado de experiencia. Se ha tratado de establecer los distintos tipos de movimiento de los espermatozoides, algunos de los que han sido mencionados son:

- 1) Movimiento rectilíneo.
- 2) Movimiento oscilante (el espermatozoide se mueve sin cambiar de lugar).
- 3) Movimiento circular.
- 4) Movimiento retroactivo.
- 5) Sin movimiento.

Tomado de Holy,(1983).

La motilidad progresiva no significa lo mismo que fertilidad, pero se le ha asociado con ella. Todos los otros tipos de movimiento generalmente confirman una mala calidad de semen. La comprobación del movimiento individual es posible realizarla en una fina capa de semen puro, o mejor todavía en semen diluído (Holy, 1983).

Para poder utilizar el semen en la I.A., el eyaculado debe tener

por lo menos del 65 al 70% de movimiento o más; niveles más bajos no son recomendables utilizarlos (Smith, 1980).

Durante el exámen microscópico del semen, hay que tener en cuenta también la aglutinación de espermatozoides que se presenta en algunos eyaculados y puede disminuir la posibilidad de fecundación del semen. Como en otras especies la aglutinación se puede encontrar en tres grados:

Primer grado: Se representa por la aglutinación de 2 a 8 espermatozoides, que se acercan con las cabezas hacia el centro y forman una estrecha línea.

Segundo grado: Se caracteriza por la acumulación de un número mayor de espermatozoides en forma de glóbulos irregulares. El movimiento del eyaculado se encuentra disminuído.

Tercer grado: Concentra grandes agrupaciones de espermatozoides aglutinados, desapareciendo prácticamente todo el movimiento progresivo.

La etiología de la aglutinación es muy variable y hace falta tener en cuenta, tanto los cambios de potencial eléctrico como los factores nutritivos, infecciosos o inmunobiológicos (Holy, 1983).

La determinación por medios fotográficos parece ser uno de los métodos más sensibles respecto a la evaluación de la motilidad (Elliot, et al., 1973; Revell y Wood, 1978). Existen variaciones en las técnicas pero el principio es el mismo.

La descrita por Revell y Wood (1978), consiste en diluir semen a  $20 \times 10^6$ /ml y fotografiar en campo oscuro. El movimiento de los espermatozoides marca durante la exposición de un segundo, destellos que se proceden luego a contar, para hacer los cálculos correspondientes.



**3.2.2 Concentración:** La concentración es el segundo parámetro fundamental para determinar la futura dilución del semen. Esto se refiere al número de espermatozoides/volumen seminal. Aunque se puede dar una serie de variaciones debidas a efectos raciales, estacionales o de otro tipo, es normal encontrar de 2 a 6 mil millones de espermatozoides/ml (Hulet y Shelton, 1980).

Eyaculados con bajas concentraciones generalmente tienden a ser descartados debido a que pueden estar relacionados con las bajas fertildades, en algunas ocasiones se pueden relacionar éstos con problemas infecciosos (Corteel, 1976).

La Concentración se puede medir por 2 métodos. El directo que utiliza un Hematocitómetro o Cámara de Spencer y el indirecto a través de la utilización del espectrofotómetro (Holy, 1983).

Para la realización del primer método se utilizan normalmente diluciones de 1:200 o 1:400, debido al alto número de espermatozoides por volumen. Dos formas simples de hacerlo, pueden ser colocando 1 ml de la dilución 1:100 empleada para la evaluación de la motilidad progresiva y combinarlo con 1 ml de una solución de NaCl al 4% o con 1 ml de Rosa de Bengala. La otra forma es la utilización de la pipeta de dilución empleada para éstos fines.

Una vez realizada la dilución y de haberla agitado (normalmente en un agitador eléctrico), se procede a colocar unas gotas en el área marcada de la cámara. Acto seguido, se observa al microscopio hasta localizar la zona cuadrículada y se procede a contar los espermatozoides de 5 cuadros como se observan en la Fig. 2. Una recomendación es el de no considerar aquellos espermatozoides que estén tocando las líneas dobles de los cuadros que correspondan al lado derecho y a la base del cuadro.

La metodología, así como el material para evaluar la concentración se encuentran en el apéndice 1.

1				2
		5		
3				4

FIG. 2a

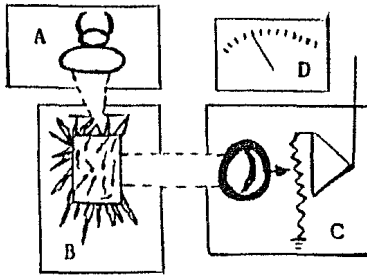
		5					
			2				
				3			
					4		
						5	

FIG. 2b.

Un método indirecto, consiste en la utilización de colorímetros fotoeléctricos que al determinar la densidad o capacidad de la transmitancia de la luz a través de un semen diluido, contra un valor estándar, permite precisar cuál es la concentración de espermatozoides.

El éxito de la utilización de éstos aparatos, radica en su calibración que tiene que hacerse comparando las muestras con el método directo del hematocitómetro o Cámara de Spencer. Una vez calibrado permite determinar concentraciones en forma rápida y eficaz (Foote, 1980). El principio en que se basa éste método se aprecia en la figura 3.

FIG. 3 Colorímetro Fotoeléctrico.



- A) Fuente de luz.
- B) Muestra.
- C) Celda fotoeléctrica.
- D) Pantalla de lectura.

Tomado de Foote, (1980).

**3.2.3 Determinación de vivos y muertos:** Esta corresponde a la segunda etapa de evaluación que involucra el teñido de los espermatozoides.

Se sabe que las cabezas de los espermatozoides muertos o en fase letal, tienen la propiedad de ser permeables a los colorantes, gracias a la perturbación de la permeabilidad de la membrana, mientras que los espermatozoides vivos y activos no permiten el paso de los colorantes por lo que permanecen sin teñirse (Holy, 1983).

El uso de colorantes como la Eosina-Nigrosina (apéndice 2) permiten identificar las células espermáticas muertas al momento de la tinción (Foote, 1980; Gomes, 1977).

Para efectuar la coloración se usa la solución acuosa de eosina al 5% y una solución acuosa de nigrosina al 10% como medio de contraste. Se cuentan 100 espermatozoides y se determina el porcentaje. El seguir la metodología descrita en el apéndice 2, puede ayudar a evitar errores como el de provocar mortalidad por mal manejo de semen y dar con esto resultados falsos (Sorensen, 1979).

En otras especies cuando el porcentaje de células espermáticas teñidas sobrepasan el 30% se considera que disminuye la fertilidad, y se recomienda eliminarlo. De igual forma el exámen diferencial de espermias vivos y muertos consiste en una serie de técnicas, de las cuales algunas es posible usarlas tanto en el semen diluído como en el congelado (Hackett y Macpherson, 1965). Los pasos para la preparación del frotis se muestran en el Apéndice 3.

**3.2.4 Determinación de Espermatozoides Anormales:** El espermatozoide puede realizar sus funciones biológicas fundamentales sólo cuando está

cualitativa y morfológicamente bien constituido, es decir, cuando posee la estructura típica de la cabeza, cuello, parte intermedia y cola; como se muestra en la figura 4 (Mukhfrie, 1966; Holy, 1983).

La posibilidad de fertilización del óvulo, depende de la composición y constitución de la cabeza que conduce la información genética y el sistema acrosomal. Sin embargo, ésta requiere de su sistema locomotor como son el cuello, parte intermedia y cola. Todas las características del espermatozoide exceptuando la parte media, varían considerablemente de acuerdo a la estación del año y temperatura (Srivastava, et al., 1980).

Igual que el método anterior, la coloración diferencial entre células vivas y muertas ya descrita, proporciona frotis teñidos que se utilizan en los estudios morfológicos. Por lo cual puede usarse el mismo frotis tanto para el recuento de células vivas y muertas como para descubrir células espermáticas anormales. Las anomalías pueden ser muy variadas y en diferentes partes de la estructura del espermatozoide, éstas pueden deberse a fallas en la espermatogénesis o en la espermiogénesis. Las más comunes se señalan a continuación y se muestran en la figura 4.

A) Anormalidades primarias.- éstas son el índice de los trastornos en la espermatogénesis e incluyen:

- anomalías de la cabeza.
- cabezas gigantes.
- cabezas pequeñas.
- cabezas piriformes.
- cabeza cónica y estrecha.
- otras desviaciones de forma y tamaño.

- cabezas anormales desprendidas.
- anomalías del cuello.
- unión del cuello fuera del eje.
- cuello doble.
- cuello espiral, deshilachado.
- cuello granular o hinchado.
- anomalías de la cola.
- cola estrechamente enrollada.
- colas dobles.

