



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Optimización y Mejora de la Inseminación Artificial
en la Raza Caprina Murciano-Granadina**

**Dña. Sonia Galián Arnaldos
2022**

**UNIVERSIDAD DE
MURCIA**



UNIVERSIDAD DE MURCIA

TESIS DOCTORAL

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
PROGRAMA "BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA
DE LA SALUD REPRODUCTIVA (REPROBIOL)"

**OPTIMIZACIÓN Y MEJORA
DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL
EN LA RAZA CAPRINA MURCIANO-GRANADINA**



SONIA GALIÁN ARNALDOS

CURSO ACADÉMICO 2021/2022

Este trabajo de Tesis DOCTORAL ha sido financiado por Fondos Europeos de Desarrollo Regional. FEDER 1420 – 26. Con el proyecto titulado: *Los recursos genéticos animales resilientes al cambio climático. Mejora y diversificación de productos alimenticios derivados y obtenidos de forma biosostenible.*

D^a. LAURA ALMELA VERACRUZ, Investigadora del Equipo de Mejora Genética Animal y Desarrollo Ganadero del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA).

INFORMA:

Que el trabajo de **Tesis Doctoral** titulado **“OPTIMIZACIÓN Y MEJORA DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN LA RAZA CAPRINA MURCIANO-GRANADINA”**, del que es autora **D^a. SONIA GALIÁN ARNALDOS**, ha sido realizado bajo mi dirección y supervisión y cumple todas las condiciones necesarias para su defensa.

Murcia, a 26 de mayo de 2022



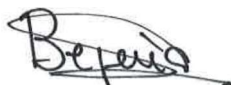
Fdo.: Laura Almela Veracruz

D^a. BEGOÑA PEINADO RAMÓN, Investigadora y Jefa del Equipo de Mejora Genética Animal y Desarrollo Ganadero del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA).

INFORMA:

Que el trabajo de **Tesis Doctoral** titulado “**OPTIMIZACIÓN Y MEJORA DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN LA RAZA CAPRINA MURCIANO-GRANADINA**”, del que es autora **D^a. SONIA GALIÁN ARNALDOS**, ha sido realizado bajo mi dirección y supervisión y cumple todas las condiciones necesarias para su defensa.

Murcia, a 26 de mayo de 2022



Fdo.: Begoña Peinado Ramón



D. SALVADOR RUIZ LÓPEZ, Catedrático de Universidad del Departamento de Fisiología de la Universidad de Murcia.

INFORMA:

Que el trabajo de **Tesis Doctoral** que lleva por título **“OPTIMIZACIÓN Y MEJORA DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN LA RAZA CAPRINA MURCIANO-GRANADINA”**, del que es autora **D^a. SONIA GALIÁN ARNALDOS**, ha sido realizado bajo mi dirección y cumple todas las condiciones necesarias para su defensa.

Murcia, a 26 de mayo de 2022.

Fdo.: Salvador Ruiz López

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que de forma directa o indirecta me han ayudado, animado y han hecho posible la realización de esta Tesis:

Al Equipo de Mejora Genética Animal del IMIDA, a *Ángel Poto* y mis directoras *Begoña Peinado* y *Laura Almela*, gracias infinitas por haberme recibido de nuevo en vuestro equipo y permitirme trabajar en la ciencia. Por enseñarme todo lo que sé y hacerlo siempre con una sonrisa y una broma. Por todos los ratos compartidos entre cabras, laboratorios y despachos. Gracias por acordaros de mí aquel día, en el que me llamásteis y me ofrecisteis volver, (¡no sabéis lo feliz que me hicisteis!) y por la confianza que siempre habéis depositado en mí.

A *Salvador Ruiz*, director y tutor de esta Tesis, gracias por haberme guiado a lo largo de este camino, por enseñarme el manejo de ecógrafo y la interpretación de lo que veo. Tus consejos y correcciones, y tu ayuda con los pasos a seguir, han sido, sin duda, fundamentales para que esta Tesis vea la luz.

A los operarios de la nave de caprino de la Granja Veterinaria de la Universidad de Murcia, por vuestra ayuda con el manejo de los animales, sin la que no hubiese podido realizarse buena parte de este trabajo.

A mi familia y amigos, por acordaros de preguntar “¿cómo va la Tesis?” aunque sea en la distancia, en estos tiempos raros de pandemias y confinamientos. Por animarme a seguir porque “*eso tú lo tienes chupao*”. Vuestra confianza en mí me emociona jajaja. En este apartado gracias especiales a mi prima *Verónica*, por su ayuda con el inglés, a estas alturas tienes que saber tanto como yo de reproducción en caprino.

A mi marido, *Eduardo*, por ser mi compañero de vida y de celebración en los buenos momentos, y mi apoyo y refugio en los menos buenos. Por ser el primero en animarme a perseguir lo que me hace feliz, aunque eso signifique hacer algún ajuste en nuestra vida... (y por la ayuda informática, que también es importante, jejeje). Gracias por formar conmigo el mejor equipo.

Y por supuesto, gracias a mis padres, *Paquita* y *Pepe*, por estar siempre ahí, ayudándome en cada paso que doy en la vida. Ellos lucharon desde siempre para que sus hijos tuvieran la educación y oportunidades que ellos no tuvieron, y nos criaron con amor infinito, pero también con la enseñanza de que debemos esforzarnos y trabajar duro, siempre con humildad y respeto. Todo lo bueno que yo pueda hacer en la vida, se lo deberé siempre a ellos.

Por último, una mención también a los animales que, aunque sea de forma inconsciente, hacen posible el aumento del conocimiento y el avance de la ciencia.

A todos, GRACIAS.

ÍNDICE

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN y JUSTIFICACIÓN | 2 |
| 2. OBJETIVOS e HIPÓTESIS | 13 |
| 2.1. Objetivo general | 13 |
| 2.2. Objetivos específicos | 13 |
| 2.3. Hipótesis | 14 |
| 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 16 |
| 3.1. Origen de la Inseminación Artificial (IA) | 16 |
| 3.2. Situación de la raza caprina Murciano-Granadina (MG) | 19 |
| 3.2.1. Descripción | 19 |
| 3.2.2. Cualidades y aptitudes | 20 |
| 3.3. Reproducción en la especie caprina | 23 |
| 3.3.1. Aparato reproductor masculino | 23 |
| 3.3.1.1. Métodos de recolección de semen caprino y su influencia en el Bienestar animal | 24 |
| 3.3.1.2. Características seminales del macho cabrío MG | 27 |
| 3.3.1.3. Sistema automatizado de evaluación espermática | 31 |
| 3.3.1.4. Congelación de semen en caprino | 33 |
| 3.3.2. Aparato reproductor femenino | 37 |
| 3.3.2.1. Ciclo estral en la cabra | 38 |
| 3.3.2.2. Sincronización de estros para IA | 41 |
| 3.3.2.3. Probióticos y fertilidad | 43 |
| 3.3.3. Diagnóstico de gestación en caprino | 46 |
| 4. MATERIAL y MÉTODOS | 50 |
| 4.1. Material | 50 |
| 4.2. Diseño experimental | 53 |
| 4.2.1. Experimento 1: Recogida de semen caprino con tres estímulos sexuales diferentes. Libido y calidad seminal del eyaculado | 54 |
| 4.2.2. Experimento 2: Comportamiento sexual y calidad seminal del macho cabrío MG en distintas edades | 55 |
| 4.2.3. Experimento 3: Diseño de un protocolo de congelación seminal caprina, mediante la adaptación de un protocolo utilizado en la especie porcina, y de un diluyente seminal que proporcione elevada calidad seminal post-descongelación | 55 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.4. Experimento 4: Diferencias en la salida en celo y en las alteraciones vaginales provocadas por dos métodos de sincronización de estro en caprino y su relación con la fertilidad en los dos ciclos siguientes. | 56 |
| 4.2.5. Experimento 5: Utilización del probiótico intravaginal <i>Lactobacillus plantarum</i> , cepa I1001 para prevenir las alteraciones vaginales derivadas del uso de esponjas intravaginales en programas de sincronización de estros y elevar la tasa de fertilidad | 57 |
| 4.2.6. Experimento 6: Comparación de 2 métodos de diagnóstico de gestación: evaluación ecográfica endovaginal y cuantificación de progesterona sérica | 57 |
| 4.3. Métodos | 58 |
| 4.3.1. Alojamiento y alimentación de los animales | 58 |
| 4.3.2. Extracción de semen | 60 |
| 4.3.3. Medida del tiempo de reacción (TR) | 62 |
| 4.3.4. Procesado del eyaculado | 63 |
| 4.3.5. Protocolo de congelación seminal | 63 |
| 4.3.6. Evaluación de la calidad seminal de muestras descongeladas | 64 |
| 4.3.7. Sincronización de estros en hembras caprinas y utilización de bacterias del ácido láctico (BAL) | 66 |
| 4.3.8. Medición del pH del flujo vaginal | 68 |
| 4.3.9. Inseminación artificial o puesta con los machos | 69 |
| 4.3.10. Análisis del perfil inmunológico y hormonal | 70 |
| 4.3.11. Evaluación ecográfica | 71 |
| 4.4. Análisis estadístico | 73 |
| 5. RESULTADOS | 75 |
| 5.1. Experimento 1: Recogida de semen caprino con tres estímulos sexuales diferentes. Libido y calidad seminal del eyaculado | 75 |
| 5.2. Experimento 2: Comportamiento sexual y calidad seminal del macho cabrío MG en distintas edades | 81 |
| 5.3. Experimento 3: Diseño de un protocolo de congelación seminal caprina, mediante la adaptación de un protocolo utilizado en la especie porcina, y de un diluyente seminal que proporcione elevada calidad seminal post-descongelación | 88 |
| 5.4 Experimento 4: Diferencias en la salida en celo y en las alteraciones vaginales provocadas por dos métodos de sincronización de estro en caprino y su relación con la fertilidad en los dos ciclos siguientes | 97 |
| 5.5. Experimento 5: Utilización del probiótico intravaginal <i>Lactobacillus plantarum</i> , cepa I1001 para prevenir las alteraciones vaginales derivadas del uso de esponjas intravaginales en programas de sincronización de estros y elevar la tasa de fertilidad | 100 |
| 5.6. Experimento 6: Comparación de 2 métodos de diagnóstico de gestación: evaluación ecográfica endovaginal y cuantificación de progesterona sérica | 102 |

| | |
|---|------------|
| 5.6.1. Evaluación ecográfica | 102 |
| 5.6.2. Análisis hormonal | 104 |
| 6. DISCUSIÓN | 107 |
| 6.1. Experimento 1: Recogida de semen caprino con tres estímulos sexuales diferentes. Libido y calidad seminal del eyaculado | 107 |
| 6.2. Experimento 2: Comportamiento sexual y calidad seminal del macho cabrío MG en distintas edades | 110 |
| 6.3. Experimento 3: Diseño de un protocolo de congelación seminal caprina, mediante la adaptación de un protocolo utilizado en la especie porcina, y de un diluyente seminal que proporcione elevada calidad seminal post-descongelación | 113 |
| 6.4. Experimento 4: Diferencias en la salida en celo y en las alteraciones vaginales provocadas por dos métodos de sincronización de estro en caprino y su relación con la fertilidad en los dos ciclos siguientes | 122 |
| 6.5. Experimento 5: Utilización del probiótico intravaginal <i>Lactobacillus plantarum</i> , cepa I1001 para prevenir las alteraciones vaginales derivadas del uso de esponjas intravaginales en programas de sincronización de estros y elevar la tasa de fertilidad | 125 |
| 6.6. Experimento 6: Comparación de 2 métodos de diagnóstico de gestación: evaluación ecográfica endovaginal y cuantificación de progesterona sérica | 130 |
| 7. CONCLUSIONES | 135 |
| 8. RESUMEN | 138 |
| 9. SUMMARY | 145 |
| 10. ABREVIATURAS | 152 |
| 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 156 |
| ANEXOS | 183 |
| A. Índice de Tablas | 183 |
| B. Índice de Figuras | 185 |

1. INTRODUCCIÓN y JUSTIFICACIÓN

1. INTRODUCCIÓN y JUSTIFICACIÓN

La **Inseminación Artificial** (IA) puede definirse como el conjunto de técnicas mediante las cuales los espermatozoides del macho son obtenidos, trasladados y depositados en los genitales de la hembra sin la existencia de la cópula. Fue la primera de las tecnologías de reproducción asistida que fue aplicada, y en reproducción animal, sigue siendo la más utilizada actualmente, debido a su relativa simplicidad, bajo coste y su capacidad de producir cambios significativos en la productividad de la progenie de forma rápida (Evans & Maxwell, 1987; Chemineau *et al.*, 1991; Leboeuf *et al.*, 2000).

La IA es la tecnología de la reproducción que más ha contribuido al mejoramiento genético y la más utilizada en todo el mundo (Nicholas, 1996; Baldassarre, 2007). Entre las *ventajas* que la convierten en uno de los métodos de elección en la producción ganadera destacamos las siguientes (Poto *et al.*, 1995; Mocé *et al.*, 2019):

- Mejora genética: gracias a esta técnica el mejoramiento genético es acelerado mediante el uso de sementales probados. Al utilizar machos mejorantes se puede tener un beneficio directo sobre la producción de la progenie resultante. También facilita la introducción de un nuevo genotipo.

- Conservación prolongada del semen: el semen procedente de sementales valiosos se puede conservar congelado para utilizarlo posteriormente, pudiendo prolongarse este almacenamiento durante años e incluso después de la muerte del ejemplar, lo que incrementa el número de sementales disponibles para asegurar la variabilidad genética.

- Fácil transporte del material genético: el semen extraído puede transportarse a otras explotaciones ganaderas diluido en fresco, refrigerado o congelado, siendo su transporte más sencillo y económico que el de animales completos.

- Aumento de la eficiencia reproductiva: a partir de un eyaculado se pueden obtener varias dosis de semen fresco diluido, por lo que hay una mayor utilización del material genético de interés. Se reducen también los gastos de la manutención de un gran número de machos.

- Prevención de enfermedades: por medio de la IA se evita el contacto directo entre el macho y la hembra, por lo que puede existir un mejor control y prevención de diferentes enfermedades, principalmente las de transmisión sexual.

- Facilitar el control de la paternidad, lo que es indispensable en los programas de selección.

- Utilización de programas de reproducción dirigida o asistida: al contar con programas de inducción y sincronización del estro, se pueden planear las temporadas de IA, agrupando los nacimientos, facilitando el manejo de la explotación y la atención a las crías. Se consigue de esta manera obtener lotes de animales en igual estado productivo, lo que se traduce en la obtención de mayores rentas al ofertar animales de buena calidad en lotes homogéneos.

Entre las *desventajas* de la IA hay que tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- La IA necesita de un cierto equipamiento (microscopio, calefactor, centrífuga, diluyentes, catéteres, etc.) que eleva el coste con respecto a la monta natural. Además de hormonas si se realiza con sincronización de estros de las hembras.

- Para obtener buenos resultados es importante que el proceso sea realizado por una persona capacitada en IA (técnico agropecuario, agrónomo o veterinario) y contar con uno o dos ayudantes durante el manejo de los animales.

- La fertilidad obtenida en programas de IA es menor si se compara con la monta natural o dirigida.

Las numerosas ventajas que presenta la IA superan a los inconvenientes, pero esta metodología todavía requiere de mejoras en los distintos pasos de los que se compone para conseguir extraer todos los beneficios posibles y obtener el mayor éxito reproductivo y de transmisión de las características de interés de manera eficaz, rápida y segura.