B) Anormalidades secundarias. - se cree que éstas formas presentan después de que ha completado la espermatogénesis, es decir, después de que el espermatozoide abandona los tubos seminíferos. Las influencias adversas sobre el semen colectado, como contaminación con orina o agua, exposición a cambios bruscos de temperatura y sustancias químicas, así como manipulaciones mecánicas toscas (Hathaway y Hartee citados por Mukh free, 1966) pueden producir algunas de las formas anormales como son:

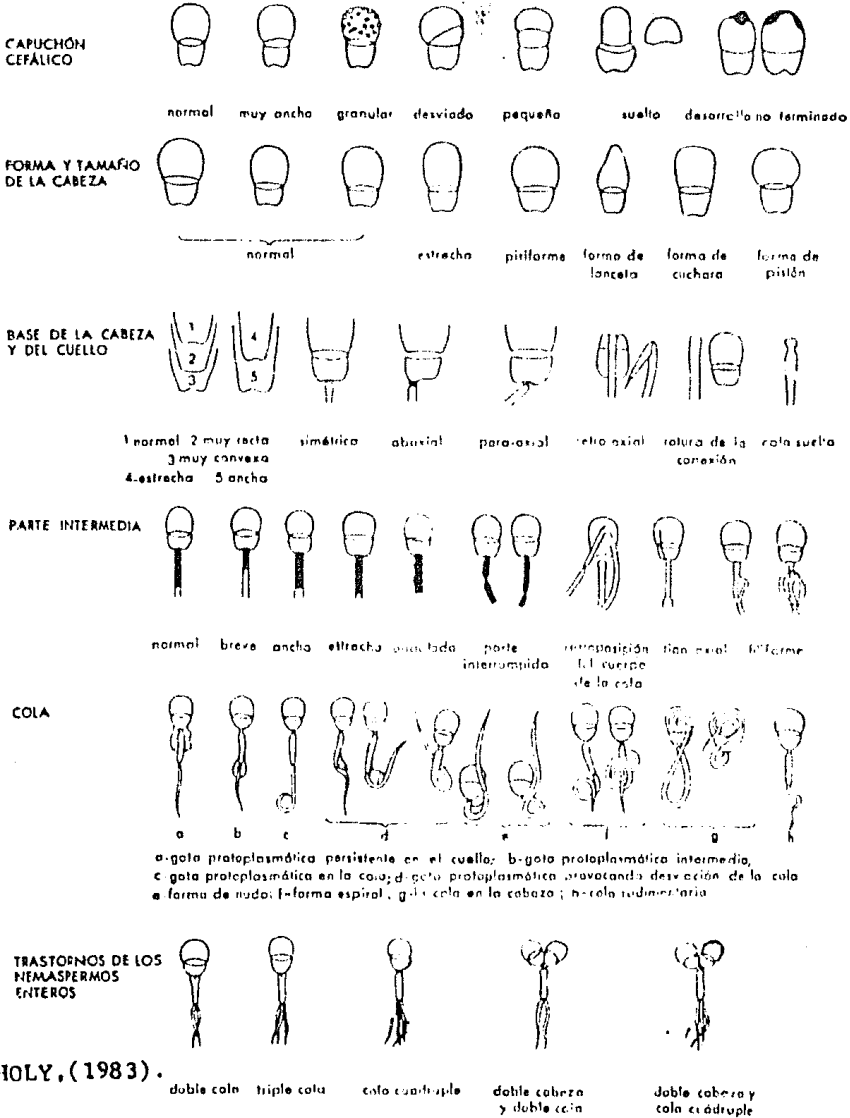
- cabezas normales separadas.
- colas flexionadas.

C) Otras anomalías. - encontramos las siguientes:

- espermátidas y espermatoцитos.
- cabezas de medusa.
- presencia de glóbulos blancos.
- presencia de glóbulos rojos o eritrocitos.

El semen en los caprinos contiene algunos espermatozoides anormales, pero no se asocia con baja fertilidad mientras que la proporción de anormales no sea mayor al 10% (Foote, 1980).

En el caso del acrosoma, se han empleado tinciones especiales como la Eosina B y Verde rápido FCF o tinción de Wells y ABBA (1968), en el cual el citoplasma se tiñe de rojo y el acrosoma de verde (Apéndice 2). También se utilizan para éste tipo de evaluación el microscopio de contraste de fases o el de interferencia (Footo, 1980).



#### IV. DILUYENTES DEL SEMEN.

Gran parte del éxito de la inseminación artificial en ésta especie, depende en gran medida del desarrollo de diluyentes satisfactorios del semen. Siendo el objetivo del medio proveer un apropiado volumen con un adecuado número de espermatozoides con alta fertilidad sin desperdicio de semen. Un diluyente satisfactorio de semen tiene que hacer algo más que incrementar el volumen de un eyaculado, el diluyente debe proteger a los espermatozoides durante el enfriamiento y/o prolongar su vida.

Podemos observar en los siguientes 7 puntos, las propiedades de un buen diluyente de semen (Memon y Ott, 1981).

- 1) Un diluyente debe ser isotónico al semen, es decir, tener la misma concentración de iones libres así como mantener la presión osmótica y el balance electrolítico.
- 2) Debe tener capacidad amortiguadora o sea evitar cambios de pH al neutralizar los ácidos; como el ácido láctico, producidos por el metabolismo de los espermatozoides.
- 3) Los diluyentes deben proteger a los espermatozoides contra los efectos letales del choque por frío, durante el enfriamiento y la congelación.
- 4) Debe proporcionar nutrientes como fuente de energía, para el metabolismo de los espermatozoides.
- 5) Debe contener antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano.
- 6) Los espermatozoides deben estar protegidos contra el daño durante la



congelación y descongelación, para lo cual se utiliza el glicerol (Corteel, 1973, 1974, 1975b, 1977).

7) El diluyente debe preservar la vida de los espermatozoides con un mínimo de efecto sobre la fertilidad, así como aumentar el volumen seminal a fin de multiplicar el número de inseminaciones (Foote, 1974).

Una vez obtenido el semen se plantea la necesidad de diluirlo, dado lo escaso del volumen y la alta concentración de espermatozoides en el mismo, si se utiliza como tal se complica mucho su manejo y reduce la posibilidad de inseminar un número mayor de cabras.

**4.1 Tipos de Diluyentes:** Los compuestos que han sido utilizados en la dilución del semen son múltiples, sin embargo, hasta el momento sólo pocos de ellos son los que han tenido un real éxito y utilización; son por un lado el que tiene como base la yema de huevo y el otro, que tiene como base a la leche descremada. Estos diluyentes han probado su eficacia al permitir su preservación por varios años con buenos niveles de fertilidad (Foote, 1974; Fraser, 1962; Memon y Ott, 1981).

Existen soluciones amortiguadoras en los diluyentes de semen, las cuales tienen un papel doble. Primero evitan cambios mínimos en el pH al neutralizar el ácido producido por la actividad metabólica de los espermatozoides, y segundo, la concentración adecuada de las sales amortiguadoras provoca un ambiente isotónico para los espermatozoides. Es conveniente que la sal que se utilice no sea tóxica cuando se usa a los niveles requeridos para isotonicidad. De los muchos compuestos y combinaciones de compuestos disponibles y que satisfacen

por lo menos uno de los tres criterios mencionados, se ha encontrado que sólo 3 soluciones amortiguadoras como lo menciona Bearden y Fuquay, (1982), pueden usarse satisfactoriamente como diluyentes de semen:

A) Solución amortiguadora fosfatada.- Este fué un componente del primer diluyente satisfactorio de semen que se comunicó en 1939. Aunque tiene una función amortiguadora tan satisfactoria como otras soluciones, el amortiguador de fosfato no ha sido muy popular debido a que produce una mezcla opaca cuando se añade a la yema de huevo, lo que causa visibilidad espermática deficiente. Es poco o nula su utilización práctica.

B) Solución amortiguadora de citrato.- En 1941, se descubrió la conveniencia del uso de la solución de citrato de sodio deshidratado como amortiguador de semen, utilizando normalmente soluciones al 2.9% (Luca 1965). Este amortiguador de citrato reemplazó rápidamente al amortiguador de fosfato en la preparación de diluyentes de semen. Cuando se mezcla con la yema de huevo, la deja bastante transparente como para visualizar fácilmente a los espermatozoides en forma individual.

C) Solución de amortiguador Tris.- Trabajos más recientes realizados en la raza angora, muestran la utilización de un diluyente que actualmente se está trabajando con buenos resultados. Este es el trihidroximetilaminometano (tris), el cual se ha estudiado con detalle como medio amortiguador, y parece ser de valor para prolongar la vida de los espermatozoides a la temperatura ambiente, a 5°C y a -196°C. Se ha encontrado que la supervivencia del espermatozoide, depende del tipo de azúcar que se añada al tris. Tanto glucosa como fructosa han resultado mejores componentes que la rafinosa y lactosa (Salamon y Ritar, 1982). Existen

un buen número de reportes sobre congelación de semen, utilizando los diluyentes a base de tris básico. Sin embargo, tris como componente principal en la dilución, no ha sido examinado a varias concentraciones o en combinación con otros agentes. Se ha estudiado que al igual que en el carnero, toro y verraco, el esperma del macho caprino puede tolerar relativamente un amplio rango de concentración de tris en la congelación. El tipo de azúcar incluido en el medio tris, tiene un efecto favorable en la supervivencia espermática (Salamon y Ritar, 1982).

El semen del macho caprino por lo general ha sido diluido en 2 formas; sin la adición de glicerol manteniendo el diluyente en un cuarto a temperatura elevada, y con la adición de glicerol al medio después de enfriar a 5°C por períodos que van de 2 a 3 horas (Corteel, 1975a), 5 horas o 6 a 18 horas (Salamon y Ritar 1982). Se ha visto que normalmente después de una dilución de semen con tris básico, un período de 30 minutos enfriando a 5°C es suficiente, pero el tiempo de equilibrio resulta ser de 4 horas a esa misma temperatura. El mejor porcentaje de supervivencia espermática después de descongelación, ha sido obtenido con una sola dilución utilizando de 1 a 5 horas a 5°C y con una concentración al 4% de glicerol en el semen diluido (Salamon y Ritar, 1982).

- Diluyente a base de Leche: La leche ha mostrado ser una base de diluyente muy efectiva en el semen caprino, tanto para ser utilizado en forma fresca como congelado (Corteel, 1981). Aparentemente la leche de ovejas, cabras o vacas pueden ser utilizadas., de hecho en Bulgaria Blokhuis (citado por Memon y Ott, 1981), señala que la leche de ésta última especie ha sido empleada en forma rutinaria en la inseminación artificial.

En general la forma más utilizada es la leche descremada diluida en una solución salina con Citrato de sodio y calentada por 10 minutos a una temperatura de 95°C, con el objeto de eliminar una enzima denominada Lacteuina que afecta a los espermatozoides; a este preparado se le adicionan en forma rutinaria antibióticos como la penicilina y estreptomictina o sulfonamidas. La adición de glucosa además de glicerol en proporciones del 4 al 7% han servido para congelar y mantenerlo con buenas tasas de fertilidad (Fraser, 1962; Corteel, 1974, 1981). En la parte de conservación se describe la metodología y en el cuadro 1, se muestra un ejemplo de diluyente a base de leche descremada.

C U A D R O 1

Diluyente a base de leche descremada para almacenar espermatozoides en forma líquida.

- Leche descremada de vaca con menos del 1% de grasa..... 100g.
- Glucosa.....0.194g.
- Agua destilada..... 100ml.
- Penicilina (sal sódica)..... 50,000UI.
- Sulfato de dihydroestreptomictina..... 0.050g.

Tomado de Corteel, (1981).

- Diluyente a base de Yema de Huevo: La utilización de la yema de huevo como base de diluyente, está ampliamente difundida quizá por las influencias de especies como los ovinos y los bovinos. Actualmente como lo señalan Memon y Ort, (1981), existen 2 escuelas; la primera utiliza a la yema de huevo sin dar ningún tratamiento al semen y según algunos investigadores citados por éste autor, las fertilidades van desde 60 a 92% con semen congelado y semen fresco respectivamente. La otra escuela afirma que la utilización del semen con los espermatozoides acompañados del plasma seminal, reaccionan (la parte producida por las glándulas bulbouretrales) con las lecitinas del huevo, siendo hidrolizadas por una fosfolipasa presente en el plasma produciendo ácidos grasos y lisolecitinas que son tóxicas al espermatozoide (Corteel, 1977). Es por lo anterior, que éstos investigadores recomiendan lo que se ha dado en llamar el lavado de los espermatozoides, que consiste en la adición de una solución salina fisiológica y someterlos a centrifugación de tal forma de separar el paquete celular (Ritar y Salamon, 1982). Las evidencias de investigadores como Corteel, (1974, 1975b, 1977, 1981, 1984) y otros en relación a la motilidad pre y posdescongelación así como de fertilidad, han mostrado ser superiores que las de experiencias con el eyaculado completo.

Salamon y Ritar, (1982), señalan que los problemas con el semen dependen del grado de concentración a que se utilice de yema en el medio, de tal forma que aquellas que van de 1.5 a 12% han mostrado ser según éstos investigadores márgenes adecuados, cuando tienen sal buffer al tris. Este último producto que significa trihidroxiaminometano, está siendo más utilizado como parte de diluyente de semen.

La yema de huevo ha sido utilizada en diferentes proporciones que van del 3 al 20%. Una fórmula que ha sido recomendada tanto para semen fresco como para semen congelado es la que se muestra a continuación, dando por entendido que las fracciones que se agregan, dependerán de si se congelarán o no. Las cantidades o fracciones adecuadas y la metodología aparecen en el Apéndice 4.

Almacenado a 5°C, ésta solución a 100 ml de tris-ácido cítrico; éstos diluyentes deben ser preparados poco antes de la congelación de semen.

			<u>Utilización.</u>
Dilución A.....	Tris-ácido cítrico	80%	Semen fresco.
	yema de huevo	20%	
Dilución B.....	Tris-ácido cítrico	76%	Semen congelado
	yema de huevo	20%	
	glicerol	4%	

Tomado de Nelson y Drobnis, (1981).

4.2 Diluciones: Una vez obtenido el semen y preparado nuestro diluyente, se procede a su dilución, por lo que requerimos los siguientes datos preliminares:

- a) Cuál es la concentración de espermatozoides que vamos a inseminar.
- b) Volumen del semen que tenemos.
- c) Concentración de éste semen.
- d) Porcentaje de motilidad.

e) Volumen de semen que vamos a inseminar.

Para el primer punto tenemos que se recomienda una concentración mínima de 100 a 125 X 10<sup>6</sup> (Smith, 1980; Corteel, 1976). Esta dosis es para la utilización de semen fresco y cabras en celo natural; para congelación se incrementa a 400 X 10<sup>6</sup> de espermatozoides móviles para cada inseminación (Moore, 1980; Nelson y Drobnis, 1981).

En cuanto al volumen, la concentración y la motilidad, se determinaron cuando se hizo la evaluación del semen asignándoles un puntaje o porcentaje.

Por último queda el volumen a inseminar; en éste punto existen diversidad de opiniones. Aparentemente es difícil introducir más de 0.2 ml de semen dentro del cérvix (Corteel, 1981; Smith, 1980), por lo cual es la dosis mínima recomendada (Moore, 1980; Hulet y Shelton, 1980). Sin embargo, algunos autores señalan que los caprinos requieren volúmenes superiores a 0.4 ml y pueden ir de 0.5 a 1.0 ml de semen diluido (Rodríguez, 1978), o bien que la dosis necesaria tanto de semen diluido o sin diluir va de 0.05 a 0.1 ml con fertilidad del 55 al 60% (Lunca, 1965).

Efecto de la motilidad en el número de espermatozoides móviles con sincronización de estro en época de cría con semen congelado.

( ) : Número de hembras.

Número de espermias móviles (10 <sup>6</sup> ).....	120	80	40
Volúmen a inseminar (ml).....	0.5	0.2	0.2
Porcentaje de parición.....	65.2 (322)	54.0(517)	42.5 (80).

Fuente: (Corteel, et al., 1975).

Para ejemplificar cómo se hace la dilución una vez que se tienen los datos anteriores, se muestra lo siguiente:

Volúmen/Concentración del eyaculado/Motilidad  
Número de espermatozoides a inseminar.

Ejemplo:  $\frac{1.2 \text{ c.c.} \times (2 \times 10^9) \times 80\%}{125 \times 10^6}$  15.36 dosis.

15.36 X 0.2 Volúmen de inseminación 3 ml.

3 ml - 1.2 c.c. 1.8.

Si se va a utilizar con semen fresco, ésto es lo que hay que agregar del diluyente, pero si se va a congelar ésto hay que dividirlo entre 2 lo que daría .9 de diluyente sin glicerol, y .9 con glicerol recordando que éste último debe guardar proporcionalmente lo que se haya decidido (6-9%) en el volúmen final.



## V. FORMAS DE CONSERVACION DE SEMEN.

El método de conservación del esperma junto con su calidad, resultan de los factores más importantes que rigen el uso de éste (Rodríguez, 1978).

El semen una vez diluido, puede ser utilizado en 3 formas principalmente:

- Inmediatamente, comprendiendo un tiempo de 30 minutos (Fresco).
- En el transcurso del día, 12 a 14 horas (Refrigerado).
- Días o meses después de la recolección (Congelado).

Para ésto se requieren diferentes formas de preservar el semen y que se describen a continuación:

5.1 La utilización inmediata.- requiere en muchas ocasiones de una evaluación subjetiva del semen, basándose en la consistencia y color del mismo para hacer la dilución. De otra manera se evalúa la concentración con un colorímetro, la motilidad nasal y se hace la dilución o no según se quiera. Lo importante es que su utilización debe realizarse dentro de los 30 minutos siguientes a la recolección (Smith, 1980).

Para mantener el semen con buenas posibilidades de fertilidad, debe permanecer de 30 a 37°C lo cual se puede lograr poniéndolo en un recipiente con un termo a baño María durante éste tiempo (Bretzlaff, 1983).

Una ventaja de la utilización de semen fresco, es que se requiere de un equipo muy sencillo como son: Vaginas artificiales, espéculo, tubo colector y micropipetas para la deposición del semen. La desventaja de éste método, es que la calidad del semen puede sólo

ser apreciada en forma visual por la turbulencia del semen a través del tubo colector, lo cual no es muy confiable. Otra desventaja, es la rapidez con que se necesita trabajar el semen para prevenir agotamiento y muerte seminal (Corteel, 1981).

5.2 Utilización del semen en el transcurso del día.- para esto se recomienda hacer la dilución a 30°C y de aquí bajarla a 5°C, en esta temperatura puede permanecer con buenos niveles de fertilidad.

Con la utilización de leche Baker (1978) menciona, que las muestras diluidas se enfriarán lentamente en el transcurso de 2 horas o más a 5°C. El semen diluido con leche descremada posee una duración de 12 horas aproximadamente (Corteel, 1981).