El éxito reproductivo en cualquier especie recae en ambos progenitores por lo que deben estudiarse los factores que afectan a todo el proceso reproductivo, tanto en machos como en hembras. En la especie que ocupa esta Tesis, la especie caprina, podemos tratar numerosos puntos susceptibles de actuación para elevar las tasas de recién nacido vivo.

En referencia a los **machos**, escoger a los reproductores a una edad temprana permitirá alargar la vida reproductiva de un ejemplar de valor genético, pero siempre sin descuidar la calidad seminal del mismo, que debe ser suficiente para asegurar buenas tasas de preñez.

Los machos utilizados como sementales deberán proporcionar elevadas tasas de preñez durante la época de cubrición. Para lograr esto, lo ideal es que un macho combine una buena capacidad de producir espermatozoides viables con el deseo de detectar y cubrir a las hembras en celo (Mateos, 1990). Un macho con baja actividad sexual va a presentar problemas tanto en recogida con vagina artificial (VA), un mayor tiempo de reacción (TR), como en el porcentaje de hembras cubiertas por monta natural, y si no se identifica a tiempo puede retrasar o comprometer el rendimiento productivo del rebaño (Pérez & Mateos, 1993). Sin olvidar que el número de hembras que un macho pueda dejar preñadas durante la estación de cubrición dependerá también de su producción espermática y de la calidad de dicha producción, al igual que el número de dosis que podremos obtener de un eyaculado cuando se le quiera incluir en un programa de IA (Pérez, 1992).

Conocer la edad a la que un macho posee una calidad seminal óptima a la vez que una libido elevada puede mejorar el plan reproductor de una explotación caprina. Un factor que no debemos olvidar es la precocidad de la llegada a la pubertad de los machos, ya que, si esta capacidad de cubrición y calidad seminal adecuada aparece pronto en el ejemplar, este podrá ser testado e incorporado a los programas de mejora genética mucho antes, alargando su vida productiva.

Siempre que se evalúe el comportamiento sexual de los machos se deben tener en cuenta los diferentes factores que van a determinar dicho comportamiento: variaciones individuales entre machos, que pueden llegar a ser muy marcadas, edad del macho, raza o estación del año, ya que estas especies son reproductores estacionales y existen diferencias de comportamiento por la influencia del fotoperiodo (Folch & Roca, 1982; Mateos & Zubieta, 1990). En la raza que nos ocupa, la raza Murciano-Granadina (MG), la estacionalidad es muy poco marcada, o incluso inexistente (Zarazaga *et al.*, 2003; ovigen.es).

El comportamiento sexual de machos cabríos ha sido estudiado por algunos autores (Chemineau, 1986; Zubieta, 1990; Pérez *et al.*, 1992; Pérez, 1992) y en general, todos utilizan como parámetros objetivos la libido, el TR a la primera eyaculación y el número de cubriciones en un tiempo dado.

La diseminación de las características genéticas de los machos de interés en la especie caprina se ve muy beneficiada si la IA se realiza con semen congelado. El uso de semen congelado en programas de IA ofrece la posibilidad de almacenar material genético de machos valiosos para su uso a lo largo del tiempo, incluso después de la muerte del ejemplar (Vázquez *et al.*, 2001), así como su distribución a granjas geográficamente distantes sin detrimento de la calidad del semen.

Sin embargo, en la especie caprina, la IA con semen congelado se realiza con poca frecuencia, debido a la baja tasa de fertilidad de este tipo de semen. Mientras que con el semen fresco las tasas de gestación más comunes están

alrededor del 65-70% (Greyling & Van der Nest, 2000; Romano, 2004) y a veces alcanzan el 80% (Lorenzo *et al.*, 1997), con semen refrigerado pueden estar sobre el 59% (Mocé *et al.*, 2022), si se usa semen congelado, por lo general oscilan entre el 20-40% (Gibbons, 2002; Vera *et al.*, 2004).

Estas bajas tasas de gestación son debidas en parte al deterioro que sufren las células espermáticas durante el proceso de congelación-descongelación. Numerosos factores influyen en la calidad seminal tras la descongelación, como el diluyente utilizado, el protocolo de dilución y congelación o el procedimiento de evaluación (Hernández-Corredor, 2014). Por lo tanto, para que la IA tenga éxito con el semen congelado, debe existir un protocolo de congelación adecuado que utilice un diluyente que proporcione nutrientes y proteja a los espermatozoides permitiéndoles sobrevivir. Este diluyente también debe ser sencillo de fabricar y, si es posible, económico.

El protocolo de congelación propuesto por Thilmant (1997) emplea una curva de bajadas de temperaturas controladas por un sistema informático, lo que hace que el enfriamiento de las células se produzca exactamente al ritmo establecido, frente al sistema de congelación por vapores de nitrógeno líquido (N₂L) usado tradicionalmente en la congelación de semen caprino (Evans & Maxwell, 1990; Salamon & Maxwell, 2000). Este sistema automatizado ha sido ampliamente utilizado por el Equipo de Mejora Genética Animal del IMIDA durante años en la criopreservación seminal porcina, obteniéndose buenos resultados en la calidad seminal post-descongelación de verracos, y se quiere comprobar si este protocolo también es adecuado para machos cabríos.

Junto a este protocolo se ha diseñado un nuevo diluyente, basado en las propiedades del dodecil sulfato sódico (SDS) como un producto tensioactivo que estabiliza los fosfolípidos de la membrana, protegiéndolos contra el daño causado por la congelación-descongelación (Pursel *et al.*, 1978; Foote & Arriola, 1987). Este SDS está contenido en el *Orvus Es PASTE* del protocolo Thilmant

(1997), pero nuestra hipótesis es que, si se añade de forma independiente, proporcionará la misma calidad seminal a un precio más económico.

Para la congelación seminal, el primer paso que hay que dar es la obtención de un semen de calidad. Durante el siglo XX la recolección de semen caprino ha sido realizada mediante la presentación a un macho de una hembra caprina sujeta por un potro metálico o de madera. Esta hembra era estimulada para la aceptación de la monta del macho mediante estrógeno inyectable, normalmente, benzoato o valerato de estradiol (Acosta *et al.*, 2007; uco.es), lo que provocaba los mismos efectos que el 17β -estradiol, compuesto natural producido en la fase folicular del ciclo reproductivo. Los inyectables que presentan componentes derivados del estradiol han sido prohibidos en la Unión Europea por la posibilidad de causar efectos adversos en el consumidor en caso de que las carnes derivadas de la cabra estrogenizada alcancen la cadena alimentaria (González de Bulnes, 2013; mapa.gob.es).

Por otra parte, la hembra caprina destinada a señuelo, y por tanto, a estrogenización, ha de recibir varias inyecciones a lo largo de todo el periodo de recogida, con lo que suele ser el mismo animal el utilizado en todas las recogidas del centro o granja donde se prepara semen caprino, comprometiéndose su bienestar. La aparición de anomalías en la fisiología puede ser frecuente por la sobredosificación tanto de los inyectables continuados como por la acumulación de derivados metabólicos en el proceso de detoxificación (Silva & Loaiza, 2007; García, 2018).

En otras especies, el problema se ha resuelto con la utilización de maniqués, como es el caso del ganado porcino (Poto *et al.*, 2000a), o con la utilización de machos de esa misma especie, como es el caso del ganado bovino, que utiliza otros toros para que salten sobre ellos los machos donantes (Arieta *et al.*, 2014).

Por todo esto, son puntos de actuación a tener en cuenta la obtención de semen de calidad, minimizando el estrés animal y la consecución de un protocolo

de congelación seminal que proporcione una elevada calidad espermática post-descongelación.

A nivel de la **hembra**, también son importantes las actuaciones realizadas para elevar las tasas de fertilidad. La sincronización de estros en hembras caprinas requiere en la mayoría de protocolos de la introducción de un dispositivo de liberación hormonal intravaginal, y de su mantenimiento durante varios días.

Entre las diferentes variantes de dispositivos liberadores de hormonas, se encuentran las esponjas de poliuretano de alta densidad, impregnadas con progestágenos sintéticos [acetato de medroxiprogesterona (MAP), acetato de fluorogestona (FGA)]. Éstos son los dispositivos de elección, debido principalmente a la practicidad de uso y bajo costo. Los progestágenos se caracterizan por poseer una actividad varias veces más potente que la progesterona (Shelton, 1965), por lo que se utilizan cantidades mucho más reducidas. Otras variantes de dispositivos intravaginales son los realizados en silicona, impregnados con progesterona, que varían en sus formas, tamaños, y número de veces que pueden ser reutilizados (CIDR[®], PRID[®], Cronipres CO, DICO) (Manes & Ungerfeld, 2015).

La utilización de dispositivos intravaginales para la inducción de celo en cabras y ovejas generalmente ocasiona vaginitis, generando un flujo anormal, putrefacto y en algunas ocasiones hemorrágico (Cortés-López *et al.*, 2013). Esta sintomatología está relacionada con el aumento de la microbiota anormal bacteriana, principalmente de bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* (Martins *et al.*, 2009). Estos cambios pueden afectar a la supervivencia de los espermatozoides a su paso y traducirse en una menor tasa de fertilidad (Manes & Ungerfeld, 2015). Además, hay estudios que afirman que estas alteraciones en el ambiente vaginal van a influir en la atractividad sexual de ovejas en celo, disminuyendo la atractividad a los carneros de las ovejas que habían utilizado dispositivo intravaginal, frente aquellas que tuvieron celo

espontáneo, no recuperándose esta atractividad normal ni siquiera con el uso de antibióticos (Gatti, 2010; Gatti & Ungerfeld, 2012).

Suárez *et al.* (2006) demostraron que la presencia de dispositivos intravaginales durante el tratamiento de sincronización e inducción del estro genera una reacción inflamatoria que aumenta la secreción local de mucus, con el consiguiente aumento de la flora bacteriana en ovejas y en cabras (Manes *et al.*, 2013). En cabras se observan en tratamientos de sincronización de corta duración (6 días) y en los tratamientos largos (11 días) (Manes *et al.*, 2013).

La presencia de un fluido vaginal anormal se ha correlacionado también con el aumento de la incidencia de ovocitos no fertilizados en ovejas superovuladas, con problemas en el desarrollo de los embriones y bajas tasas de preñez en embriones trasplantados (Scudamore, 1988).

Para solucionar la vaginitis y limitar el crecimiento bacteriano debido a la presencia de un dispositivo intravaginal de sincronización de celos, se han utilizado antibióticos tanto por vía parenteral como de forma local (impregnados en el propio dispositivo intravaginal). Aunque pueden resultar eficaces en la disminución de bacterias patógenas, se tiende cada vez más a reducir su utilización para evitar la peligrosidad de estas sustancias por su capacidad para crear resistencia cruzada con los antibióticos utilizados en medicina humana y por la presencia de residuos de éstos en los productos de origen animal como la leche (Romero *et al.*, 2016). Sería interesante encontrar alguna alternativa al uso de antibióticos para evitar la proliferación de microorganismos que pueden ser patógenos o causantes de disbiosis en el ambiente vaginal, y que consecuentemente se traducen en menores tasas de fertilidad y de gestaciones exitosas.

En los últimos años está cobrando fuerza el uso de probióticos para limitar el crecimiento de especies de microorganismos causantes de patologías. Limitar estas alteraciones en la vagina de hembras sometidas a programas de

sincronización de celos podría ayudar a elevar las tasas de fertilidad y, por tanto, aumentar el número de nacimientos. En especies como la humana, el uso de probióticos del género *Lactobacillus spp.* está teniendo resultados satisfactorios en el restablecimiento de la microbiota vaginal alterada y mejorando las tasas de concepción (Hyman *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2016).

Una vez realizada la IA o la monta natural, un correcto y temprano diagnóstico de gestación es de gran importancia en el manejo reproductivo de una explotación ganadera, ya que diferenciar hembras preñadas de las que no lo están permite adecuar la alimentación de las hembras preñadas e incluir en un nuevo proceso de IA o de puesta con un macho a aquellas cabras vacías.

La utilización de machos vasectomizados puede resultar útil en la detección de hembras que vuelven a salir en celo al no haber quedado preñadas mediante IA. Aproximadamente 21 días tras la IA, la hembra caprina volverá a mostrar celo, y este podrá ser detectado si se deja montar por un macho. Tradicionalmente, la gestación en caprinos era detectada por el retorno a celo de las hembras no gestantes (Goel & Agrawal, 1992), o bien por palpación manual en los flancos de la hembra para detectar la presencia del feto, obligándole a moverse dentro del líquido amniótico (Taverne & Noakes, 2009). Estos métodos tienen el inconveniente de que durante la época de anestro estacionario es difícil que las hembras retornen al estro, o esperar a la segunda mitad de la gestación para poder detectar movimientos fetales por palpación (Memon & Ott, 1980; Taverne & Noakes, 2009).

El uso de la ecografía ha revolucionado el diagnóstico de la gestación, ya que permite detecciones tempranas de la misma. En la especie caprina, a partir del día 25-26 de gestación se puede detectar la presencia de vesícula/s embrionaria/s prácticamente en el 100% de los casos, realizando ecografía transrectal o intravaginal (Gonzales *et al.*, 2004; Karen *et al.*, 2014).

Otro método de diagnóstico de gestación es la determinación de los niveles de progesterona en sangre periférica en tiempos establecidos desde el momento de la monta o la IA (Hussain, 2015). Durante el estro los niveles de progesterona son muy bajos y se van incrementando sobre el día 6 del ciclo, alcanzando su pico sobre el día 12, y descendiendo rápidamente a partir del día 15 del ciclo en hembras no preñadas, mientras que permanece elevada en hembras que han quedado gestantes (Khanum *et al.*, 2008).

El nivel de progesterona sérica ha sido utilizado para detectar gestación en cabras en los días 19-21 post-monta (Boscos *et al.*, 2003), ya que la concentración de esta hormona decrece rápidamente durante la regresión del cuerpo lúteo (CL) en hembras no preñadas, volviendo a elevarse a partir de los 4 días siguientes al estro (Jarrell & Dzink, 1991), mientras que las hembras preñadas mantienen elevada la concentración de progesterona durante todo este tiempo al no haber regresión del CL (Kandiel *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS e HIPÓTESIS

2. OBJETIVOS e HIPÓTESIS

2.1. Objetivo general

En esta Tesis Doctoral proponemos como *objetivo general* la mejora de la tecnología de la Inseminación Artificial (IA) en la especie caprina, actuando tanto a nivel del macho cabrío como de la hembra, centrándonos en la raza Murciano-Granadina (MG). En el caso del macho, elaborando un protocolo de congelación de semen caprino que proporcione elevada calidad espermática post-descongelación y a nivel de la hembra caprina, mediante la optimización de los protocolos de sincronización de estros y de mejora del ambiente vaginal previo a la IA, y todo ello, teniendo siempre presente el bienestar animal.

2.2. Objetivos específicos

Como *objetivos específicos* planteamos los siguientes:

- Mejora del bienestar animal durante la extracción de semen caprino de calidad óptima, mediante la utilización de una hembra sin estrogenizar, un macho o un maniquí como estímulo sexual.
- Determinación de la edad mínima a la que los machos cabríos MG tienen suficiente libido y proporcionan una óptima calidad seminal para ser incluidos como reproductores.
- Optimización del protocolo de congelación de semen en la especie caprina, mediante el ajuste de protocolos adaptados de otras especies, el uso de una curva automatizada de bajada de temperatura y la elaboración de un nuevo diluyente seminal.
- Mejora de la sincronización de celos, evitando causar alteraciones en la mucosa y la microbiota vaginal, lo que se traducirá en un mejor ambiente durante el tránsito espermático en la IA o en la monta natural.

- Desarrollo de un protocolo de diagnóstico precoz de la gestación en la hembra caprina MG, mediante ecografía y cuantificación de progesterona sérica.

2.3. Hipótesis

Como *hipótesis de esta Tesis Doctoral* planteamos que se puede mejorar la técnica de la IA caprina con semen congelado trabajando a nivel del macho y de la hembra en los puntos del proceso mencionados anteriormente y que son susceptibles de mejora. El resultado final sería una elevación de las tasas de fertilidad al utilizar la técnica de la IA con semen congelado, a la vez que se mejoraría el bienestar animal durante la obtención del semen.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Origen de la Inseminación Artificial (IA)

La IA en ganado se remonta a épocas muy lejanas en la antigüedad. Del año 1322 se recoge la historia de la que podría ser una de las primeras inseminaciones de las que se tiene constancia. Se realizó en Arabia y consta de dos versiones. La primera cuenta que un jefe árabe recogió de forma clandestina el semen de un magnífico ejemplar de potro, colocando una esponja en la vagina de una yegua servida y trasladando esta esponja a los genitales de su yegua, quedando ésta preñada. La otra versión cuenta que el semen se recuperó de la vagina de una yegua recientemente apareada, se transportó en leche de camella y se depositó en la vagina de otra yegua. Obtuvo un potrillo muy parecido al donante, por lo que parece que la inseminación fue exitosa (Chávez, 2014).

En 1779, el monje Italiano *Lázaro Spallanzani*, habiendo obtenido éxito en animales inferiores (anfibios), decidió experimentar con especies vivíparas, empezando por el perro. La primera IA la realizó en una perra de raza Spaniel con semen recogido por eyaculación espontánea de un macho; de la que nacieron 3 cachorros (Moreno, 2004a,b; Chávez, 2014). En 1782, Spallanzani encargó al Prof. *Pietro Rossi*, repetir la experiencia, procurando un riguroso control en la misma, aislando al animal antes y después de la inseminación, obteniéndose pleno éxito y confirmando de este modo el descubrimiento.

A partir de 1890, la IA llamó poderosamente la atención en todo el mundo, hasta el punto de considerar que la referida técnica había de ser la solución de gran número de problemas de reproducción, no sólo en animales, sino en la especie humana.

Durante el siglo XIX, las experiencias de inseminación en animales fueron escasas y sin una base científica. Fue a partir de 1900, cuando en Rusia, el Prof. *Elías Ivanov* comenzó a experimentar con la IA, desarrollando su labor desde un

punto de vista científico y experimental, que le llevó a concebir el problema de la fecundación artificial de una manera muy semejante a como se lleva a cabo en la actualidad. Trabajó en todas las especies e inició los primeros estudios del uso de diluyentes y conservación espermática, utilizando normas y principios que aún se utilizan en la actualidad. Utilizó el procedimiento del preservativo en algunas especies y el colector vaginal en otras e ideó su método de la esponja, que fue difundido con total rapidez por el mundo entero. También realizó el transporte de espermatozoides a distancia, consiguiendo obtener híbridos desconocidos hasta la fecha, y su labor de investigación y enseñanza fue tan extensa que más de 400 veterinarios fueron adiestrados en su Instituto entre 1910 y 1914. De tal modo contribuyó a la difusión de esta técnica que puede considerarse a él junto con su escuela, como el órgano rector que marcó las directrices de la IA en el mundo (Moreno, 2004a).

En el año 1914, *Giuseppe Amantea* desarrolló en Italia una VA para perros, modelo en el cual se basaron los rusos para crear las vaginas artificiales para vacuno, ovino y equino (Cruz, 2004; Ombelet & Robays, 2010).

Siguiendo las enseñanzas de Ivanov, entre 1914 y 1950, la técnica de la IA se extiende por el mundo. En Japón, *Nichikawa* realizó IA en vacas, ovejas, cabras, cerdos y aves. A finales de los años 30 los árabes estaban reproduciendo miles de cabezas de ganado vacuno y ovino mediante IA (Duarte, 2010). En Rusia, *Milanov* diseñó vaginas artificiales para recogida de semen muy similares a la utilizadas actualmente (Cruz, 2004; Giraldo, 2007; Ombelet & Robays, 2015) y junto con *Ivanov* comenzó el mayor proyecto de IA en vacas y ovejas. En 1923, se inseminaron 1.000 yeguas, número que se fue incrementando hasta llegar a 250.000 en 1929 (Moreno, 2004a), llegando a reportarse en 1938, la cantidad de 19.800 vacas y otros miles de ovejas (Foote, 2002; Cruz, 2004).

Fue también en este intervalo de tiempo cuando se forman las primeras cooperativas de inseminación. En 1936, *Sorensen* y *Gylling-Holm* organizaron la primera cooperativa de IA en Dinamarca, llegando a inseminar 1.070 vacas el

primer año, lo que ocasionó un estímulo para el desarrollo de la industria del ganado lechero. En 1938, se estableció la primera cooperativa de IA en New Jersey (EEUU) siendo uno de los impulsores el Prof. *E.J. Perry*, tras visitar la creada en Dinamarca. Desde New Jersey se extendieron a todo el mundo (Cruz, 2004; Ombelet & Robays, 2010).

A la vez que la técnica de IA se iba extendiendo a lo largo del mundo, se fue desarrollando la tecnología para mejorarla. Ivanov ya afirmó que el frío actuaba como conservador de la actividad zoospérmica (observaciones que ya había realizado Spallanzani). La conservación espermática en el tiempo abría un sinfín de oportunidades, pero era necesario adecuar los procesos para que se realizara en condiciones óptimas. *Phillips* y *Lardy* en 1939, fueron los primeros en utilizar la yema de huevo para proteger los espermatozoides de toro del choque térmico al enfriarse. *Salisbury* adicionó a los medios además de la yema de huevo, citrato de sodio, lo que permitió mantener el semen a 5°C durante un periodo de tres días (Ombelet & Robays, 2010; 2015).

En 1949, en Inglaterra, *Polge*, *Smith* y *Parkes*, hicieron posible la congelación del semen con el agregado de glicerina en el diluyente y el empleo de hielo seco (Chávez, 2014; citado por Ombelet & Robays, 2015).

En 1950, científicos de la Universidad de Cornell (EEUU) descubrieron el beneficio de antibióticos añadidos a la solución de esperma en procesos de IA. El llamado diluyente Cornell, creado por *Foote* y *Braton* en 1950 (Ombelet & Robays, 2015), contenía una mezcla de antibióticos de penicilina, estreptomina y polimixina B y fue utilizado durante muchos años (Ombelet & Robays, 2010).

A partir de 1960, se establece el N₂L como refrigerante de elección, permitiendo conservar las células espermáticas a -196°C durante periodos indefinidos de tiempo. Esto permite la creación de bancos de germoplasma a partir de 1965 (Moreno, 2004a).

3.2. Situación de la raza caprina Murciano-Granadina (MG)

La raza caprina Murciano-Granadina (MG) procede filogenéticamente de la *Capra aegagus*, cuya forma secundaria es la *Capra pirenaica*. Tanto la raza Granadina como la Murciana fueron razas diferentes hasta el año 1975, cuando se aprueba el libro Genealógico de la raza MG (cabrandalucia.com). La primera vez que se menciona en textos legales a la Raza MG es en la Resolución de 28/03/1979, de la Dirección General de la Producción Agraria por la que se aprueba el Esquema de Valoración Genético-Funcional de Machos Reproductores de la Raza MG. El Ministerio de Agricultura, unió por decreto, los destinos de las entonces razas Granadina y Murciana, dos entes raciales perfectamente definidos en aquellos tiempos.

Con el transcurso de los años de gestión conjunta de ambas razas, y tras los avatares que han afectado en los últimos 40 años al caprino español (transición a la democracia, federalización del estado, adhesión a la UE, globalización, etc.), la situación actual de la raza se concreta en la existencia de animales que responden a los dos morfotipos originales y un tercer morfotipo MG resultante del cruce entre las variedades originales que se encuentra en gran expansión y reconocimiento (murcigran.es).

En el Catálogo Oficial de Razas de Ganado del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, la raza MG se encuentra incluida en el grupo de razas Autóctonas de Fomento.

3.2.1. Descripción

El prototipo racial es el siguiente (cabrandalucia.com) (**Figuras 3.1 y 3.2**):

- Capa: Uniforme, de color negro o caoba, con mucosas oscuras o sonrosadas.
- Cabeza: Tamaño medio de forma triangular, con amplia frente, sutura fronto-nasal ligeramente deprimida, orejas de tamaño medio, rectas o

ligeramente inclinadas, generalmente sin cuernos y con frecuencia presencia de mamellas.

- Cuello: Largo, fino y cónico en las hembras, más corto y potente en los machos.
- Tronco: Amplio y profundo. Costillares arqueados. Cruz levemente destacada, línea dorso lumbar recta. Amplia grupa e inclinada. Vientre amplio. Cola corta y eréctil.
- Mamas: Amplias, voluminosas, simétricas con amplia base de implantación. Pezones diferenciados de medio desarrollo, fuertes y dirigidos hacia delante y afuera.
- Extremidades: Finas, sólidas, con buenos aplomos, de longitud media. Articulaciones netas. Los muslos y piernas presentan arqueamiento en su cara interna. Pezuñas pequeñas, recogidas, fuertes y de color oscuro.

3.2.2. Cualidades y aptitudes

- Peso: Animales de perfil subcónico, eumétricos y de proporciones medias con tendencia a la longimorfosis.
- Volumen corporal medio: El peso medio de las hembras adultas oscila entre los 40-50 Kg, mientras que en machos se encuentra entre 50-60 Kg.
- Producción (l/día): Existe variabilidad entre hembras y según el periodo reproductivo en el que se encuentre, pero en promedio es de 2,1 l/día.
- Sistema de explotación recomendado: Semi-extensivo, semi-intensivo, intensivo.
- Prolificidad: Elevada. Se establece en 2,0 cabritos/parto (segundos partos) y en 1,4 cabritos/parto (primeros partos).
- Fertilidad: Elevada. Fértil todo el año. A pesar de que los caprinos son considerados reproductores estacionales de día corto, en esta raza se ha comprobado su eficacia reproductora durante todo el año.
- Rusticidad: Raza de interés para países calurosos y áridos.
- Aptitud: Tanto lechera como para producción de carne.



Figuras 3.1 y 3.2. Ejemplares de macho cabrío (izq.)
y de hembra caprina (dcha.) de raza Murciano-Granadina.

Los animales de la raza MG se encuentran distribuidos principalmente por las Comunidades Autónomas de Andalucía, Murcia, Valencia, Castilla-La Mancha, Baleares, Cataluña y Extremadura (feagas.com). Actualmente se trata de la raza caprina más cosmopolita de España con un censo estimado de 500.000 animales. Además de encontrarse distribuida por toda la geografía española, también está presente en diferentes países del continente europeo, americano y africano. Esta gran difusión es posible por su gran capacidad de adaptación y por el gran rendimiento quesero de su leche.

La producción de la raza MG está orientada a la obtención de leche. Según los datos de Control Lechero Oficial, los rendimientos de producción de leche de la cabra MG se establecen para cabras de primer parto, en 150 días de lactación, en 310 Kg de leche, y para cabras de segundo parto y sucesivos, en 210 días de lactación, en 513 Kg de leche. La mayor parte de la leche producida se destina a la producción de queso. En este sentido es importante destacar que en la Comunidad Murciana existen dos tipos de quesos amparados por una Denominación de Origen: “Queso de Murcia al Vino” y “Queso de Murcia”. La composición media de la leche de Cabra MG es: Grasa 5,5%; Proteína 3,7%; Lactosa 4,5%; Extracto Seco 14,1% (feagas.com).

Secundaria a su producción láctea se encuentra la producción cárnica, siendo el producto obtenido el tipo “cabrito de leche” de 25-30 días de edad y 7 a 9 Kg de peso vivo o bien el “caprino mayor” de 50-60 días (feagas.com).

Las razones de la superioridad de la raza MG sobre otras razas caprinas son las siguientes (treseus.com):

- Alta adaptación al clima seco y caluroso.
- Alta capacidad de reproducción en sistemas intensivos industriales y la más alta adaptabilidad a los métodos de explotación intensivos.
- Alta capacidad de adaptación a largas horas de marcha y resistencia a diferentes tipos de estrés.
- Buena resistencia a situaciones climatológicas extremas.
- Reproducción continua y no estacional.
- Alta calidad de sus producciones (tanto lechera como cárnica).
- Leche de alta calidad, óptima para industrias queseras y lácteas.
- Alto rendimiento lechero.
- Capacidad de adaptación rústica, siendo capaces de producir en zonas donde otras especies no podrían.
- Facilidad de producción lechera.

Todas estas características de la raza caprina MG, la convierten en una raza de enorme valor económico, gracias a su resistencia a climas áridos, su reproducción continua a lo largo del año y su gran producción lechera, que proporciona beneficios a las ganaderías. La mejora genética de esta raza mediante técnicas de reproducción asistida tales como la IA pueden ayudar a hacerla aún más productiva, respetando siempre el bienestar animal. De ahí el interés en que la técnica de la IA en esta raza sea optimizada y logre las mayores tasas de fertilidad y de parto posibles.

3.3. Reproducción en la especie caprina

3.3.1. Aparato reproductor masculino

El aparato reproductor del macho cabrío está compuesto por los testículos, epidídimos, conductos deferentes, ámpulas, vesículas seminales, próstata, glándulas bulbouretrales, uretra, pene y apéndice vermiforme o proceso uretral (Delgadillo, 2004).

Los testículos se encuentran en la bolsa escrotal, miden entre 7,5-11 cm de largo y 4,7 cm de ancho. Su peso oscila entre 150 y 180 g (Quiterio-Nuñez, 1993). La función principal de los testículos es la producción de espermatozoides y de hormonas como la testosterona, dihidrotestosterona e inhibina (Vera, 2009).

El epidídimo es un órgano tubular adherido al testículo y se divide en cabeza, cuerpo y cola. La maduración de los espermatozoides (adquisición de la motilidad y la capacidad de fecundación) se efectúa en la cabeza y el cuerpo, y la cola actúa de almacén de células maduras (Delgadillo, 2004).

Las glándulas bulbouretrales se alojan sobre la salida de la uretra y cerca del final de la cavidad pélvica. Durante la excitación sexual y la eyaculación drenan su secreción (Evans & Maxwell, 1990; Delgadillo, 2004). En caprino son importantes ya que producen enzimas que reaccionan con componentes de los diluyentes utilizados en crioconservación espermática, afectando negativamente a la calidad de los espermatozoides congelados (Pellicer-Rubio *et al.*, 1997; Sias *et al.*, 2005).

Los conductos deferentes transportan los espermatozoides desde la cola del epidídimo hasta la porción pelviana de la uretra. La dilatación final de cada conducto deferente se conoce como ámpula o ampolla y sirve como reservorio espermático.

Las glándulas anexas (vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales) contribuyen a la formación del plasma seminal. El plasma seminal es abundante en fructosa, ácido ascórbico, ácido cítrico, inositol e iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , entre otros. Nutre al espermatozoide, mantiene su metabolismo, limpia la uretra antes de la eyaculación y lubrica el pene. La función de estas glándulas depende de la secreción de la testosterona producida por las células de Leydig del testículo (Delgadillo, 2004).

El pene es el órgano copulador y presenta una flexura sigmoidea que le permite extenderse durante la cópula, terminando en una porción de tejido esponjoso denominado glande. Por el interior del pene transcurre la uretra que termina en el apéndice vermiforme o proceso uretral, éste gira rápidamente durante la eyaculación para esparcir el semen en la parte anterior de la vagina a modo de un aspersor (Delgadillo, 2004).