Los pasos a seguir para preparar el semen son los siguientes:

- a) Primero se hace la dilución semen-diluyente a 30°C, vertiendo éste último al semen.
- b) El recipiente se coloca con la dilución en un frasco con agua a la misma temperatura, y se refrigera o en un termo que contenga agua con hielo.
- c) Se debe tener la precaución de que el frasco con la dilución esté bien tapado y protegido de la luz, así como también evitar que durante el período de enfriamiento no esté en contacto con las paredes del refrigerador o del frasco que está en contacto con el hielo.
- d) Si el descenso de la temperatura se efectúa gradualmente, se debe alcanzar los 5°C a las 2 o 3½ horas. Enfriamientos más violentos lesionan los espermatozoides, ocasionando normalmente pérdida

irreversible en la motilidad (CorteeI, 1967). El punto más crítico para el choque por frío ocurre cuando se reduce la temperatura de 15 a 0°C (Bearden-Fuquay, 1982).

El tiempo de duración del semen en éstas condiciones, permite utilizarlo con buenos niveles de fertilidad entre las 16 y 24 horas de recolectado. El semen que se va a utilizar no requiere ser calentado, dado que son tan pequeñas dosis que se normaliza con la temperatura en el tracto reproductor femenino.

### 5.3 Utilización del semen días o meses después de la recolección:

Este requiere de sustancias crioprotectoras contra los efectos letales de la congelación, como es el caso del glicerol en el medio de preservación. Su acción es atribuida a la capacidad buffer salina que posee, por lo que el daño electrolítico que sufre el semen al congelarse es minimizado (Foote, 1974).

Baker (1978), recomienda la siguiente metodología para congelación:

- a) Mantener la leche estéril descremada en baño María a 35°C.
- b) Se hace la dilución del semen.
- c) Se inicia el glicerinado lo más pronto posible, de preferencia en menos de una hora. Esto se puede hacer a una temperatura ambiente de unos 22°C o en un cuarto frío a 5°C. Ha resultado satisfactorio agregar las fracciones en 4 cantidades aumentativas durante un período de 45 minutos.
- d) El equilibrio debe ser corto de unas 2 horas o más, durante el cual las muestras diluidas se enfriarán lentamente a 5°C para proceder a la congelación.

Los eyaculados sometidos a centrifugación, son lavados 2 veces en una solución de Krebs-Ringer-Fosfato-Glucosa y centrifugados a 20°C con 700 gravidades/15 minutos; el plasma seminal o sobrenadante es eliminado. Después de la segunda centrifugación, los espermatozoides son diluidos de la misma forma que los eyaculados no lavados. Sin embargo, al realizar los 2 lavados ocurre una pérdida hasta del 70% del total de los espermatozoides, de ahí que los franceses únicamente centrifugen semen de machos con volúmenes altos (mayores a 1.5 ml). Una vez eliminada la mayor parte del plasma seminal por el lavado, el porcentaje de espermatozoides móviles se ve mejorado después de la dilución, glicerización, equilibrio y sobre todo después de 120 minutos de incubación (Corteel, 1975a, 1975b, 1981).

El semen que se va a llevar a temperatura de congelación, se le agrega glicerol en una proporción que va del 6 al 9% a la dilución de leche o vema (Corteel, 1977; Hulet y Shelton, 1980; Smith, 1980; Shelton, 1978). Es importante tomar en consideración como ya se mencionó el porcentaje de glicerol sobre el volumen final, para que no altere nuestra dilución calculada y evitar de ésta manera mayor volumen con menor cantidad de espermas. De ahí al semen se le dá un período de reposo conocido como tiempo de equilibrio, en el cual existen diversas opiniones al respecto. Se calcula de 1½ a 3 horas en caprinos (Fraser, 1962; Corteel, 1974, 1975a, 1975b). Según Hulet y Shelton (1980) debe ser de 1 a 2 horas o más. Baker (1978) y Smith, (1980) lo calculan entre 4 y 5 horas. Las muestras pueden equilibrarse antes o después de colocarse en el envase final.

El semen se coloca en vapor de nitrógeno más o menos 10 minutos, lo que baja la temperatura a -80°C y de aquí se lleva a temperatura

de congelación ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) en forma de pellets o pajillas, sumergiéndolo en el tanque de nitrógeno líquido. El descongelamiento de las pajillas se recomienda que se haga a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos, que es la temperatura cercana al tracto reproductor femenino. Se ha tr  
bajado con semen que ha sido almacenado durante 11 años en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  ( $-320^{\circ}\text{F}$ ). De 30 cabras inseminadas, 20 (66.66%) con  
cibieron a 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> servicio, de los cuales 11 fueron partos gemelares (Samouilidis, et al., 1982).

## VI. LA INSEMINACION ARTIFICIAL.

Para realizar la inseminación en forma apropiada, se requiere de una cantidad mínima de equipo que se enlistan a continuación:

- Mesa de inseminación o soporte para inseminar.
- Vaginoscopio con fuente de luz o espéculo y lámpara de cabeza.
- Pipeta inseminadora.
- Recipiente que mantenga al semen diluido a la T<sup>o</sup> deseada (30<sup>o</sup>C, 5<sup>o</sup>C y/o -196<sup>o</sup>C).
- Material para desinfección (alcohol 96<sup>o</sup> o benzal y agua destilada).
- Lubricante estéril para el vaginoscopio.

Es importante también contar con un pequeño corral donde se tengan las cabras a inseminar, que esté cerca de donde se va a trabajar. El lugar de trabajo se recomienda que esté techado, para evitar que la luz solar irradie el semen mientras éste es manipulado.

**6.1 Detección de las hembras en celo:** Este es uno de los factores que más puede atentar contra el uso de la inseminación artificial. Si no existe un buen método de identificación de hembras en celo, la cantidad de animales que quedarán servidos va a ser más baja que con monta natural. Las siguientes recomendaciones pueden ayudar a disminuir éste problema:

- a) Buscar o tener machos marcadores que tengan buena libido.
- b) Revisar que los petos se encuentren en buenas condiciones y bien

colocados. Se deben usar crayones adecuados dependiendo de la temperatura, esto se puede verificar al colocar un macho con una cabra en celo y ver la intensidad del marcado.

c) Tener un operario que observe periódicamente al rebaño para identificar y separar las hembras en celo (por lo menos 3 veces/día/30 minutos con 1½ horas de observación, dependiendo del tamaño del rebaño).

**6.2 Preparación del semen:** El semen para su congelación y utilización práctica, es empaquetado de 3 formas diferentes como vemos a continuación:

- 1) Ampolletas (0.5-1.2 ml).
- 2) Pellets (0.1 ml).
- 3) Pajillas (0.25-0.5 ml).

Fuente: Gomes citado por Memon-Ott(1981).

Las ampolletas de 1 cm<sup>3</sup> generalmente requieren un promedio de enfriamiento de 1 a 2°/ minuto en temperaturas de 5 a -15°C, y de 4 a 5°/minuto de -15 a -79°C. Estos rangos se utilizan en los bovinos.

La congelación de semen en pajillas y pipetas, ha permitido una congelación y descongelación mucho más rápida que cuando se congela en ampolletas, debido a la mayor superficie por unidad de volumen. Cuando se utilizan pajillas, la congelación rápida es mejor que la congelación lenta, y la descongelación rápida es mejor que la lenta.

El semen debe utilizarse tan pronto como sea posible después de la congelación (Memon y Ott, 1981).

**6.3 Técnica de Inseminación:** Para realizar la inseminación artificial, es conveniente tomar en consideración lo siguiente:

- a) Preparar la mesa de inseminación o soporte para inseminar, con el equipo previamente desinfectado.
- b) La desinfección del material se lleva a cabo utilizando alcohol del 96° o benzal y agua destilada.
- c) Preparar un recipiente para mantener el semen diluído a la temperatura deseada.
- d) Lubricar el vaginoscopio con solución estéril.
- e) Introducir el vaginoscopio y con ayuda del espéculo localizar la entrada del cérvix. Con la pipeta preparada proceder a la inseminación artificial.

La forma más sencilla para la técnica de inseminación, es la de que un operario sostenga la cabra a inseminar boca abajo, sosteniéndola de los miembros posteriores firmemente y evitando el movimiento del cuerpo prensándolo con las piernas. Sujetado correctamente el animal, se procede a la limpieza de la vulva y sus alrededores, para lo cual se puede usar un cepillo. En ésta forma el técnico inseminador encuentra una posición muy cómoda para introducir el vaginoscopio adecuadamente lubricado. El siguiente paso es identificar la entrada del cérvix y posteriormente introducir la pajilla o pipeta previamente cargada con semen. El semen es depositado aproximadamente de 1.5 a 3 cm dentro del cérvix (Ritar y Salamon, 1983), y en ocasiones hasta 4 cm (Moore, 1980; Smith, 1978, 1980).

Una segunda técnica sólo varía en la posición para realizar la operación. El animal se encuentra parado en una mesa que tiene un



cepo que le evita moverse. El inseminador se coloca en la parte posterior del animal quedando éste en posición cómoda para realizar la inseminación.

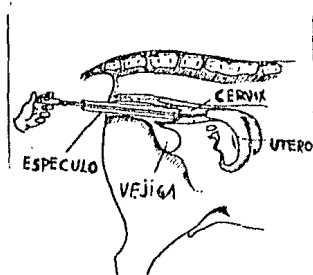
Otro método es el de la zanja que fué utilizado por primera vez en la URSS. Este consiste en preparar una zanja, de manera que permite al técnico sentarse y quedar a una altura adecuada para realizar fácilmente la operación. Siempre se debe tratar que la hembra quede con la región posterior levantada, lo que garantiza mejores resultados fecundantes.