3.3.1.1. Métodos de recolección de semen caprino y su influencia en el Bienestar animal

La extracción de semen al macho cabrío es, lógicamente, un paso imprescindible si se quiere realizar IA. Esta recolección debe proporcionar un semen de calidad óptima, no ser excesivamente complicada de realizar y no comprometer el bienestar animal.

Los primeros métodos de recolección de semen en caprino consistían en la introducción de paños y/o esponjas en la vagina de hembras en celo, que eran escurridos tras la cópula con el macho, recogándose el semen allí depositado. Avanzando en el tiempo, ya a principios del siglo XX, la recolección seminal se realizaba introduciendo en la vagina de la hembra un colector de vidrio, colector de Dubois, en el cual se depositaba el semen del macho tras la monta (Poto *et al.*, 2021). Estas formas tradicionales de recogida tenían una ventaja muy importante y es que el bienestar animal no estaba comprometido. El acercamiento entre el macho y la hembra se producía de manera natural, al igual

que el cortejo y la penetración. El principal problema de este método era la retirada del colector de la vagina, la cual se hacía complicada debido a los movimientos de la cabra, y normalmente se perdía una parte del eyaculado. Actualmente, estas tecnologías no se utilizan, y han sido reemplazadas por la recogida seminal con VA (Poto *et al.*, 2021).

La VA consiste en una caja externa y una camisa interna de látex entre las cuales se infunde aire y agua caliente, a unos 45°C, para intentar igualar las condiciones de una vagina real en cuanto a temperatura y presión (Poto *et al.*, 1995; Cortés, 2003). Mediante esta técnica, podemos obtener un eyaculado con las mismas características que la monta natural, a la vez que se respeta el cortejo del macho. Este cortejo previo a la penetración, tanto por parte del macho como de la hembra en celo, es más importante de lo que pueda parecer en un principio, pues su realización ayuda a la emisión de gametos y fluidos protectores y nutritivos, mejorando la cantidad y la calidad de los mismos (Poto *et al.*, 2021).

Una de las principales desventajas del método de la VA es que requiere un periodo de entrenamiento (Maxwell & Evans, 1990; Wulster-Radcliffe *et al.*, 2001), para que el macho cabrío se habitúe a saltar y eyacular en presencia humana. Otra es que, debido a que este método permite el natural cortejo del macho sobre la hembra que ejerce de señuelo, ésta debe soportar los pataleos, golpes en los flancos, olfateos y montas de cuantos machos vayan a ser utilizados ese día (Poto *et al.*, 2021). Esto compromete su bienestar, junto con la inmovilización que se hace necesaria si la hembra “señuelo” no se encuentra en celo. Para conseguir que esta hembra muestre celos no es raro que a la hembra destinada a señuelo se le inyecte un derivado del estradiol, valerato o benzoato (Tirado, 2019; uco.es), lo que tampoco contribuye a su bienestar.

Para intentar suplir estos problemas de habituación de machos no acostumbrados pero que son de interés, o que no responden ante la presencia humana, se ideó el método de la electroeyaculación, consistente en la estimulación eléctrica de los últimos pares nerviosos lumbares y los primeros

sacos (Thomas, 1983; Abril, 2017). Esta estimulación eléctrica daña al animal al producir contracciones involuntarias de los tercios posteriores, arqueamiento involuntario de la columna vertebral, rotura de algún paquete muscular, aumento de la temperatura corporal y emisión de vocalizaciones de dolor (Abril, 2017; Poto *et al.*, 2021). Además, puede afectar a la calidad seminal al disminuir la concentración espermática por eyaculación retrógrada (Tecirlioglu *et al.*, 2002), obtenerse una menor concentración de semen que al recolectar con VA (Memon *et al.*, 1986) y a menudo el semen sale mezclado con orina o posee menor calidad que el recogido mediante VA (Cueto *et al.*, 2016). Tampoco resulta adecuado si lo que se quiere es una recogida seminal de la más alta calidad sin sufrimiento animal.

La utilización de otro macho cabrío como estímulo sexual podría liberar a la hembra estrogenizada de las repetidas utilizaciones e inyecciones. Su utilización es relativamente habitual en bovino (Arieta *et al.*, 2014). Incluso, si se quiere reducir al máximo el daño causado al animal utilizado como señuelo, está la posibilidad de utilizar un maniquí. El uso de maniquí ya ha sido empleado en la extracción de semen en otras especies como porcino (Poto *et al.*, 2000b) y ovino (Aguirre *et al.*, 2005) quienes publicaron que es posible que alrededor del 90% de los machos jóvenes pueden ser entrenados en la recogida de semen mediante VA utilizando como señuelo un objeto inanimado.

En el caso de la especie caprina, este maniquí será menos rechazado si tiene la forma y el tamaño de una cabra adulta, y se recomienda que esté realizado de un material impermeable, de fácil limpieza y resistente a los desinfectantes. Si este método de recogida resultara efectivo, y proporcionara calidades seminales similares a las obtenidas al utilizar una hembra, se eliminaría el sufrimiento animal del ejemplar usado repetidamente como estímulo. Cuenta además con otra ventaja y es la posibilidad de acoplar la VA al maniquí, lo que facilitaría que los machos donantes de interés que se asustan por la presencia humana, saltaran y eyacularan en la VA acoplada, sin la presencia cercana del técnico.

3.3.1.2. Características seminales del macho cabrío MG

El semen del macho cabrío es normalmente de color blanco cremoso, aunque en algunos machos puede presentar una coloración algo más amarillenta. El volumen promedio es de 1 ml, aunque pueden obtenerse eyaculados entre los 0,3 y más de 1,5 ml, dependiendo de la edad, estación del año, estado general del macho y ritmo de recogidas (Delgadillo, 2004).

La concentración espermática se suele expresar en número de espermatozoides/ml (esp/ml), y los valores normales oscilan entre 3.000-7.000 x 10⁶ esp/ml (Aisen & Venturino, 2004). Su determinación puede hacerse por medio de cámaras de recuento microscópico, con fotocolorímetros y con turbidímetros.

La valoración subjetiva de un eyaculado incluye, además de las observaciones macroscópicas y de concentración, una serie de valoraciones microscópicas que intentarán calificar la calidad de ese eyaculado y su poder fecundante. Estas valoraciones subjetivas incluyen:

- *Motilidad*: es la capacidad de movimiento de una célula espermática, y de forma tradicional se ha utilizado como única prueba para la contrastación seminal (Garde, 1993). Se evalúa tanto recién recogido como después de ser sometido a distintos procesos de conservación (Graham *et al.*, 1980; Umland, 1984).

- *Motilidad Masal*: consiste en observar las ondas que produce una masa espermática en movimiento. Debe realizarse inmediatamente tras la obtención del eyaculado y sin dilución del mismo (Evans & Maxwell, 1989; Garde, 1993). Para su medición se coloca una gota de semen en un portaobjetos atemperado a 37°C y sin cubrir, se observan las ondas características en el borde de la gota. Se valora de forma subjetiva, puntuándose de 0 a 5 (Aisen & Venturino, 2004).

- *Motilidad Individual (MI)*: Consiste en evaluar la calidad de movimiento espermático en una escala de 0 a 5 según la progresión de ese movimiento (Aisen & Venturino, 2004). La muestra debe ser diluida con un medio isosmótico. Se toma una gota de esta dilución, se deposita en un portaobjetos atemperado a 37°C y se cubre con un cubreobjetos. Normalmente se observa a 100X, evaluándose varios campos diferentes.

- *Porcentaje de espermatozoides móviles (%MOT)*: Aprovechando la preparación puede estimarse también este parámetro, adjudicando un valor subjetivo entre 0 y 100, correspondiente a la fracción del número de espermatozoides que presentan movimiento con respecto del total visualizado (Aisen & Venturino, 2004).

- *Vitalidad*: La forma más habitual de determinar el porcentaje de espermatozoides vivos es evaluar la integridad de la membrana plasmática de la cabeza por medio de colorantes que tiñen a los espermatozoides dañados, cuya membrana ha perdido su integridad, y por tanto, se les considera muertos. Estos espermatozoides permiten penetrar a los colorantes y por lo tanto aparecen coloreados en las tinciones, frente a los vivos, que quedan sin teñir. Las tinciones más utilizadas para determinar la vitalidad de una muestra son la eosina-nigrosina (Colas, 1980), tripán azul (Suttijotin & Thwaiter, 1991) y triple tinción (Talbot & Chacon, 1981) que permite observar a la vez espermatozoides vivos/muertos, su estado acrosómico y su morfología. Existen también tinciones supravitales para microscopios de fluorescencia, como la tinción con los fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína e ioduro de propidio (CFDA/IP) (Giuliano *et al.*, 2008; Carretero *et al.*, 2009).

- *Morfoanomalías*: la morfología espermática se considera reflejo del estado fisiológico del aparato reproductor frente a la producción de semen y almacenamiento en los conductos extragonadales (Garde, 1993). Las anomalías que aparecen en las células espermáticas pueden ser primarias (originadas durante la espermatogénesis), secundarias (durante el paso en el epidídimo) o terciarias (tras la eyaculación). Las muestras de semen caprino que

contengan más de un 15-20% de anomalías morfológicas no deben usarse en un programa de IA (Aisen & Venturino, 2004). A pesar de esto, no es un parámetro claramente correlacionado con la fertilidad (Garde, 1993). La determinación de formas anormales puede hacerse en extensiones teñidas para microscopía de campo claro, siendo la más usada la de eosina-nigrosina (Colas, 1980; Mickensen *et al.*, 1981). También se puede establecer el grado de morfoanomalías con microscopio de contraste de fases, previa inclusión de las muestras en solución salina formolada (Memon & Ott, 1981) o en una solución de glutaraldehído (Voglmayr *et al.*, 1983).

- *Integridad acrosómica*: el acrosoma es una estructura membranosa que ocupa la región anterior de la cabeza del espermatozoide, conteniendo enzimas que le permiten atravesar las envolturas que recubren al ovocito. Estas enzimas se liberan al exterior mediante un proceso de exocitosis llamado reacción acrosómica. Su integridad es uno de los datos más importantes ya que su daño total o parcial conlleva una incapacidad para fecundar (Aisen & Venturino, 2004). El estado del acrosoma puede valorarse de distintas formas así, con microscopía de campo claro para muestras teñidas con una solución de Giemsa al 6% (Watson & Martin, 1972); por microscopía de contraste de fases, utilizando una solución de glutaraldehído para fijar las muestras, donde se observa el estado del borde apical del acrosoma (Pontbrandt *et al.*, 1989). Estos autores siguen la metodología descrita por Pursel & Johnson (1974) y distinguen borde apical normal (NAR) correspondiente a acrosomas intactos, borde apical dañado (DAR), borde apical perdido (MAR) y borde apical suelto (LAC) (Garde, 1993).

El acrosoma también se puede analizar mediante microscopía de fluorescencia, tiñendo las células espermáticas con una combinación de fluoróforos (IP y lectina PNA) que distingue espermatozoides con acrosomas reaccionados y no reaccionados, además de la vitalidad de los mismos (Silva & Gadella, 2006; Hernández *et al.*, 2012). Tasseron *et al.* (1977) realizaron la determinación del estado del acrosoma por medio de microscopía electrónica de transmisión.

- *Resistencia osmótica*. Test de endósmosis celular: los espermatozoides de mamífero sometidos a condiciones hipoosmóticas se hinchan por la entrada de agua extracelular (Drevius & Eriksson, 1966), que origina la expansión de las membranas. Esta hinchazón se evidencia por el enrollamiento del flagelo en aquellas células que mantienen íntegra su membrana plasmática (Jeyendran *et al.*, 1984), ya que permiten el paso de agua al interior para establecer el equilibrio osmótico entre los espacios intra y extracelular, mientras que espermatozoides con membranas dañadas permanecen sin enrollar. Este test actúa, por tanto, como un test de vitalidad espermática y el porcentaje de endósmosis se correlaciona estrechamente con la fertilidad (Aisen & Venturino, 2004).

Existe toda una batería de pruebas bioquímicas que pueden aplicarse al semen. Algunas se basan en la constitución del plasma seminal y tiene que ver con funciones protectoras de amortiguación de la acidez y antioxidantes. Entre estas pruebas se encuentran la medición del pH seminal o la determinación de azúcares del plasma, como fructosa, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido láctico o pirúvico. La importancia de estas pruebas radica en que valores anormales de estos ácidos pueden correlacionarse con retrasos en la espermiogénesis, con la correcta producción de androsterona, necrosis y azoospermia, o el envejecimiento del eyaculado (Aisen & Medina, 1992; Aisen & Venturino, 2004).

Otras pruebas bioquímicas se relacionan con el metabolismo y las reservas metabólicas de los espermatozoides, como la determinación del poder de deshidrogenación sobre azúcares, el índice de fructólisis, que parece estar asociado a la motilidad de la muestra de semen, o el consumo de oxígeno (Aisen & Venturino, 2004).

Un tercer grupo de pruebas indican estrés oxidativo sufrido, estado de las membranas y permeabilidad selectiva de éstas, mediante determinación de peróxidos lipídicos como daño molecular de membranas, el contenido de glutatión seminal y/o espermático o la actividad superóxido dismutasa como

principal componente del sistema de defensa antioxidante (Aisen & Medina, 1992; Aisen & Venturino, 2004).

3.3.1.3. Sistema automatizado de evaluación espermática

Las evaluaciones anteriormente mencionadas tienen un alto grado de subjetividad, y sus resultados están unidos a la habilidad o experiencia del técnico que las realice. En los últimos años la forma de evaluar la calidad seminal ha cambiado hacia pruebas que intentan determinar objetivamente los valores de los parámetros que determinan la calidad de un eyaculado. El sistema CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) se ha posicionado como la principal herramienta para el análisis seminal, por su velocidad de análisis (sobre todo, en la valoración de la concentración y la movilidad), su reducido coeficiente de variación de tipo técnico, la capacidad de cuantificar parámetros relativos a clases como por ejemplo: rápido, rápido progresivo, normal, estático (Mortimer, 2000) y la fácil capacidad de almacenamiento de la información (Martínez-Pastor *et al.*, 2011).

Un sistema CASA consta de varias unidades independientes entre las que destaca, un microscopio de contraste de fases conectado a una cámara de vídeo, que envía la imagen desde el microscopio a un monitor de TV. La imagen se envía al ordenador, donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías seriadas de cada campo. El software discrimina a los espermatozoides de otras partículas que puedan aparecer en la imagen por su tamaño, y analiza la trayectoria recorrida por cada espermatozoide individual, la velocidad de las células, el movimiento rectilíneo, circular o lateral.

Los parámetros CASA que caracterizan la calidad del movimiento espermático son los siguientes (Monserrat, 2016):

- *Velocidad curvilínea* (VCL): distancia recorrida por el espermatozoide en su trayectoria real en función del tiempo de captura considerado, como medida de la vigorosidad del espermatozoide, medida en $\mu\text{m/s}$.

- *Velocidad lineal (VSL)*: distancia recorrida en línea recta por el espermatozoide entre el primer y el último punto de su trayectoria real, indicando el desplazamiento neto de la célula en el tiempo considerado, medida en $\mu\text{m/s}$.

- *Velocidad media (VAP)*: trayectoria media del espermatozoide en el tiempo considerado. Se calcula como una interpolación entre los puntos correspondientes a la trayectoria de VCL, en un intento de mejor aproximación al desplazamiento real de la célula. Se mide en $\mu\text{m/s}$.

- *Frecuencia de batida de la cola (BCF)*: expresada como número de veces que la trayectoria curvilínea cruza la trayectoria media, en función del tiempo de captura considerado, medido en Hz.