Independientemente de la técnica empleada, es muy recomendable tener separadas y listas las cabras a inseminar. El equipo (vaginocopio, termo, pajilla) debe estar en una mesa o un sitio previamente elegido que le permita al técnico disponer en forma rápida y cómoda del mismo.

En la Figura 1, se muestran las partes anatómicas más importantes para realizar la inseminación artificial en caprinos (Wall, 1980).

Fig. 1.

Esquema de la inseminación artificial en la Cabra.



VII. FACTORES QUE PUEDEN AFECTAR LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA.

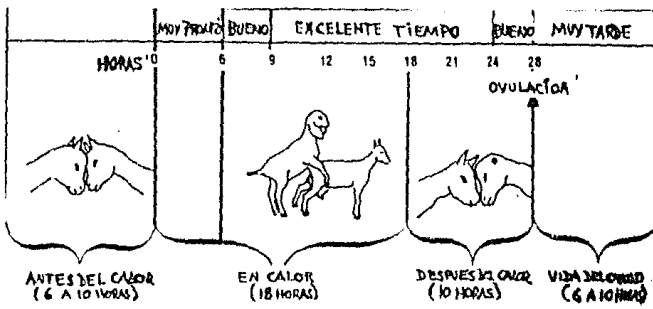
Dentro de los principales factores tenemos los siguientes:

7.1 FALLAS HUMANAS.

7.1.1 Momento óptimo de la inseminación: Mucho se ha discutido de cuál es el momento en que debe realizarse la inseminación artificial. La cabra, presenta variaciones en la duración de su celo que va de 32 a 40 horas dependiendo entre otras cosas de la época del año (Smith, 1978; Foote, 1979; Shelton, 1979). Normalmente la ovulación ocurre entre 6 horas antes y 12 horas después de que finalizó el celo. Se ha encontrado también que la vida del óvulo(s) es de 12 a 24 horas, mientras que la del espermatozoide es de 24 a 48 horas (Wall, 1980). En base a ésta información es que las inseminaciones se realizan generalmente 12 a 18 horas después de que se inició el celo (Lunca, 1965). Esto en forma práctica no es fácil de realizar puesto que requeriría de una observación continua de los animales, lo que es prácticamente imposible, por lo que si un animal es detectado en la mañana se insemina en la tarde y si es detectado en la tarde se insemina en la mañana (Williams, 1981). En el cuadro(1) se ejemplifica lo anterior.

Guía de Tiempo para determinar el Calor.

CUADRO 1.



**7.1.2 Detección de Celos:** Un aspecto fundamental para la efectividad de la inseminación artificial es la detección de las hembras en celo, puesto que éstas deberán ser retiradas del rebaño para proceder a su inseminación, mientras que en la monta natural son servidas en el momento en que la hembra acepta al macho y frecuentemente en ocasiones sucesivas. La práctica de utilizar machos rotajados o (varicetomizados o con pene desviado) es la mejor forma de hacer las detecciones de celo, puesto que la observación sin machos es errónea. Sin embargo, la utilización de machos margaderos requieren ciertas características como son buena libido y buena condición física. Por otro lado, es necesario que los petos (arnés) y los crayones de éstos sean los adecuados para el animal y para el clima. Para la elaboración de éstos últimos se puede recomendar la lectura de Radford, et al., (1960).

**7.1.3 Concentración espermática a inseminar:** Ya ha sido señalado en la parte de diluciones, que la concentración mínima de espermatozoides cuando va a ser utilizado en forma fresca no debe ser inferior de 100 a 125 X 10<sup>6</sup> (Cordeel, et al., 1976; Smith, 1980) y que cuando éste es llevado a congelación se debe incrementar a 400 X 10<sup>6</sup> por la gran pérdida en el proceso de congelación y descongelación (Wall, 1980).

**7.1.4 Número de inseminaciones:** Como resultado de las variaciones en la fertilidad atribuibles al momento óptimo de inseminación o al número de espermatozoides necesarios para que ésta sea alta, se ha empleado la doble inseminación artificial, o el dar sólo una pero con mayor concentración espermática. El cuadro (2) que se presenta a continuación aunque se muestra una superioridad en la doble I.A.,

quizá no debe ser considerada como concluyente, tomando como base los resultados en ovinos en que no se han encontrado diferencias, por lo cual se recomienda mayor investigación en éste sentido.

CUADRO 2.

Influencia del número de inseminaciones endocervicales sobre la fertilidad de las cabras inseminadas en el transcurso de un celo natural detectado por el calor.

Una sola I.A. con $250 \times 10^6$ total de espermatozoides.	Dos I.A. con $125 \times 10^6$ espermatozoides cada vez.
--	---

Fertilidad (%)	50 (58).	77 (52).
----------------	----------	----------

( ) : Número de hembras inseminadas.

Fuente: Corteel, et al., (1976).

**7.1.5 Técnico inseminador:** El conocimiento y la experiencia del inseminador en el manejo adecuado del semen, ya sea fresco o congelado es vital para una buena concepción. La higiene del equipo y material empleado por parte del técnico es de enorme importancia. La falta de un adecuado lavado y enjuagado (con agua destilada) referentes en lesiones a los espermias debido a la presencia de sustancias químicas tóxicas.

**7.1.6 Sitio de deposición del semen:** La deposición intrauterina del semen, es la más adecuada porque mejora las posibilidades de fecundación en comparación con la pericervical (Cuadro 3). En monta natural generalmente el semen es depositado en la parte anterior de la

vagina, pero en la inseminación caprina se ha logrado en el útero (Ritar y Salamon, 1983). La razón de ésto es porque el semen que se utiliza es 10 o 20 veces más diluído que un eyaculado normal. Además se pierde la mitad de los espermatozoides normalmente al morir durante el proceso de congelación y descongelación (Wall, 1980; Bretzlaff, 1983).

### CUADRO 3.

Influencia del sitio de deposición de los espermatozoides en las vías genitales sobre la fertilidad en hembras inseminadas.

	<u>Endocérvix</u>	<u>Vagina</u>
Fertilidad (%).	64 (219)	40 (63).

( ) : Número de hembras inseminadas.

Fuente: Cortesol, et al., (1976).

**7.1.7 Epoca de recolección:** Como lo apunta Vega (1983), existen variaciones en la calidad espermática de acuerdo a la época del año siendo ésta mejor en cuanto a fertilidad y características sexuales generales hacia los meses de Otoño, por lo cual es recomendable que el semen destinado a congelación sea cosechado durante éstos meses.

**7.1.8 Epoca de inseminación:** Con la utilización de un apropiado tratamiento hormonal para la inducción del estro y ovulación, las cabras pueden ser inseminadas durante todo el año aún cuando la tasa de fertilidad disminuye considerablemente. Sin el uso de hormonas,

las mejores condiciones para inseminar son durante los meses de Otoño e Invierno (Corteel, 1977).

7.1.9 Inseminación y la inducción o Sincronización de celos: En éste punto existen divergencias entre los investigadores en relación a la efectividad de la combinación de ambas técnicas, entre otras cosas debido a la variación de productos, concentración de los mismos y respuestas de los animales en la inducción y/o sincronización de celo.

Existen varias razones por las cuales se utiliza la inducción hormonal del celo en época de anestro. Una de ellas, es la de mantener el nivel de producción; y la otra para ayudar a las posibles investigaciones de la transferencia de embriones (Smith, 1980).

En general la efectividad de la inseminación artificial, es mejor cuando se hace sincronización de celos durante la época de apareamiento que cuando se hace inducción de celos en épocas de anestro estacional. De igual forma los productos para sincronizar o inducir la presencia de celos que han mostrado ser mejores, son las prostaglandinas PGF 2 Alfa de 9 a 12 mg, y la utilización de progesterona. Se puede utilizar progesterona como es el caso del FGA (Acetato de Fluorogestona) o MAP (Acetato de Metroxiprogesterona), que se usa a diferentes dosis dependiendo la vía de administración. Tal parece que el método de la utilización de la esponja intravaginal impregnada con 40 a 45 mg de FGA o 50 mg de MAP durante 18 a 21 días, seguida de una inyección de 400 a 500 UI de PMSG 2 a 4 horas antes de retirar la esponja, es eficiente en el incremento de fertilidad (Bongso, et al., 1982; Corteel, et al., 1974; Corteel et al., 1975).

En cuanto al efecto del macho, se ha observado que éste juega un papel importante en el agrupamiento de celos al inicio de la estación sexual principalmente, de tal forma que Diniz, (1980) reporta un efecto

sincronizador del 72% de las cabras estimuladas en un lapso de 72 horas. Es conveniente considerar éste método al realizar la I.A., en países con poca tecnología.

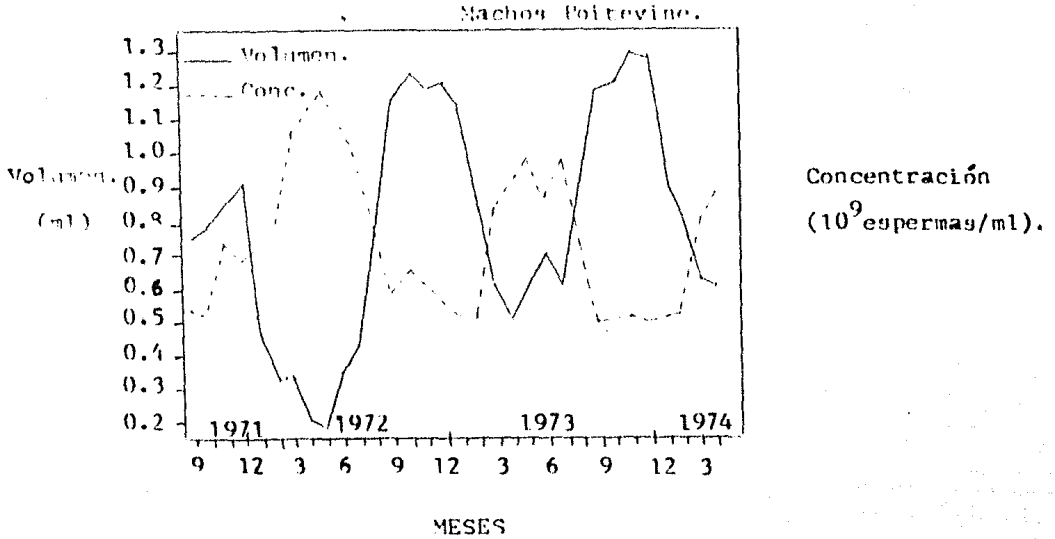
## 7.2 FALLAS RELACIONADAS CON LOS ANIMALES.

-Factores Bioclimáticos: Es bien conocido que algunos factores como son el fotoperíodo o la temperatura, edad y otros, influyen sobre la calidad espermática. Dado que no es el objetivo del presente trabajo el señalar cómo influye cada uno de éstos factores, se remite al lector el trabajo de Vega y Pérez Durán (1983). Sin embargo, se considera necesario mencionar brevemente cómo su influencia puede determinar variaciones en las tasas de concepción.

7.2.1 Estación: Los efectos de la estación, pueden ser el resultado del efecto de un sólo elemento ya sea luz, temperatura, o varios a la vez. Se han encontrado variaciones estacionales en la concentración espermática y en el volumen total del eyaculado, aunque el factor más afectado por la estacionalidad parece ser la producción de plasma seminal el cual ocupa el 70% del eyaculado (Corteel, 1977).

En estación o temporada de cría el volumen del eyaculado es alto disminuyendo en época de auestro estacional, la concentración espermática sigue la tendencia opuesta (Eaton y Simmons, 1952). Los cambios en el volumen seminal son debidos principalmente, a cambios en la cantidad de flúidos secretados por el epidídimo y glándulas accesorias, los cuales dependen de la producción de andrógenos y por la secreción de prolactina, quien a su vez se asocia con la duración de las horas luz (Primavera y Verano en el Hemisferio Norte) (Corteel, 1981).

Variación estacional en el volumen y concentración espermática del eyaculado.



Tomado de Corteel, (1981).

El fotoperíodo que se manifiesta con diferente intensidad dependiendo de la raza, marca diferencias substanciales conforme éstas son más estacionales, en la calidad del semen y en la fertilidad del macho.

**7.2.2 Altas Temperaturas:** La producción de semen disminuye cuando la temperatura es elevada y es más grave si la temperatura se encuentra asociada a una elevada humedad relativa (Corteel, 1981). Cuando la temperatura ambiente aumenta, el mecanismo termoregulador del testículo disminuye su eficiencia y se ha observado en el caso de los mamíferos una disminución del volumen testicular y alteraciones en la calidad de semen.



Las temperaturas ambientales superiores a los 30<sup>0</sup>C, reducen en forma paulatina la espermatogénesis pudiendo llegarse a la Azospermia, en tal caso aunque el macho se ponga en un ambiente adecuado la producción normal de espermatozoides tardará cerca de 60 días debido al proceso gametogénico. Arbiza (1978), menciona que la temperatura también puede actuar sobre las manifestaciones de la libido.

**7.2.3 Edad:** Se sabe que el crecimiento del aparato reproductor del macho, guarda una relación con su peso y edad. Este crecimiento sobre todo testicular se ve sumamente incrementado cuando el animal se acerca a la pubertad. Este crecimiento testicular no sólo es en tamaño si no que va acompañado del cambio de estructuras espermatogénicas, hasta la aparición y mejora de la producción espermática. Por lo tanto - que los animales jóvenes no tienen la misma capacidad fertilizadora - que tiene un animal adulto. La producción de espermatozoides es un proceso que se inicia en forma paulatina, por lo general el primer eyaculado con espermatozoides se obtiene hacia los 5 meses de edad y de ahí aumenta su producción. Durante su primer eyaculado, el joven macho duplica su peso corporal produciendo ya una cantidad razonable de espermatozoides, es decir, un 60% aproximadamente de lo que producirá en su segundo año (Corteel, 1977, 1981).

**7.2.4 Raza:** El efecto de raza en la producción de semen interviene en el volumen del eyaculado, concentración y el número total de espermatozoides. Existen diferencias entre razas, por ejemplo la raza Boer produce 3 veces más la cantidad de espermatozoides que la raza nativa de Zambia (Igboelli, 1974).

**7.2.5 Nutrición:** Los niveles de alimentación también pueden afectar la reproducción, se han reportado diversos efectos por ejemplo, cuando se disminuye el consumo de energía baja la calidad espermática, también la calidad del forraje tiene importancia ya que se ve disminuida la cantidad de precursores de la Vitamina A (Corteel, 1977).

**7.2.6 Líbido:** La espermatogénesis del macho caprino, comienza alrededor de los 90 días cuando han sido mantenidos en buenas condiciones de alimentación, y pueden usarse como reproductores en la mayoría de las razas entre 6 y 8 meses de edad (Arbiza, 1978). El cortejo o comportamiento precopulatorio es corto y la cópula con eyaculación dura unos cuantos segundos. Existen 3 métodos cualitativos para medir la libido de los machos caprinos:

1) Tiempo de reacción.- Consiste en medir el tiempo que tarda un macho en copular, después de ponerse en presencia de una hembra en celo.

2) Tiempo de recuperación.- Se determina midiendo el tiempo que tarda un macho en realizar la segunda eyaculación después de la primera e igualmente la tercera en relación con la segunda eyaculación.

3) Prueba de monta en corral.-Consiste en contar el número de montas que realiza un macho en un tiempo determinado, cuando se encierra con varias hembras en celo.

La libido no debe ser un factor limitante en la colección de semen, aún cuando hay razas como la Alpina, que es extremadamente sensible a la estación anual en su comportamiento sexual (Corteel, 1977).

CONCLUSIONES.

Como se puede observar en el presente trabajo, la inseminación Artificial en los caprinos ha logrado bastante éxito con la utilización de semen fresco, obteniendo altas tasas de fertilidad en la deposición intrauterina. En cuanto al uso de semen congelado al igual que en ovinos, se requiere de una gran concentración de espermatozoides en cada dosis obteniendo por lo tanto pocas dosis en cada eyaculado, debido a la elevada cantidad de espermatozoides muertos durante el proceso de congelación y descongelación. Respecto a éste punto, la información es aún escasa y hace falta investigar más a fondo, la razón por la cual ya sea el proceso de congelación-descongelación, el tipo o cantidades de diluyentes o algún otro factor, no sean los apropiados para evitar la muerte de los espermatozoides.

## A P E N D I C E 1.

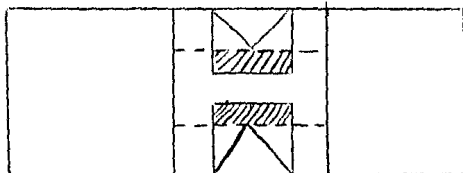
Para determinar la concentración con la cámara de Spencer o Hematocitómetro se sigue lo siguiente:

1.- Material: Microscopio, Hematocitómetro, cubreobjetos calibrado, pipeta mezcladora con bulbo y manguera.

### 2.- Pasos:

- a) Se llena la pipeta con semen hasta donde están las marcas (0.5), evitando burbujas.
- b) Se llena con el diluyente hasta la marca 1.1.
- c) Se agita fuertemente de preferencia colocarlo con agitador.
- d) Se sacan 3 o 4 gotas para tomar semen diluido del bulbo.
- e) Se coloca el cubreobjetos en la zona de conteo, y se deposita con cuidado la cantidad suficiente para que no rebase el área delimitada en la cámara, si se desborda hay que repetir la operación (Figura 1).

Figura 1.



Area en que debe estar la dilución del semen.

- f) Se deja reposar 5 minutos.

- g) Se coloca la cámara en el microscopio y se observa con el lente de menor graduación, hasta detectar el área de conteo.
- h) Se cambia el objetivo a 40 X 10 o 60 X 10, de manera de observar un sólo cuadro por campo.
- i) Se cuentan 5 cuadros, si es de 16 cuadros se toman los de las esquinas y uno del centro (Figuras 2a y 2b). Es preferible tener un contador que marque los espermatozoides de cada cuadro y el total acumulado, para evitar errores.
- j) Para obtener la concentración por c.c. al total de los espermatozoides contados de los 5 cuadros, se multiplica por 10 millones dependiendo de la dilución.
- k) Antes de volver a usar la cámara, el portaobjetos y la pipeta, deben ser lavadas cuidadosamente con agua corriente, alcohol y agua destilada (Sorensen, 1979).