- *Desplazamiento lateral de la cabeza (ALH)*: es la altura máxima (o media) de la amplitud del movimiento oscilatorio de la trayectoria curvilínea en μm .

- *Media del desplazamiento angular de la cabeza (MAD)*: media del ángulo (en valor absoluto) de giro de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria curvilínea (VCL). Se mide en grados.

También se determinan una serie de índices, como parámetros derivados de los anteriores:

- *Índice de linealidad (LIN = $VSL/VCL \times 100$)*, como medida de linealidad de la trayectoria curvilínea (VCL).

- *Índice de rectitud (STR = $VSL/VAP \times 100$)*, como medida de linealidad de la trayectoria media (VAP).

- *Índice de oscilación (WOB = $VAP/VCL \times 100$)*, como medida de oscilación de la trayectoria curvilínea (VCL) respecto a la trayectoria media (VAP).

Estos parámetros van a determinar el potencial fecundante de un eyaculado. En espermatozoides humanos se ha comprobado que la penetración en el moco

cervical se ve favorecida por altos valores de VSL o VAP, así como de ALH. Para penetrar el moco cervical las características espermáticas mínimas son: VSL >25 $\mu\text{m/s}$, STR >90%, ALH >2,5 $\mu\text{m/s}$ (kubuscan.com).

Muiño *et al.* (2006) determinan en espermatozoides bovinos que para considerar que un espermatozoide es rápido su VCL debe ser superior a 110 $\mu\text{m/s}$. Tienen velocidad media si su VCL está comprendida entre 60-110 $\mu\text{m/s}$ y son considerados espermatozoides lentos si su VCL oscila entre 20 y 60 $\mu\text{m/s}$. Por debajo de 20 $\mu\text{m/s}$ de VCL, ese espermatozoide es considerado inmóvil.

Bravo *et al.* (2011), en espermatozoides de morueco, tomaron como valores de referencia los siguientes: espermatozoides rápidos aquellos con una VCL >75 $\mu\text{m/s}$, medios VCL= 45-75 $\mu\text{m/s}$ y lentos aquellos con una VCL <45 $\mu\text{m/s}$. También consideraron un espermatozoide móvil a aquel con al menos una VCL >20 $\mu\text{m/s}$ (Tuli *et al.*, 1992; Farrell *et al.*, 1998; Marco-Jiménez *et al.*, 2005).

Hay que tener en cuenta que VCL y ALH elevadas nos muestran espermatozoides muy activos, pero que no tienen por qué ser progresivos, ya que para determinar la progresividad hay que considerar los valores de LIN y STR. Para LIN consideramos un buen valor si es superior al 50% (Cox *et al.*, 2006) y para STR si es mayor al 80% (Tomás, 2007; Bravo *et al.*, 2011).

3.3.1.4. Congelación de semen en caprino

Como ya hemos mencionado, la congelación de semen de caprino para su uso posterior en IA tiene numerosas ventajas, pero en la actualidad no es la tecnología de uso mayoritario. La congelación de semen causa daños ultraestructurales, bioquímicos y funcionales en los espermatozoides, provocando una disminución de la viabilidad, motilidad (Leboeuf *et al.*, 2000; Watson, 2000) y capacidad fecundante de los mismos, que conlleva una tasa de fertilidad inferior (31,2%, Ferrari *et al.*, 1998; 40-45%, Gibbons, 2002; 18%, Vera *et al.*, 2004) si la comparamos con los resultados que proporciona el uso de

semén fresco (60-80%, Lorenzo *et al.*, 1997; 65-75%, Greyling & Van der Nest, 2000).

Estos daños se ocasionan en las células espermáticas a nivel de la membrana plasmática, acrosoma, núcleo, pieza intermedia, *anulus* y axonema (Aisen, 2004). La membrana plasmática y el acrosoma son los más sensibles al daño por congelación-descongelación. Los estudios de la membrana citoplasmática determinan que los daños son selectivos y destacan la magnitud de los que ocurren a nivel de la pieza intermedia y del segmento apical del acrosoma. Estos daños ocurren principalmente durante el proceso de congelación-descongelación (entre 15 y 60°C) y no durante el almacenamiento en N₂L (Aisen, 2004). El proceso de congelación-descongelación del semen es complejo y tiene una serie de puntos críticos que destruyen los espermatozoides, por lo que la cantidad y calidad de los espermatozoides que sobreviven a él es sensiblemente inferior a la del semen fresco, con una reducción de entre un 30-40% en la motilidad espermática en comparación con el porcentaje de espermatozoides móviles en fresco (Niño, 2005).

El uso de un diluyente seminal es un factor determinante para la calidad del semen después del proceso de congelación-descongelación y puede marcar la diferencia entre el éxito o el fracaso de la técnica. Un buen diluyente debe contener:

- Azúcares, que sirvan como fuente de energía, como fructosa, glucosa, ribosa, sacarosa o galactosa (Barbas & Mascarenhas, 2009). Estos azúcares, además, también pueden actuar mejorando la crioprotección al mantener o aumentar la presión osmótica extracelular en los espermatozoides, lo que ayuda a mantener la integridad de la membrana cuando se almacenan durante largos períodos de tiempo.

- Sales, que permitan el mantenimiento de una adecuada presión osmótica (Barbas & Mascarenhas, 2009). El diluyente debe ser isotónico con el semen para no dañar la membrana plasmática.

- Un tampón, que amortigüe los cambios de pH del medio, neutralizando los ácidos producidos por el metabolismo de los espermatozoides (Salamon & Maxwell, 2000).

- Agentes crioprotectores, que bajan el punto eutéctico (temperatura mínima a la que el estado de una solución es líquido) para evitar daños en la membrana plasmática espermática, así como la formación de hielo intracelular ya que inducen la deshidratación de la célula (Ávila-Portillo *et al.*, 2006; Rojas, 2014).

- Antibióticos, para prevenir la proliferación de microorganismos (Purdy, 2006).

Generalmente, los medios de refrigeración y congelación del semen de muchas especies incluyen yema de huevo en una proporción de 15-20%. La composición de la yema de huevo es una mezcla compleja de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (68%), lipoproteínas de alta densidad (HDL) (16%) y 4% de fosvitinas (Dauphas *et al.*, 2006). Su mecanismo de conservación de los espermatozoides no se conoce con exactitud, pero se cree que los fosfolípidos, el colesterol y las LDL son los responsables de proteger a los espermatozoides contra el choque por frío al actuar sobre la membrana celular, manteniendo la motilidad de los espermatozoides, reduciendo la producción de la enzima acrosómica hialuronidasa y manteniendo la integridad de la membrana mitocondrial (Thérien *et al.*, 1999; Bergeron *et al.*, 2004).

También se han utilizado ampliamente los diluyentes a base de leche desnatada. Los componentes de la leche como la caseína proporcionan un efecto protector (O'shea & Wales, 1966), mientras que otros autores mencionan que la lactoalbúmina puede actuar como amortiguador frente a los cambios de pH y como agente quelante de metales pesados (Jones & Footer, 1972).

Ambos tipos de diluyentes presentan el inconveniente de la interacción entre secreciones de las glándulas bulbouretrales de los machos con algunos componentes del huevo (lecitinas) (Nunes *et al.*, 1982; Sawyer & Brown, 1995) o de la leche (triglicéridos) (Pellicer-Rubio *et al.*, 1997; Pellicer-Rubio & Combarrous, 1998) dando como resultado productos tóxicos para los espermatozoides. Para la utilización de ambos medios se hace necesario el lavado seminal mediante centrifugación (Cabrera *et al.*, 2005).

Los detergentes son capaces de solubilizar y alterar las membranas celulares y sus componentes. El dodecil sulfato sódico (SDS) es un detergente del grupo alquil-iónico capaz de desnaturalizar la estructura nativa de proteínas. Agregado al diluyente de congelación en pequeñas cantidades, posee un efecto beneficioso sobre la motilidad espermática e integridad acrosómica durante los procesos de congelación-descongelación (Pursel *et al.*, 1978; Arriola & Foote, 1987) e incluso previniendo la capacitación espermática precoz en espermatozoides congelados y descongelados (Peña & Forsberg, 2000). Se ha sugerido que el beneficio que el SDS proporciona en la calidad espermática post-descongelación podría deberse a la modificación que ocasiona en la estructura terciaria de las lipoproteínas de la yema de huevo del diluyente (Arriola & Foote, 1987; Peña & Forsberg, 2000), las cuales ejercen su acción protectora sobre las membranas celulares (Watson, 1976). La adición de SDS solo o conteniendo detergentes comerciales como Equex STM[®] Paste (*Orvus Es Paste*) a un diluyente con base de yema de huevo, mejoró la supervivencia espermática tras la descongelación (Rota *et al.*, 1997; Peña & Forsberg, 2000) y también la capacidad de los espermatozoides de unirse a la zona pelúcida de ovocitos homólogos (Stornelli *et al.*, 2001; 2002). Es por tanto, un componente habitual en los diluyentes para congelación seminal de distintas especies.

Al igual que se debe disponer de un diluyente adecuado, el protocolo de congelación utilizado debe dañar en la menor medida posible las células espermáticas. La adición del crioprotector interno, cuya concentración va a determinar la velocidad de paso del agua a través de las membranas celulares,

la velocidad de bajada de la temperatura, la cual puede causar daños en la estructura celular por formación de cristales de hielo y la forma de descongelación de la pajueta, mediante la cual se va a restaurar el metabolismo celular, son puntos susceptibles de mejora para evitar daño espermático.

En otras especies, como la porcina, el proceso de congelación seminal se lleva a cabo con un protocolo determinado y una bajada de temperaturas controlada mediante un programa informático (Thilmant, 1997) resultando tasas adecuadas de viabilidad y motilidad espermática (Peinado *et al.*, 1998; Poto *et al.*, 2000b; Galián *et al.*, 2019).

3.3.2. Aparato reproductor femenino

El aparato reproductor de las hembras caprinas se compone de: los ovarios, las trompas u oviductos, el útero, el cuello uterino o cérvix, la vagina y los genitales externos o vulva.

Los ovarios son órganos bilaterales pequeños, de 0,5 a 3 g, con forma ovalada, cuya función primaria es la producción de los gametos femeninos, los ovocitos, y secretar hormonas como estrógenos, progesterona, oxitocina o inhibina (Morello & Chemineau, 2004). La corteza ovárica contiene los folículos ováricos en las distintas fases de crecimiento (primarios, secundarios o preovulatorios) y CLs. Cada folículo ovárico presenta una sola célula germinal, que va creciendo y rodeándose progresivamente de más capas de células foliculares, a la vez que el folículo crece llenándose de líquido folicular (Morello & Chemineau, 2004, Rodríguez, 2016).

Los oviductos conectan los ovarios con el útero. Tienen un recorrido tortuoso de unos 15-20 cm de largo. En su extremo cercano al ovario presentan un agrandamiento o infundíbulo, cubierto por amplias vellosidades cuya función es dirigir al ovocito a su interior cuando ha ocurrido la ovulación. En la zona de la ampolla, contigua al infundíbulo, suele ocurrir la fecundación del ovocito por el

espermatozoide. A continuación, el oviducto se estrecha en el istmo, próximo a la unión con los cuernos uterinos (unión útero-tubárica) (Morello & Chemineau, 2004; Rodríguez, 2016).

El útero es bicorne y conecta el oviducto con la vagina. Está formado por dos cuernos (9-16 cm de largo) y un pequeño cuerpo uterino (3-5 cm). Se abre hacia la vagina a través de un canal cervical simple, el cérvix o cuello uterino. En los rumiantes, la superficie del endometrio presenta áreas ausentes de glándulas, pero muy vascularizadas, que dan lugar a la porción materna de la placenta y se denominan carúnculas (Morello & Chemineau, 2004). Tiene actividad endocrina, ya que sintetiza prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) (Bazer *et al.*, 1991; Evans, 2003).

El cuello uterino mide entre 4-7 cm y separa el útero del medio exterior. Está atravesado por un canal central cuya luz aparece ocupada por anillos tapizados de mucosa y submucosa (Morello & Chemineau, 2004). La función principal del cuello uterino es producir mucus, el cual fluye desde el cérvix hacia el exterior, lubricando la vagina y permitiendo el ascenso de los espermatozoides hacia el útero durante el celo (Sequeira, 2013). La porción anterior de la vagina es el lugar donde el macho deposita el semen durante la cópula. En la porción posterior, o vestíbulo, comunica el aparato reproductor femenino con el exterior, a través de la vulva. En los labios vulvares se localizan glándulas secretoras de moco y el clítoris (Morello & Chemineau, 2004).

3.3.2.1. Ciclo estral en la cabra

El ciclo estral en la cabra está regido por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, y la liberación hormonal en cada una de estas estructuras. El hipotálamo segrega hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que actúa a nivel de la hipófisis, haciendo que ésta libere hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), que actuarán sobre los ovarios, provocando el crecimiento folicular y la ovulación, respectivamente (González *et al.*, 2021).

Los ovarios a su vez producirán estradiol (E2) y progesterona (P4). El E2 ejerce una acción local sobre los folículos ováricos favoreciendo el crecimiento de las células de la granulosa (Fortune, 2003). Además, induce los cambios del tracto genital femenino para facilitar el transporte espermático, la fecundación y la implantación del futuro embrión (Fatet *et al.*, 2011). También favorece la expresión de receptores para P4 en la ampolla e istmo uterino (Valle *et al.*, 2007). Su acción ejerce un sistema de retroalimentación positivo sobre el eje hipotálamo-hipofisario, que influye sobre la secreción de gonadotropinas, siendo responsable de la expresión del comportamiento estral, indispensable para la reproducción (Roelofs *et al.*, 2010; Fatet *et al.*, 2011).

La P4 es secretada principalmente por el CL y en menor medida por las células de la granulosa. Es la principal hormona que interviene en el mantenimiento de la gestación (Franco & Uribe-Velásquez, 2012). Entre sus acciones destacan la de preparar al útero para la implantación y mantenimiento de la preñez, mediante la inhibición de la motilidad uterina y el aumento de las glándulas secretoras del endometrio, induce el estro y la receptividad sexual y elevadas concentraciones inhiben un nuevo ciclo y el pico ovulatorio de LH (Evans, 2003; Franco & Uribe-Velásquez, 2012). Actúa también a nivel de la glándula mamaria, ayudando al desarrollo del tejido lóbulo alveolar o secretor de la mama durante la gestación (Buitrón-García *et al.*, 2017).

El crecimiento folicular ocurre en forma de onda a lo largo del ciclo. Una onda folicular se caracteriza por la secuencia de tres eventos dependientes de gonadotropina: reclutamiento, selección y dominancia (Driancourt, 2001). Estudios mediante ultrasonografía muestran que existen entre dos y seis ondas de desarrollo de folículos durante el ciclo estral de las cabras, siendo tres o cuatro de esas ondas las más prevalentes (Evans, 2003; Simões *et al.*, 2006). La última ola proporciona el folículo ovulatorio, y gestaciones dobles generalmente derivan de folículos de la última onda o de ondas consecutivas (Rodríguez-Miranda, 2018).

La duración del ciclo estral en la cabra es de 19 a 22 días, según estudios realizados con ultrasonografía (Menchaca & Rubianes, 2002; Rubianes & Menchaca, 2003). La fase luteal ocupa el 80% del ciclo, de 15 a 17 días, (Menchaca & Rubianes, 2002; Rubianes & Menchaca, 2003) se extiende desde la ovulación hasta la luteolisis. La hormona dominante durante esta fase es la P4, y la estructura que encontramos de forma preponderante en el ovario es el CL. Comprende dos periodos, el metaestro y el diestro. El metaestro se inicia tras la ovulación, cuando el folículo de De Graaf se llena de sangre, transformándose en cuerpo hemorrágico y posteriormente en cuerpo amarillo. Su duración es de 3-4 días. Tras él ocurre el diestro, con una duración de entre 13-15 días, y se caracteriza por la secreción de P4 sintetizada por un CL funcional. La secreción de LH está inhibida en esta fase. Si la hembra no queda preñada, tras 13-14 días el CL se transforma en cuerpo *albicans* (Evans, 2003) El diestro finaliza con el inicio de una nueva luteolisis provocada por PGF₂ α uterina (Bazer *et al.*, 1991; Evans, 2003).

La fase folicular ocupa el 20% del ciclo, de 2 a 4 días. Comienza con la luteolisis y finaliza con la ovulación. Durante esta fase ocurre el crecimiento de los folículos y la hormona dominante es el E2. Comprende dos fases, el proestro y el estro (Morello & Chemineau, 2004). El proestro comienza cuando por acción de las prostaglandinas (uterinas o exógenas), la concentración de P4 plasmática disminuye por debajo de 1 ng/ml (Bazer *et al.*, 1991; Morello & Chemineau, 2004). Esto aumenta la frecuencia de los pulsos de liberación de LH y la secreción de FSH. Así, las gonadotropinas hipofisarias estimulan el crecimiento de los folículos ováricos, los cuales aumentan la cantidad de E2 en el torrente sanguíneo (Franco & Uribe-Velásquez, 2012). Es durante la fase de proestro en la que los folículos son seleccionados y reclutados para ser ovulados (Evans, 2003). Según la raza, van a ovular entre 1 y 4 folículos seleccionados como dominantes (Chemineau *et al.*, 1982; Morello & Chemineau, 2004).

La fase de estro o celo, se caracteriza por el comportamiento de la hembra que permite el apareamiento, como aumento en la locomoción, inquietud,

movimiento de la cola, búsqueda del macho, micciones frecuentes, monta entre hembras y sobre todo, inmovilidad de la hembra cuando es montada por el macho. También puede aparecer moco en la parte exterior de la vulva y edema (Morello & Chemineau, 2004). El inicio del comportamiento estral está asociado al aumento de los niveles plasmáticos de E2, sintetizado por los folículos en crecimiento. Este incremento de E2 plasmático produce finalmente un enorme aumento de secreción de LH, hasta alcanzar un pico de LH que producirá una o varias ovulaciones unas 30 h después de iniciado el estro (Evans, 2003; Morello & Chemineau, 2004). El folículo maduro comienza a elaborar inhibina, que inhibe la liberación de FSH, impidiéndose el crecimiento folicular adicional y limitando por tanto el ritmo de la ovulación (Uribe-Velásquez *et al.*, 2009).

Esta ciclicidad ocurre durante la época reproductiva, y se interrumpe por factores como la raza, la edad, temperatura ambiente, presencia de machos o hembras, estado nutricional y fotoperiodo (Roca *et al.*, 1991; Rivera *et al.*, 2003).

3.3.2.2. Sincronización de estros para IA

Los tratamientos hormonales de inducción y/o sincronización de celos tienen como objetivo inducir una fase folicular provocando la finalización simultánea de una fase lútea, ya sea ésta natural o artificial. En hembras ciclando se puede conseguir mediante el uso de análogos de la $PGF_{2\alpha}$, como son cloprostenol, dinaprost o delprostenate. Esta prostaglandina provocará la regresión del CL, desencadenándose una fase folicular (Freitas & Rubianes, 2004).

Otra hormona utilizada en el control de celo es la P4, o productos similares denominados progestágenos. Los más conocidos son el acetato de fluorogestona (FGA) y el acetato de medroxiprogesterona (MAP). Ambos se utilizan incorporados en esponjas intravaginales. Existen también otros dispositivos intravaginales siliconados que contienen progesterona, como por ejemplo CIDR[®] y PRID[®], entre otros (Freitas & Rubianes, 2004; Córdoba-Izquierdo *et al.*, 2008).

Es frecuente también el uso de una hormona folículo estimulante, principalmente la gonadotropina coriónica equina (eCG o PMSG) (Freitas & Rubianes, 2004; Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008) para estimular el crecimiento folicular, la duración del celo, la tasa ovulatoria y acortar el intervalo de celo.

Con todo lo dicho, el tratamiento más utilizado en la sincronización de celos consiste en una combinación de las hormonas mencionadas. Se realiza introduciendo esponjas impregnadas con el progestágeno (45 mg de FGA) en la vagina de hembras caprinas que queremos sincronizar durante 11 días. Nueve días después de la colocación de la esponja se inyecta cloprostenol y eCG (vía i.m.), tras 48 h la esponja se retira y la IA se realiza 43 h tras su retirada en inseminaciones únicas, o a las 30 y 48 h tras la retirada de la esponja si se realiza una doble inseminación (Freitas & Rubianes, 2004).

Con el fin de reducir los días de puesta de la esponja y los problemas asociados a ella (alteración de la mucosa vaginal con producción de fluido vaginal purulento y sanguinolento y alteración de la microbiota beneficiosa vaginal), existe otro protocolo de sincronización (Menchaca & Rubianes, 2007) que consiste en dejar la esponja impregnada con el progestágeno en el interior de la vagina durante solo 6 días. La $PGF_{2\alpha}$ es inyectada el día de colocación de la esponja, mientras que la eCG se inyecta el día de la retirada. La IA se realiza a las 53 h tras la retirada de la esponja. La ovulación ocurre en aproximadamente 60 h tras la retirada de la misma (Menchaca & Rubianes, 2007).

La fertilidad obtenida es muy variable, y depende de muchos factores, pero puede considerarse un 60% de media, aunque puede caer hasta el 25%. Una de las causas de esta variabilidad es el momento en el que las cabras presentan celo tras la retirada de las esponjas, pues aquellas que lo presentaron entre 49-72 h post retirada mostraron tasas de fertilidad en torno al 25%, mientras que aquellas que mostraron celo 30 h después de la finalización de tratamientos, su tasa de fertilidad se elevó hasta el 65% (Freitas & Rubianes, 2004).

3.3.2.3. Probióticos y fertilidad

Las hembras de diversas especies de mamíferos como la cabra (*Capra hircus*), oveja (*Ovis aries*) y mujer (*Homo sapiens*), presentan en su vagina una microbiota mixta, compuesta por microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y anaerobios estrictos (Otero *et al.*, 2000; Alba & Silveira, 2006). Esta microbiota incluye saprófitos, patógenos potenciales y oportunistas, que en general no son dominantes, determinándose su abundancia por las limitaciones del ambiente, por lo que, bajo cambios en las condiciones ambientales, pueden proliferar y producir enfermedades (Cortés-López *et al.*, 2013).

Debido a que la vagina actúa como canal de paso de espermatozoides, los cambios en sus condiciones ambientales pueden modificar su microbiota y esto a su vez puede determinar el éxito reproductivo de una determinada hembra, ya que alteraciones en este delicado ambiente pueden afectar la viabilidad y motilidad espermática, impidiéndose que llegue un número suficiente de espermatozoides vivos al lugar de fecundación. La sincronización de celos en especies ganaderas requiere de la introducción en la vagina de las hembras de un dispositivo liberador de hormonas durante varios días. La presencia de este dispositivo ocasiona alteraciones del ambiente vaginal, provocando inflamación de la mucosa y aparición de flujo purulento y/o sanguinolento (Cortés-López *et al.*, 2013). También puede generar hiperplasia e hipertrofia del epitelio vaginal, con aumento del número de células epiteliales, neutrófilos, macrófagos y eritrocitos (Suárez *et al.*, 2006; Manes *et al.*, 2015; Rodríguez-Miranda, 2018).

Estos procesos inflamatorios liberan sustancias biológicamente activas como radicales libres, que ejercen un efecto tóxico sobre los espermatozoides (Fraczek & Kurpisz, 2007), ocasionando la peroxidación de los lípidos de la membrana espermática, alterando su integridad morfológica y movilidad (Salomon & Maxwell, 2000). Todo esto reduce la viabilidad y la motilidad espermática en el tracto reproductivo de la hembra (Salomon & Maxwell, 2000; Rodríguez-Miranda, 2018).

A esta sintomatología la acompaña un cambio, tanto en el número de microorganismos que aparecen en la vagina, como en las poblaciones microbianas propias que componen el fluido vaginal tras la retirada de los dispositivos. Tanto la presencia de bacterias oportunistas como el aumento de leucocitos en el flujo vaginal se traducen en menores tasas de fertilidad en estos ciclos sincronizados con respecto a los obtenidos con celo natural (Manes & Ungerfeld, 2015). La utilización de probióticos y las subsecuentes tasas de gestación están siendo estudiadas actualmente en la especie humana, pero no tanto en otras especies.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los probióticos son microorganismos vivos que, si se administran en cantidad suficiente, tienen efectos beneficiosos para la salud (Binns, 2013). Los probióticos incluyen una amplia variedad de géneros y especies microbianas, pero la mayoría de los microorganismos más frecuentemente utilizados como probióticos son bacterias del ácido láctico (BAL) pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Rodríguez, 2009).

Diversos estudios han encontrado que, en la mujer existe una correlación entre las especies bacterianas predominantes en el tracto genital femenino y las tasas de éxito reproductivo. Así, Hyman *et al.* (2005), investigaron el microbioma vaginal de mujeres que se sometían a tratamiento de transferencia embrionaria. Encontraron que todas las pacientes excepto una, que quedaron embarazadas y dieron a luz a un recién nacido vivo tenían en su vagina una población dominante de *Lactobacillus*. Relacionado con esto, otro estudio, Moreno *et al.* (2016) analizaron el fluido endometrial de mujeres sometidas a tratamiento de FIV y las dividieron en dos grupos: con microbiota predominante de *Lactobacillus* (LD) (>90% eran *Lactobacillus spp.*) y con microbiota dominante no *Lactobacillus* (NLD) (<90% *Lactobacillus*, con >10% de otras bacterias). La presencia de un endometrio NLD se asoció con descensos significativos en la tasa de implantación embrionaria, tasa de gestación y tasa de recién nacido vivo. Y es

que el dogma hasta ahora aceptado de que el útero es un ambiente estéril está siendo desmontado.

Otros estudios en vacas lecheras han reportado que el uso de bacterias del ácido láctico confiere un beneficio para la salud del aparato reproductor frente a infecciones bacterianas (Deng *et al.*, 2015; Genís *et al.*, 2017).

La secuenciación masiva de ADNs bacterianos mediante técnicas moleculares está permitiendo la identificación de hasta 278 géneros bacterianos que pueden habitar en el útero de mujeres. Entre estos géneros *Lactobacillus* y *Flavobacterium* han resultado ser los más abundantes en pacientes que quedan gestantes. Mitchell *et al.* (2015) estudiaron la población bacteriana uterina de mujeres no gestantes y la compararon con la de la vagina, encontrando que las especies más comunes fueron *Lactobacillus iners* (45% en útero, 61% en vagina), *Prevotella spp.* (33% en útero, 76% en vagina) y *Lactobacillus crispatus* (33% en útero, 56% en vagina). Así que al menos en la especie humana, la presencia del género *Lactobacillus spp.* en el tracto genital femenino parece tener gran importancia en gestaciones exitosas.

Los lactobacilos son bacilos Gram-positivos no formadores de esporas, aerotolerantes o anaerobios, con metabolismo estrictamente fermentativo, existiendo especies homofermentadoras (el ácido láctico supera el 85% de los productos de fermentación de la glucosa) y heterofermentadoras (producen ácido láctico, CO₂ y/o ácido acético en proporciones equimoleculares). Aplicados por vía oral o de forma localizada (por ejemplo, intravaginalmente) podrían tener un efecto beneficioso tratando las infecciones vaginales, y el efecto beneficioso en una infección vaginal podría traducirse en mejores tasas de concepción. Los lactobacilos producen ácido láctico, lo que reduce el pH vaginal y lo convierte en un hábitat desfavorable para muchos patógenos (Li *et al.*, 2012).

La hipótesis de partida sería que aplicando probióticos del género *Lactobacillus spp.* en la vagina de hembras caprinas sometidas a sincronización

de celos mediante dispositivos intravaginales conseguiría reducir los efectos adversos que la presencia de esa esponja haya ocasionado, evitando un incremento en la población de especies bacterianas patógenas que provoquen alteraciones de pH vaginal, inflamación e hipertrofia, las cuales tienen efectos adversos en el paso de los espermatozoides a nivel vaginal, reduciéndose, por tanto, la tasa de fertilidad. Pero los efectos beneficiosos se continuarían produciendo a lo largo del tracto reproductivo de la hembra, ya que un estudio reciente (Chen *et al.*, 2017) sobre el tracto reproductivo femenino confirmó la existencia de una microbiota continua que comienza en la vagina y progresa hacia los órganos más profundos del tracto genital, cérvix, útero, trompas, ovarios, e incluso coloniza la bolsa de Douglas, en mujeres con condiciones no infecciosas.

Por lo tanto, la microbiota que crezca en la vagina va a continuar progresando por el tracto reproductor, colonizando el resto de órganos. De manera que, los lactobacilos que se colocan en la vagina se espera que colonicen también el endometrio de las hembras y esto sería beneficioso para conseguir la gestación, en cuanto que una población dominante de *Lactobacillus* en el endometrio parece favorecer la implantación embrionaria en pacientes sometidas a transferencia embrionaria en ciclos de FIV.

3.3.3. Diagnóstico de gestación en caprino

La ultrasonografía es de gran ayuda en el diagnóstico de gestación en fases relativamente tempranas. Se trata de una técnica de exploración de los órganos internos del cuerpo mediante la emisión de ondas de sonido de alta frecuencia (ultrasonidos). Son aquellas ondas de sonido cuya frecuencia es superior a la audible por el oído humano, es decir, por encima de los 20.000 Hz (Hertzios). Actualmente, en medicina veterinaria, los ecógrafos más utilizados son los llamados de modo B y tiempo completo (o real). Se refieren a que la imagen obtenida es un corte bidimensional del órgano en estudio formada por pequeños puntos de diferente densidad y que los impulsos se van transmitiendo

constantemente, obteniéndose así, una visión instantánea de los tejidos examinados (Groenenberg *et al.*, 2016).

En la bibliografía, algunos autores reportan que incluso en día 16-18 de la gestación ya es posible visualizar una estructura anecogénica en el tejido uterino que correspondería con la vesícula embrionaria, primer signo ecográfico de gestación, aunque con estos días no es posible visualizarla en el 100% de los casos (Santiago-Moreno *et al.*, 1995a,b; Martínez *et al.*, 1998). La mayoría de autores detectan en la especie caprina vesícula embrionaria aproximadamente en el día 25-26 de la gestación, prácticamente en el 100% de los casos, realizando ecografía transrectal o transvaginal (Basaran, 1999; Gonzales *et al.*, 2004; Galián *et al.*, 2021).

Junto con la ecografía, otro método frecuentemente utilizado es la cuantificación de P4 sérica por análisis inmunoenzimático (ELISA) en determinados días del ciclo.

La concentración de P4 en sangre para el diagnóstico temprano de gestación es una técnica empleada entre los 19-23 días post-servicio o post-IA en rumiantes (Ortega-Pacheco *et al.*, 1999). Niveles altos de P4 en este momento sugieren la presencia de tejido lúteo activo, lo que puede ser compatible con una gestación (Matsas, 1993). La eficiencia para diagnosticar gestaciones en este momento puede presentar una precisión de 90-100% (Restall *et al.*, 1990; Goel & Agrawal, 1992).