A P E N D I C E 2.

COLORANTE EOSINA - VERDE RÁPIDO FCF.

FINALIDAD: Tinción diferencial de vivos y muertos.

FORMULA: Verde Rápido..... 2.0 gr.  
Eosina B (Azulada)..... 0.8 gr.  
Amortiguador (Buffer) M/8 Fosfato (pH 7.3-7.4)..100 ml.

Este amortiguador se prepara con 22 gr. de  $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$  (Fosfato de Sodio), disueltos en 500 ml de agua destilada y 8.5 gr. de  $\text{K H}_2 \text{PO}_4$  (Fosfato de Potasio), disueltos en 500 ml de agua destilada.

- A) Incorpore la Eosina a la mezcla de Verde Rápido y amortiguador de fosfato. Hévelos al punto de ebullición y luego fíltrelos. La vida activa de éste colorante es de 4 a 5 años.
- B) Colocar una gota de semen diluido en un portaobjetos tibio, agregarle 1 o 2 gotas del colorante. Mezclar con rapidez los líquidos.
- C) Hacer frotis delgado y secar con rapidez en aire caliente o sobre una flama.

Fuente: Sorensen, A.M. (1979).

COLORANTE EOSINA - NIGROSINA.

FINALIDAD: Eosina B..... 1.0 gr.  
Nigrosina..... 5.0 gr.  
Citrato de Sodio 3% (Di-hidrato)..... 100 ml.

Mezclar los colorantes con el Citrato.

Permanece estable por aproximadamente un año, pero debe ser refrigerada para prevenir el crecimiento bacteriano.

Fuente: Sorensen, A.M. (1979).

COLORANTE ROSA DE BENGALA.

FINALIDAD: Dilución del semen para el cálculo de la concentración espermática en el Hematocitómetro.

FORMULA:

Agua bidestilada.....	100 ml.
Citrato de Sodio.....	2.9 gr.
Rosa de Bengala.....	3.0 gr.
Formol al 10%.....	1.0 ml.

PREPARACION DE LA SOLUCION MADRE: En una probeta colocar 100 ml. de agua bidestilada y se le agregan los 2.9 grs. de Citrato de Sodio. De ésta solución se toma la mitad y se le agregan los 3 grs. del colorante de Rosa de Bengala más 1 ml de Formol al 10% y se afora a 100 ml., con la otra mitad de la solución de Citrato de Sodio.

PREPARACION DE LA SOLUCION PARA USO DE RUTINA: Se colocan 15 gotas de la solución madre en 100 ml. de una solución de Cloruro de Sodio al 10%, o bien. se toman 20 gotas y se le agregan a 100 ml, de agua bidestilada.



COLORANTE DE ROSA DE BENGALA.

FINALIDAD: Observación de la Morfología Espermática.

FORMULA: Rosa de Bengala..... 3.0 gr.  
Formalina al 40%..... 1.0 ml.  
Agua destilada..... 99 ml.

Disolver el colorante en el agua y la formalina y esterilizar.

METODO DE TINCION: Colocar una gota de semen en un portaobjetos limpio y hacer un frotis delgado, fijándolo con calor bajo.

Teñir por 5 minutos y después lavar cuidadosamente con agua destilada. Secar y examinar el microscopio de luz.

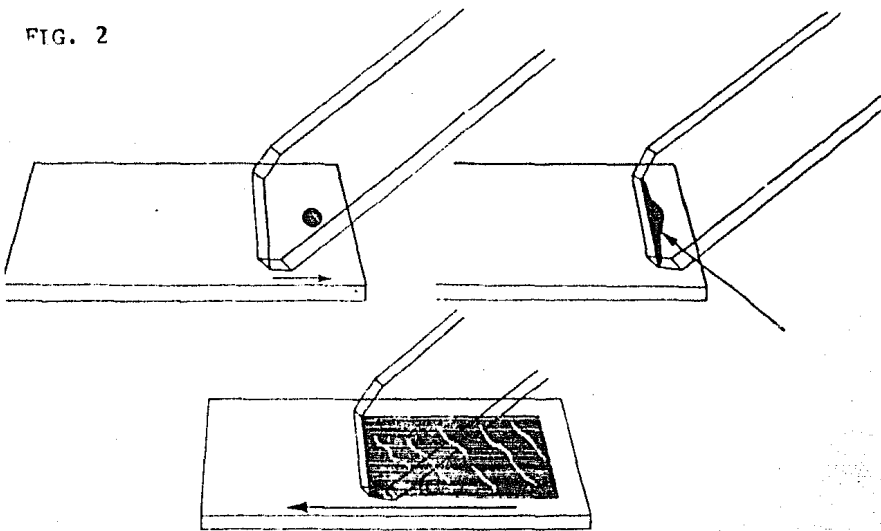
Fuente: Hackett y Macpherson, (1965).

### APENDICE 3.

Pasos para la preparación del frotis:

- 1) Tomar un portaobjetos limpio de la platina que se encuentra a 37 o 38<sup>o</sup>C.
- 2) Colocar el semen y el colorante, ambos deben tener la misma T<sup>o</sup>.
- 3) Se coloca en un portaobjetos una gota de semen, 2 gotas de Eosina y 4 gotas de Nigrosina, todo separado.
- 4) Se coloca el extremo de un portaobjetos en forma perpendicular y se corre a lo largo con suavidad una vez, lo que permite una distribución uniforme (Figura 2).

FIG. 2



Forma de hacer la extensión del semen.

Es importante tomar en consideración, que la variación de temperatura durante el proceso de la tinción puede modificar los resultados de la prueba.

Durante el frotis, primero se mezcla el semen con la Eosina y rápidamente a ésta se le añade la Nigrosina. Inmediatamente se hace una extensión gruesa en una línea seca. Todo el proceso debe terminar en un minuto.

#### A P E N D I C E 4.

Para facilitar la preparación del diluyente a base de yema de -  
huevo, se recomienda utilizar vasos de precipitado graduados, pipetas,  
báscula para gramos, papel filtro. Para la técnica de preparación en  
términos generales, se sigue lo siguiente:

- a) Primero se toman 2 o 3 huevos, los cuales se lavan y se secan con un paño limpio.
- b) Se les pasa un algodón impregnado con alcohol del 96<sup>o</sup> por toda la cáscara. Se recomienda prender un mechero y abrir los huevos cerca de él, se elimina la cáscara y se coloca la yema sobre el papel filtro.
- c) Se mueve en forma circular para que se adhiera bien el resto de la clara, y se presiona suavemente doblando el papel para que se libere la yema por uno de los extremos cuidando de que sólo se vaya la yema, ésta acción se repite con los otros huevos.
- d) Si la yema se rompe antes, hay que repetir la operación.
- e) Se disuelve en el agua el citrato, la glucosa y los antibióticos,
- f) Se coloca en el baño María junto con el recipiente que contiene la yema y se deja que alcance los 37-38<sup>o</sup>C, de aquí se agrega la yema al agua evitando que toque las paredes que no están en contacto con la solución.
- g) Se agregan los antibióticos (penicilina y estreptomycin en Mg), el preparado se revuelve suavemente evitando la formación de espuma -

hasta quedar bien mezclado.

h) Se regresa al baño María el recipiente previamente tapado. Una vez que está a 30°C, se puede combinar con el semen. La yema de huevo no sólo se ha combinado con glucosa, sino también con tris (trihidroximetilaminometano). La yema de huevo debe ser obtenida de huevos frescos (de menos de 24 horas de abiertos), se debe tener mucho cuidado de no contaminar la yema con la membrana que cubre el interior del huevo.

Para elaborar el diluyente con Tris se utilizan: 3,3190 grs. de tris, 1,8310 grs. de Acido Cítrico en agua destilada 100 ml. Esta solución debe tener un pH de 7.20 y una osmolalidad de 323 m Osm/Kg.

Tris.....	3,3190 grs.
Acido Cítrico.....	1,8210 grs.
Dextrosa.....	1.00 grs.
Estreptomocina.....	050 grs.
Penicilina.....	50,000 U.I.

Tomado de Nelson y Drobnis, (1981).

B I B L I O G R A F I A .

VALEZA, A. S .

1978. Introducción, Bases de la cría caprina.  
Especiales N°1.

MUSTAY, J.W., LEBLEY, R.P., FRISSE, E.M. AND HIPP, E.W.

1968. Fecundability for semen collected from spanish goats by two  
methods. J. Appl. Physiol. 24, p. 369-372.

BAKER, D.A.C.

1978. Preparación de semen de caprino lechero para congelación.  
Boletín Informativo del Instituto Nacional de Inseminación  
Artificial y Reproducción Animal., II.

BEARDEN, H. I. AND FUQUAY, J.

1982. Reproducción animal aplicada. Universidad del Edo. de Mississippi  
Ed. "El Heraldo Moderno", S.A. de C.V.

BONCOG, T.A., NATHAN, E. AND DASS, S.

1982. Synchronization of oestrus of goats treated with progestagen  
impregnated intravaginal sponges and PMSG, and reproductive  
performance following natural mating or A.I. with frozen semen.  
Animal Reproduction Science, 5, p. 111-116.

BRETZLAFF, K.