Los valores de P4 van oscilando según el momento del ciclo en el que la hembra se encuentre. En día 0 del ciclo estral se encuentra en su valor basal, 0,1 ng/ml; en día 6 se ha elevado hasta los 3 ng/ml para alcanzar el pico en día 12 con 7,7 ng/ml (Khanum *et al.*, 2008). Este nivel elevado de P4 sérica se mantiene hasta el día 15, a partir del cual empieza a disminuir (Khanum *et al.*, 2008). Con la concepción, aumentan los niveles de P4 alcanzando entre 4,3-11 ng/ml que se mantienen durante toda la gestación. Chemineau *et al.* (1982)

publicaron que a partir del día 17 del ciclo, por efecto de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ que provoca luteolisis, la concentración de P4 desciende de nuevo hasta volver a niveles basales en día 21 del ciclo si la hembra no ha quedado gestante.

La concentración de P4 en plasma o suero sanguíneo usada para discriminar preñez de no preñez varía según distintos estudios, Corteel *et al.* (1987) determinaron que debía ser inferior a 1 ng/ml. De Montigny *et al.* (1982) y Humblot *et al.* (1990) la determinaron en 1,5 ng/ml y Engeland *et al.* (1997) en 2 ng/ml. Valores entre 1 y 2 ng/ml proporcionan resultados dudosos. Se acepta preñez con seguridad a partir de 2 ng/ml.

Una de las limitaciones del diagnóstico de preñez mediante concentración de P4 sérica es que existen estados en los que la concentración de la hormona puede permanecer elevada sin existir una gestación, como en CLs persistentes, lo que puede inducir a falsos positivos. El coste de cada analítica y el tiempo de entrega de los resultados son también factores a tener en cuenta si se elige esta forma de diagnóstico.

4. MATERIAL y MÉTODOS

4. MATERIAL y MÉTODOS

4.1. Material

Los instrumentos, aparatos y materiales utilizados en la realización de los diferentes experimentos fueron los siguientes:

- Agitador magnético Agimatic-N (*J.P. Selecta, España*).
- Analizador Laser Cell (*CVM, Navarra, España*).
- Balanza de precisión CP324S (*Sartorius A.G. Gottingen, Alemania*).
- Baño termostático Microtem (*J.P. Selecta, Barcelona, España*).
- Biocongelador 14S, Sy-Lab Cube (*Minitub, Tiefenbach, Alemania*).
- Cámara de enfriamiento 5°C (*Universidad de Murcia, Murcia, España*).
- Camilla sujeción.
- Cápsulas probióticas con 50×10^6 de UFC de *Lactobacillus plantarum* (Lp) Melagyn® probiótico (*Gynea, Barcelona, España*).
- Catéter de Cassou para IA (*Minitüb, Tiefenbach, Alemania*).
- Centrífuga Meditronic (*J.P. Selecta, Barcelona, España*).
- CIDR Progesterona (*Zoetis, Madrid, España*).
- Cronómetro (*Labbox, Barcelona, España*).
- eCG (*Foligon® 6000 U.I. MSD Animal Health, Salamanca, España*).
- Ecógrafo General Electric Voluson® 730PRO (*GE Healthcare, Milwaukee, EEUU*), equipado con sonda sectorial 2-7 MHz (AB2-7) y sonda endovaginal 5-9 MHz (IC5-9).
- Espectrofotómetro Spermacue® (*Minitüb, Tiefenbach, Alemania*).
- Esponjas de poliuretano impregnadas en acetato de Fluorogestona (FGA) (Sincropart®, *Ceva Salud Animal S.A, Barcelona, España*).
- Estufa 7200 B53 (*W.T. Binder Tuttingen, Alemania*).
- Gelatina.
- Inmunoanalizador fluorescencia Finecare-Vet (*CVM, Navarra, España*).
- Jeringas varios volúmenes.
- Kit cuantificación progesterona (*Wondfo Biotech, Guangzhou, China*).

- Maniquí con forma de hembra caprina.
- Microscopio contraste fases DM-25 B-350 (*Optika Microscopy, Ponteranica, Italia*).
- Microscopio óptico DM 2000 (*Leica Mycrosystems®*, Barcelona, España).
- Microscopio óptico Olympus Cx31 RBSF (*Olympus, Tokyo, Japón*).
- Nitrógeno líquido (N₂L).
- Pajuelas 0,5 ml.
- PGF₂α (*Dalmazin, Fatro S.p.A. Bolonia, Italia*).
- Placa calefactora H.T. 2000 (*Minitüb, Tiefenbach, Alemania*).
- Placa calefactora Plactronic (*J.P. Selecta, Barcelona, España*).
- Potro de sujeción.
- Sistema Casa ISAS®v1 (*PROISER, Valencia, España*).
- Termómetro alcohol -20°C a + 110°C.
- Tiras de medición pH 6,0-8,0 Dosatest® (*VWR, Leuven, Alemania*).
- Tubos de vidrio graduados.
- Vagina artificial y camisas.
- Vaina de Cassou para IA (*Minitüb, Tiefenbach, Alemania*).

La composición de los diluyentes y soluciones se muestra en las **tablas 4.1 a 4.5**.

Tabla 4.1. Composición del medio Krebs-Ringer-Fosfato.

| | |
|---|---------|
| NaCl (0,9%) (<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania</i>) | 500 ml |
| KCl (1,15%) (<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania</i>) | 20 ml |
| CaCl ₂ (1,22%) (<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania</i>) | 15 ml |
| KH ₂ PO ₄ (2,11%) (<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania</i>) | 2 ml |
| MgSO ₄ .7H ₂ O (3,82%) (<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania</i>) | 5 ml |
| Tampón fosfato (compuesto de): | 60 ml: |
| <ul style="list-style-type: none"> ● NaH₂PO₄ .12H₂O (<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania</i>) | 3,581 g |

| | |
|---|---------|
| • HCl 1 N (<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania</i>) | 2 ml |
| • H ₂ O (Milli-Q® Direct) | 100 ml |
| Glucosa (5,34%) (<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania</i>) | 22,5 ml |

Nota: Las distintas soluciones se preparan por separado y se añaden en este orden.

Tabla 4.2. Composición de la tinción eosina-nigrosina.

| | |
|---|-----|
| Eosina (<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania</i>) | 1% |
| Nigrosina (<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania</i>) | 3% |
| Citrato trisódico (<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania</i>) | 3% |
| H ₂ O (Milli-Q® Direct) | 93% |

Tabla 4.3. Composición del diluyente para congelación espermática IMIDA (fracción A) para un volumen total de 1 l (H₂O destilada + yema de huevo).

| | |
|--|--|
| Fructosa (<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania</i>) | 56,82 g |
| Bicarbonato sódico (Na HCO ₃ -) (<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania</i>) | 1,0 g |
| Cisteína (L-Cysteine C ₃ H ₇ NO ₂ S) (<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania</i>) | 0,099 g |
| Yema de huevo (huevos frescos de granja) | 227,27 ml |
| H ₂ O (Milli-Q® Direct) | 772,7 ml |
| Dodecil sulfato sódico (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S) (<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania</i>) | 6 g diluidos en 10 ml de H ₂ O destilada (*) |

***Nota:** Mezclar hasta formar una pasta homogénea. Pesar 11,29 g de esta pasta y añadirlos al resto de ingredientes.

Tabla 4.4. Composición del diluyente para congelación espermática Thilmant (1997) (fracción A) para un volumen total de 1 l (H₂O destilada + yema de huevo).

| | |
|--|-----------|
| Fructosa (<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania</i>) | 56,82 g |
| Bicarbonato sódico (Na HCO ₃) (<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania</i>) | 1,0 g |
| L-Cisteína (C ₃ H ₇ NO ₂ S) (<i>Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania</i>) | 0,099 g |
| Yema de huevo (huevos frescos de granja) | 227,27 ml |
| H ₂ O (Milli-Q® Direct) | 772,7 ml |
| Equex STM® (<i>Orvus Es Paste</i>) (<i>Minitub Ibérica, Tarragona, España</i>) | 11,29 g |

Tabla 4.5. Composición del diluyente para congelación espermática de leche desnatada (fracción A) para un volumen total de 1 l.

| | |
|---|--------|
| Leche desnatada | 1 l |
| Glucosa anhidra (<i>PRS Panreac, Barcelona, España</i>) | 1,76 g |

Los tres diluyentes contienen para 1 l de dilución la siguiente cantidad de antibióticos: 656,93 mg de estreptomina, 656,93 mg de penicilina, 149,98 mg de lincomicina y 299,97 mg de espectinomicina (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania*). La composición de la fracción B fue la misma que la fracción A + 8% de glicerol (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania*).

4.2. Diseño experimental

Para poder trabajar en todos los apartados que se han pretendido estudiar en esta Tesis Doctoral, la parte experimental se dividió en 6 experimentos. Por un lado, los experimentos 1, 2 y 3 se centraron en el macho cabrío y la obtención

y manejo del gameto masculino. Por otro, los experimentos 4, 5 y 6 consideraron a la hembra caprina, su sistema de sincronización, ambiente vaginal y diagnóstico de gestación.

4.2.1. Experimento 1: Recogida de semen caprino con tres estímulos sexuales diferentes. Libido y calidad seminal del eyaculado

Mediante este experimento se pretendió determinar si la libido de los machos cabríos de raza MG, determinada por el TR y la capacidad de servicio en una mañana, se veían afectados si el estímulo sexual utilizado, en lugar de ser una hembra estrogenizada era sustituida por otro macho cabrío o incluso un maniquí. Mediante este sistema se pretende mejorar el bienestar animal, al no necesitar la repetida estimulación hormonal de la hembra recela, o incluso, no ser necesario otro animal vivo. Asimismo, se analizó la calidad seminal (volumen de eyaculado, concentración espermática, motilidad individual (MI) y porcentaje de espermatozoides móviles (% MOT) de los eyaculados obtenidos con distinto señuelo para comprobar si ésta se veía afectada por el estímulo sexual.

Se emplearon 10 machos cabríos que habían alcanzado la pubertad y eran menores de un año. Todos fueron entrenados previamente para la recolección de semen mediante el salto sobre una hembra caprina sujeta a un potro metálico. El periodo de entrenamiento duró 3 meses con recogidas cada semana. Una vez los machos conocieron el sistema de monta, se estudió su comportamiento sexual y capacidad de servicio en una mañana utilizando una hembra inmovilizada (al igual que se había hecho durante su entrenamiento) y un macho cabrío adulto, sujeto al potro metálico. Esta parte del estudio se realizó durante 6 semanas, con recogidas una vez por semana, alternando semanalmente la utilización de la hembra o el macho como estímulo.

El estudio con el maniquí se realizó aproximadamente 1 año después de los anteriores utilizándose los mismos machos y lugar de extracción. Se realizó

semanalmente durante 13 semanas, durante los meses de septiembre a diciembre de 2021. El maniquí empleado se fabricó en el propio centro de investigación, y consistía en un armazón de hierro recubierto de varias capas de Etileno Vinil Acetato (conocido como *goma EVA*) microporoso, que le proporcionaban una consistencia firme, sin ser dura en exceso. Este maniquí imitaba la forma de una hembra caprina y se fabricó según las medidas reales de hembras de la raza

4.2.2. Experimento 2: Comportamiento sexual y calidad seminal del macho cabrío MG en distintas edades

El objetivo de esta experiencia fue estudiar el comportamiento sexual (TR y capacidad de cubrición) de machos cabríos de raza MG de diferentes edades, la producción y calidad seminal de su eyaculado y la precocidad de la libido. Se pretende averiguar a qué edad un macho de esta raza puede ser incluido en un programa de reproducción, por presentar una capacidad de servicio y una calidad seminal óptimas. Se evaluaron 18 machos cabríos MG con edades comprendidas entre los 3 meses y los 7 años. Diez de estos machos eran menores de 1 año y 8 eran mayores, estos últimos repartidos en cuatro grupos de edad: 1,5 años (2 machos), 4 años (2 machos), 6 años (2 machos) y 7 años (2 machos). Se obtuvieron en total 260 observaciones, de las cuales, 167 fueron eyaculados y 93 fueron intentos en los que los distintos machos no saltaron sobre la hembra. El estudio se realizó una vez por semana durante 14 semanas, entre los meses de julio y octubre de 2019.

4.2.3. Experimento 3: Diseño de un protocolo de congelación seminal caprina, mediante la adaptación de un protocolo utilizado en la especie porcina, y de un diluyente seminal que proporcione elevada calidad seminal post-descongelación

En este experimento se pretende determinar si el protocolo de congelación de semen propuesto por Thilmant en 1997 para la especie porcina, podía ser adaptado a la especie caprina consiguiendo una óptima calidad post-descongelación. Se analizaron 3 tipos de diluyentes, el utilizado en el protocolo de Thilmant (1997), un diluyente con base de leche desnatada, tradicionalmente utilizado en la especie caprina, y un tercer diluyente diseñado por el Equipo de Mejora Genética Animal del IMIDA (diluyente IMIDA), para comprobar cuál era el que proporcionaba los mejores resultados en la calidad seminal de las muestras descongeladas.

Para este estudio se utilizaron eyaculados de 6 machos cabríos de la raza MG de entre 7 y 9 meses de edad. Se obtuvieron con 8 pools de todos los machos (8 pools x 3 diluyentes = 24 muestras) y con muestras individuales de 3 machos obtenidas en 6 semanas (6 semanas de estudio x 3 machos individuales x 3 diluyentes = 54 muestras) para ser evaluados tras su descongelación.

4.2.4. Experimento 4: Diferencias en la salida en celo y en las alteraciones vaginales provocadas por dos métodos de sincronización de estro en caprino y su relación con la fertilidad en los dos ciclos siguientes.

En este experimento se compararon dos métodos de sincronización de celos, utilizando tres grupos de cabras. El primero (n=13) utilizando una esponja de FGA junto con una cápsula que contenía 50×10^6 UFC de *Lactobacillus plantarum* (Lp) cepa I1001. El segundo grupo (n=15) fue sincronizado mediante un sistema CIDR® y también una cápsula de Lp. A un tercer grupo (n=4) se le introdujo una esponja de FGA sin cápsula de Lp.

La duración del tratamiento intravaginal fue de 11 días. Se pretendió estudiar si los distintos tratamientos causaban distinta tasa de salida en celo, diferencias en las alteraciones vaginales (pH, flujo vaginal sanguinolento), aumento de

células del sistema inmune en sangre e incluso si las tasas de gestación eran distintas en los dos ciclos posteriores.

4.2.5. Experimento 5: Utilización del probiótico intravaginal *Lactobacillus plantarum*, cepa I1001 para prevenir las alteraciones vaginales derivadas del uso de esponjas intravaginales en programas de sincronización de estros y elevar la tasa de fertilidad

En este caso se quiso averiguar si existían diferencias en las tasas de gestación de dos grupos de hembras caprinas MG, sincronizadas durante 6 días utilizando una esponja intravaginal de FGA. A un grupo (n=15) se le introdujo una vez a la semana durante 8 semanas vía intravaginal 50×10^6 UFC de Lp, mientras que el grupo control (n=15) no recibió tratamiento con Lp. Se les midió el pH del flujo vaginal cada semana de puesta de bacterias, el día de la puesta y retirada de esponjas y el día de la IA. Fueron inseminadas a las 48 y 53 h de la retirada de esponjas con semen congelado según el protocolo descrito en el experimento 3, utilizándose el diluyente seminal IMIDA y el macho 1. La tasa de gestación se determinó mediante imagen ecográfica positiva.