1983. AI for beginners.  
Dairy goat J., Vol. 65 # 5; p. 455-458.

CAMPBELL, R. J. AND LASLEY, J.F.

1975. The Science of animals that serve the mankind.  
Ed. MacGraw Hill, Inc. 2<sup>th</sup> Edition.

CORTELLI, J.M., ET COSMAUX, N.

1967. Essais de congélation de sperme de bouc.

Ann. Zootech., 16 (2), p. 213-216.

CORTELLI, J.M.

1973. L'insémination artificielle caprine: bases physiologiques, état actuel et perspectives d'avenir.

World Review. Anim. Prod., Vol. 9 (1), p. 73-99.

CORTELLI, 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, p. 741-745.

CORTELLI, J.M.

1975a. Production du sperme chez le bouc. Variations saisonnières de la quantité et de la qualité du sperme collecté selon l'âge des animaux.

III Journées de la Recherche ovine et caprine, 1, p. 4-17.

CORTELLI, J.M.

1975b. Effet du lavage sur la conservation des spermatozoïdes de bouc à basse température.

Ann. Biol. Bioch. Biophys., 15 (3), p. 525-529.

CORTELLI, J.M., BAPIL, G., BARITEM, E., RUSSIARI, L., LEBONNE, B., ET DE MONTIGNY.

1975. The use of prostaglandins to control the oestrous cycle of the dairy goat.

Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 15 (2), p. 353-363.

CORTEEL, J.M., BARIL, G., LEBOEUF, B., ET DE MONTIGNY.

1976. Fertilité de chevres inseminees avec des spermatozoides separees de leur plasma seminal avant dilution et congelation.  
2<sup>ag</sup> Journées de la Recherche ovine et caprine., Paris, I.N.R.A.  
ITOVIC I Ed., 1. p. 283-287.

CORTEEL, J.M.

1977. Production, Storage and Insemination of goat semen.  
Management of reproduction in sheep and goats symposium.  
University of Wisconsin, Madison Wisconsin., July, 24-25. p.41-57

CORTEEL, J.M.

1981. Collection, Processing and Artificial Insemination of goat semen  
Goat Production., Ed. Gall, Academic Press, London, p. 171-191.

CORTEEL, J.M. AND PAULIGNON, M.

1984. Preservation of the male gamete (ram, buck, boar).  
10<sup>th</sup> International Congress on animal production and Artificial  
Insemination. June 10-14; p. 11-20.

DINIZ, M.

1980. Activite oestrienne et progesteronenne chez la chevrette Alpine pendant la saison sexuelle qui suit sa naissance: Effet de l'introduction du male dans le troupeau. D.E.A. Universite, Pierre et Marie Curie, Paris, Sept.

DZIUK, P.J., GRAHAM, E.F., DONKER, I.D., MARION, G.B., AND PETERSEN, B.

1954. Some observations in collection of semen from bulls, goats, boar and rams by electrical stimulation.  
Veterinary Medicine, Nov, p. 455-458.



EATON, O.N., AND SIMMONS, V.L.

1952. A semen study of goats.

Am. J. Vet. Res., 13, p. 537-544.

ELLIOT, F.T., SHERMAN, J.K., AND SULLIVAN, J.L.

1973. A photographic method of measuring percentage of progressively motile sperm cells using dark-field microscopy.

VIII. International symposium on Zootechny, Milan Italy, 15 pp.

FOOTE, R.H.

1980. Artificial insemination. Reproduction in farm animals.

Edited by Hafez E.S.F. LEA and FEBINGER 4<sup>th</sup> Ed. p. 521-546.

FOOTE, R.H.

1974. Artificial insemination in reproduction in farm animals.

E.S.E. Hafez. Ed. LEA and FEBINGER, Philadelphia, p. 409-431.

FRASER, A.F.

1962. A technique for freezing goat semen and results of small breeding trial.

Can. Vet. Journal., Vol. 3, #5 May., p. 133-144.

GOMES, W.R.

1977. Artificial insemination. Reproduction in domestic animals.

Edited by Cole h.h. and Cupps p.t. by academic press inc. 3<sup>th</sup> ED.

HACKETT, A. J. AND MACPHERSON, J.W.

1965. Some staining procedures for spermatozoa. A review.

Can. Vet. Jour., Vol. 6, #3, March, p. 55-62.

HULET, C.V. AND SHELTON, M.

1980. Sheep and goats. Hafez. E.S.E. Rep. in Farm animals 4<sup>th</sup> Ed.

LEA and FEBINGER, 17 Philadelphia, E.U.A., p. 346-357.

IGBOELLI, G.

1974. A comparative study of the semen and seminal characteristics of two breeds of goats. E.A. Agric. For. 40 (2), p. 132-137.

HOLY, L.

1983. Bases biológicas de la Reproduccion Bovina.  
Primera Edición., Ed. Diana.S.A.

LUNCA, N.

1965. The present state of artificial insemination in Sheep and Goats.  
World Review of Animal Production, 1 (1): p. 73-80.

MEMON, M.A., AND OTT, R.S.,

1981. Methods of semen preservation and Artificial Insemination in Sheep and Goats.  
World Review of Animal Production, Vol. 17, #1 Jan-March p.19-25.

MOORE, N.W.

1980. Procedures and results obtainable in sheep and goats.  
Current therapy in theriogenology. Diagnosis, treatment and prevention . Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA. p. 89-94,.

MUKHERJEE, D.P.

1966. Study of the quantitative characteristics of live and dead spermatozoa of bulls, rams and goats.  
World Review Production, 2 (1), p. 74-84.

NELSON, E.A. AND DROBNIS, E.Z.

1981. Artificial Insemination of dairy goats.  
Dairy goat journal, Vol. 59, #2.

PEREZ, R. Y (DE LUCAS).

1981. Aspectos no patológicos que afectan la eficiencia reproductiva en la Cabra. TESIS de Licenciatura de la F.E.S.-Cuautitlán.

RADEFORD, H.M., WATSON, R.H. AND WOOD, G.I.

1960. Crayon and associated harness for the detection of mating under field conditions.

Australian Vet. J., 36, p. 57-66.

REVELL, S.G. AND WOOD, P.D.P.

1978. A photographic method for the measurement of motility of bull spermatozoa.

J. Reprod. Fert. 54, p. 123-126.

RITAR, A. J. AND SALAMON, S.

1982. Effects of seminal plasma and of its removal of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora Goat.

Aust. J. Biol. Sci., 35, p. 305-312.

RITAR, A. J. AND SALAMON, S.

1983. Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora Goat.

Aust. J. Biol. Sci., 36, p. 49-59.

RODRIGUEZ, P.U.

1978. Inseminación Artificial.

Editorial "Pueblo y Educación."

SALAMON, S. AND RITAR, A.J.

1982. Deep freezing of Angora goat semen: Effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival spermatozoa.

Aust. J. Biol. Sci., 35, p. 295-303.

SAMOUILIDIS, S., FOUKOS, A., TSAKALOF, P.

1982. The fertility of buck semen after an 11 year storage in liquid nitrogen (-196 deg. C.).

Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society, 33,1.p.53-55.

SALSBURY AND VAN DERMARK, N.L.

1978. Fisiología de la reproducción e I.A. de los bovinos.

Editorial "Acribia". Zaragoza (España).

SHELTON, M.

1978. Reproduction and breeding of goats.

J. Dairy Science., 61: p. 994-1010.

SHELTON, M.

1979. Comments on the reproductive phenomenon of goats.

Proceedings of the 2nd. national goat breeders conference.

Perth, Australia, p. 85-90.

SMITH, C.M.

1978. Some clinical aspects of caprine reproduction.

Cornell Vet., 68, supp. 7, Rep. 6, p. 200-211.

SMITH, C.M.

1980. Caprine, Section XI.

Current therapy in theriogenology Diagnosis treatment and

prevention. p. 969-1004. Editor David Morrow, Ed. W.B. Saunders

company, Philadelphia, U.S.A.

SORENSEN, A.M.

1979. Animal reproduction, principles and practices.

1a. Edition. McGraw Hill, Inc.

SEIVASTAVA, K.N., SINGH, B.P. AND MISRA, B.S.

1980. Changes in dimensional characteristics, melanizing and succinic dehydrogenase activity of goat spermatozoa.

Indian Vet. J. 57: p. 397-402.

TREJO, G.A., PEREZ, D.E. Y APODACA, S.J.L.

1983. Algunos aspectos del papel del macho caprino en la transmisión de la *Brucella Melitensis*. Memorias 9<sup>o</sup> Congreso Panamericano.

VARSHNEY, V.P., SENGUPTA, B.P. AND PANDEY, M.D.

1977. A note on some chemical constituents of goat semen.

Indian J. Anim. Sci., p. 427-429.

VEGA, G. Y (PEREZ, D.).

1983. Factores no patológicos que influyen en la eficiencia reproductiva del macho caprino (Revisión Bibliográfica).

TESIS de Licenciatura de la F.E.S.-Cuautitlán.

WALL, B.

1980. Artificial Insemination.

Dairy goat Journal., May, p. 89-90.

WELLS, M.E. AND ABBA, O.A.

1968. New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa.

Journal of Dairy Science, Vol. 53 #2.

WILLIAMS, CH.

1981. Artificial insemination is alive and growing.

Dairy Goat Journal, p. 89-90.

ZEMJANIS, R.

1981. Reproducción Animal. Ed."Limusa"; México.