4.2.6. Experimento 6: Comparación de 2 métodos de diagnóstico de gestación: evaluación ecográfica endovaginal y cuantificación de progesterona sérica

Se compararon dos métodos de diagnóstico temprano de gestación, la ecografía endovaginal frente a la determinación de P4 21 días post-IA. Para determinar la precocidad en la determinación de un diagnóstico positivo de gestación, se realizaron ecografías vaginales con sonda de 5-9 MHz cada dos días desde el día 14 al día 30 post-IA a 30 cabras. Por otro lado, se extrajo sangre a 18 hembras caprinas elegidas al azar de entre todas las sometidas a IA, el mismo día de la IA y 21 días después, y se determinó la concentración en P4 sérica mediante inmunofluoroensayo. Aquellas hembras que mostraron

concentraciones de P4 >7,86 ng/ml 21 días post-IA (Léga *et al.*, 2006) se las consideró gestantes. Se analizaron las tasas de acierto de ambos métodos.

4.3. Métodos

Todos los experimentos se realizaron en la nave de ganado caprino de la Granja Docente Veterinaria de la Universidad de Murcia, ubicada en Guadalupe (Murcia), con machos y hembras caprinas de raza MG, pertenecientes al Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA).

4.3.1. Alojamiento y alimentación de los animales

Los **machos** se alojaron en corrales individuales de 10 m², con un área cubierta y un patio de ejercicios al aire libre. Los machos fueron alimentados teniendo en cuenta sus necesidades nutricionales. El programa de alimentación se ajustó al peso corporal: se inició con 50 g de concentrado comercial y finalizó con 850 g. El concentrado comercial contenía 15,2% de proteína cruda, 3,7% de grasa cruda, 16,5% de fibra cruda y elementos minerales Ca, P, Na y Mg. Se les administró piedras minerales *ad libitum* con Zn (2850 mg/piedra), Mn (1800 mg/piedra), I (400 mg/ piedra), Fe (200 mg/piedra), Co (50 mg/piedra) y Se (55 mg/piedra) como oligoelementos y Na (36%), Ca (2,5%) y Mg (0,50%) como macroelementos. Cada macho siempre tuvo agua *ad libitum*.

Las **hembras** se alojaron en corrales con una zona cubierta destinada a alimentación y descanso, y otra zona descubierta con toda la influencia del medio ambiente de Murcia.

Dadas las características productivas del rebaño caprino donde se han realizado estos ensayos, se ha dispuesto de una superficie total de 408 m² para las cabras en lactación, dividido en dos zonas, una de 208 m² destinada a alimentación y descanso, la cual está cubierta para evitar las inclemencias del tiempo, correspondiendo a cada cabra en lactación 2,5 m², y otra zona destinada

a patio de ejercicios de 200 m², descubierta, para que los animales puedan disfrutar de las condiciones medioambientales de la zona. En esta zona descubierta cada cabra dispuso también de 2,5 m².

Las cabras destinadas a la gestación sin ordeño fueron aproximadamente 40 ejemplares, alternándose la situación productiva a lo largo de los estudios, disponiendo, igualmente, de zonas de ejercicio, de alimentación y descanso. Cada cabra en gestación disponía de 2,6 m² en cada uno de los espacios de alimentación y ejercicio, respectivamente.

En cuanto a la alimentación de las hembras, ésta se diferencia por grupos productivos:

1. Cabras en lactación: la composición del alimento concentrado, comercial para la fase de lactación y ordeño se compuso de proteína bruta (16%), grasa bruta (4%), fibra bruta (10%) y ceniza bruta (7,6%). En cuanto a los minerales, contenía principalmente Ca, (4%) y P (0,44%). Además, contiene una serie de aditivos con todo el complejo vitamínico liposoluble y oligoelementos a base de Fe, Co, Mn, Zn, Se y I.

Con este concentrado comercial se alimentaron los animales según su capacidad productiva racionando los alimentos a razón de 0,65 unidades forrajeras leche (UFL) para cubrir necesidades de mantenimiento y 0,4 UFL por cada litro de leche producido. Además, a partir del segundo y tercer mes de gestación se tuvo en cuenta los requerimientos proteicos y minerales necesarios para el mantenimiento de los fetos, con especial atención al calcio y al fósforo.

Se administró *ad libitum* NaCl en forma de piedras minerales junto con otros bloques de sales de lamer para que el animal se autorregule en sus necesidades.

2. Cabras secas: las cabras destinadas al parto y que habían finalizado la lactación fueron alimentadas con un pienso comercial complementario cuya

composición era la siguiente: proteína bruta (14,5%), grasa bruta (3,0%), fibra bruta (17,3%), ceniza bruta (11,2%), Ca (2,15%) y P (0,46%).

También fueron añadidas todo el grupo de vitaminas liposolubles (A, D3, E) junto con una serie de oligoelementos ajustados a las necesidades del caprino menos productivo, pero con especial atención en el racionamiento del Ca y P junto con Fe para los animales gestantes. La cantidad de pienso ofrecido a diario a cada una de estas cabras fue de 0,65 UFL. Cada hembra dispuso en todo momento de agua *ad libitum*.

4.3.2. Extracción de semen

En todos los experimentos que requirieron de muestras seminales, éstas se obtuvieron mediante VA conteniendo H₂O a 45°C. La VA se acopló a un cono de caucho unido a un tubo de vidrio graduado que permite conocer el volumen de semen eyaculado.

En el experimento 1 participaron 10 machos cabríos que habían superado la pubertad y eran menores de 1 año. Todos fueron entrenados para la recolección de semen mediante salto sobre una hembra caprina sujeta a un potro metálico. El periodo de entrenamiento se inició cuando los machos contaban con 6 meses de edad y duró 3 meses, con recogidas una vez por semana. Una vez los machos conocieron el sistema de monta, se estudió su comportamiento sexual y capacidad de servicio en una mañana utilizando una hembra inmovilizada (al igual que se había hecho durante su entrenamiento) (**Figura 4.1**), un macho cabrío adulto, sujeto al potro metálico (**Figura 4.2**) y un maniquí que simula la forma de una hembra caprina (**Figuras 4.3 y 4.4**).

En el experimento 2, la edad de los machos más jóvenes fue de tan solo 3 meses, y la del macho cabrío mayor, de 7 años. Se obtuvieron un total de 260 observaciones, de las cuales, 167 fueron eyaculados y 93 fueron intentos en los que los distintos machos no saltaron sobre la hembra. De los 18 machos

empleados en el estudio, 10 tenían menos de 1 año y 8 machos eran mayores de 1 año.



Figura 4.1. Recogida de semen mediante VA.



Figura 4.2. Macho cabrío MG saltando sobre otro macho.



Figura 4.3. Maniquí con forma de hembra caprina.



Figura 4.4. Macho cabrío MG saltando sobre el maniquí.

Para el experimento 3 se utilizaron eyaculados de 6 machos cabríos de la raza MG de entre 7 y 9 meses de edad. Semanalmente se extrajo semen de cada macho utilizando una VA, con una hembra inmovilizada como estímulo sexual. Durante 8 semanas, el semen de los 6 machos se mezcló en un pool y

durante 6 semanas más se congeló semen de tres machos de forma individual con cada uno de los tres diluyentes analizados en el experimento 3.

4.3.3. Medida del tiempo de reacción (TR)

En los experimentos 1 y 2 se estudió el comportamiento sexual midiendo el TR de cada macho (tiempo que empleaba en saltar sobre la hembra tras entrar en contacto con ella) y la capacidad de cubrición (nº de montas que realizaba en una misma mañana), observando si realizaba los pasos previos de cortejo a la hembra (**Figura 4.5**).



Figura 4.5. Reflejo de Flehmen de un macho cabrío como parte del cortejo previo a la cópula.

El TR fue medido con un cronómetro de precisión desde la entrada del macho en el recinto donde se encontraba el estímulo sexual hasta el depósito del semen en un tubo de ensayo de volumen graduado y atemperado a 37°C. Si tras 5 min en contacto con el señuelo no se había producido la monta, se sacaba al macho en estudio y se anotaba el fallo. Para conocer la capacidad de servicio que presentaba un macho en una mañana, este proceso se repetía cada 20 min con cada macho en estudio, tantas veces como saltos diera el animal. Tras 2 intentos sin salto, no se volvía a probar con ese macho.

4.3.4. Procesado del eyaculado

Una vez obtenido el eyaculado, se midió el volumen de semen por observación directa en un tubo de vidrio graduado. Se diluyó 1:10 en medio Krebs-Ringer-Fosfato (KRP) (Corteel, 1974) atemperado a 37°C y se midió la concentración espermática mediante espectrofotómetro (SpermaCue®). Las diluciones seminales permanecieron en baño termostático a 37°C mientras duró su análisis. Al primer eyaculado de la mañana se le evaluó su calidad por observación con microscopio óptico (100X), estudiándose la motilidad individual (MI), en la cual se valora subjetivamente el movimiento espermático en una escala de 0 a 5, donde 0 indica no movimiento y 5 movimiento progresivo muy rápido (Cabodevila & Catena, 2012), y el porcentaje de espermatozoides móviles (% MOT), determinado como el porcentaje subjetivo de espermatozoides con movimiento, visualizados en un campo al microscopio óptico (100X), considerándose el total del campo como el 100%.

4.3.5. Protocolo de congelación seminal

Los eyaculados del experimento 3 fueron congelados para probar los distintos tipos de diluyentes. Se obtuvieron eyaculados de los 6 machos del estudio. Se aceptaron para congelación los eyaculados con un volumen $\geq 0,5$ ml, una MI de 3,5 ó más y un porcentaje de espermatozoides móviles de al menos el 60%. Se mezclaron las diluciones de los eyaculados de cada macho, para evitar que las diferencias en las calidades individuales distorsionaran los resultados finales. La mezcla se dividió en tres partes y cada parte se congeló usando uno de los tres diluyentes (Thilmant, leche desnatada e IMIDA). Este proceso se repitió durante 8 semanas, por lo que se obtuvieron 8 pools de semen para cada diluyente de los 6 machos que participaron en el estudio.

Además, se determinó la diferencia en la calidad seminal individual para cada macho con cada diluyente, por lo que muestras individuales de los machos 1, 2 y 3 fueron también congeladas durante 6 semanas más con los tres

diluyentes. Se obtuvieron 3 eyaculados de cada macho en la misma mañana, y se mezclaron para evitar diferencias en las calidades de partida. La mezcla de los 3 eyaculados del mismo macho se dividió en 3 partes y cada una se congeló con un diluyente distinto. El semen con KRP se dejó enfriar a temperatura ambiente (23°C) y una vez atemperado se centrifugó a 800 x g, 20 min. Se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendió cada sedimento con la cantidad calculada de diluyente A (fracción del diluyente sin glicerol) para obtener una concentración final en la pajuela de 200×10^6 de espermatozoides. Cada muestra fue refrigerada para que la temperatura descendiera a 5°C en 2 h. Una vez alcanzada esta temperatura, se añadió la segunda parte del diluyente correspondiente, el diluyente B, esta vez conteniendo glicerol al 8% (su concentración final será del 4%). Esta adición del diluyente más el glicerol se realizó en 5 pasos, a intervalos de 5 min. Se dejó equilibrar durante 90 min, tiempo durante el cual las muestras se envasaron en pajuelas de 0,5 ml. Después de 90 min de equilibrado, las pajuelas se colocaron en el biocongelador automatizado, asociado a un programa informático para asegurar que la temperatura se redujera gradualmente. La rampa de congelación fue la siguiente: T^a inicio: 5°C. Velocidad de enfriamiento: -1°C/min hasta -4,5°C (T^a de fusión y *seeding*). Mantenimiento: 1 min a -4,5°C. Congelación: -30°C/min hasta -180°C (Thilmant, 1997). Tras este procesado, las pajuelas se sumergieron en N₂L y se almacenaron en tanques hasta su descongelación.

La descongelación se realizó sumergiendo la pajuela en un baño con agua a 56°C durante 12 s (Thilmant, 1997). Se secó con papel, se cortó un extremo y se depositó el contenido en un tubo con 1 ml de medio KRP a 37°C.

4.3.6. Evaluación de la calidad seminal de muestras descongeladas

Para la evaluación microscópica subjetiva, se tomó una gota de 30 µl de la dilución seminal y se observó a 100X bajo microscopio óptico. A cada muestra se le asignó un valor de MI entre 0 y 5, y un porcentaje aproximado de

espermatozoides móviles en relación al total observado (% MOT). Se mezcló otra gota de 30 μl con la misma cantidad de eosina-nigrosina y se preparó un frotis en un portaobjetos. Se dejó secar y esta extensión se evaluó a 400X bajo microscopio óptico para determinar el porcentaje de espermatozoides que se consideraron vivos o muertos. Los observados en el preparado sin teñir, presentaban integridad de membrana y se clasificaron como vivos, mientras que los espermatozoides teñidos con tonalidad rosada, cuya membrana no estaba estructurada, se clasificaron como muertos. Se contaron 200 espermatozoides de cada muestra evaluada para tinción vital (TV).

Para determinar el porcentaje de acrosomas intactos (% NAR), se mezclaron 100 μl de la dilución de semen-KRP con 400 μl de solución de acrosomas (Pursel & Johnson, 1974). Se observó una gota de 30 μl de esta solución en un microscopio de contraste de fases a 1000X para determinar por observación directa la integridad del acrosoma. Se contaron 100 espermatozoides por muestra evaluada.

Estas evaluaciones se realizaron en las muestras recién descongeladas (H0) y cada hora hasta 5 h después de la descongelación (H5) para determinar la resistencia de la muestra a lo largo del tiempo. Las muestras se mantuvieron a 37°C durante cada hora de análisis.

Se descongeló de la misma forma una pajuela diferente de cada muestra de la misma fecha de congelación para su análisis mediante el sistema automático CASA (nº imágenes: 50. Imágenes/s: 50. Óptica Ph-, cámara ISAS-D4C20, escala 10X Nikon. Área de partículas: 3-70 μm^2). Con este sistema se analizaron los eyaculados de los machos 1, 2 y 3 y una mezcla de eyaculados de los seis machos (pool). La muestra se diluyó 1:3 en tampón KRP (concentración de espermatozoides 50×10^6), y se colocó una gota de esta dilución en un portaobjetos precalentado a 37°C y se analizó en microscopio de contraste de fases a 100X.

Los parámetros evaluados fueron: número de espermatozoides móviles totales (MT), número de espermatozoides móviles progresivos (MP), expresado como porcentaje de espermatozoides móviles totales y porcentaje de espermatozoides móviles progresivos, velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidad en línea recta (VSL, $\mu\text{m/s}$), índice de linealidad (LIN), el índice de rectitud (STR) y el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) expresado en μm . Se consideró a los espermatozoides como inmóviles si su VCL era inferior a 10 $\mu\text{m/s}$, como lentos si se encontraba entre 10-45 $\mu\text{m/s}$, con velocidad media si estaba dentro del rango 45-75 $\mu\text{m/s}$ y como espermatozoides rápidos si su VCL superaba los 75 $\mu\text{m/s}$ (Tomás, 2007). Se evaluó una media de 6 campos por muestra (Salmani *et al.*, 2014). Al igual que con el análisis subjetivo, cada muestra se evaluó recién descongelada y cada hora después de descongelar hasta 5 h más tarde.

4.3.7. Sincronización de estros en hembras caprinas y utilización de bacterias del ácido láctico (BAL)

En los experimentos 4 y 5 se realizaron sincronizaciones de celos en sendos conjuntos de hembras caprinas. En el grupo tratamiento de cada experimento (grupo Lp) se introdujo en el interior vaginal una pastilla conteniendo 50×10^6 UFC del probiótico Lp. En el experimento 4, se utilizaron 32 hembras caprinas MG que habían parido al menos una vez, divididas en tres grupos:

- Grupo 1 (N=13), se les introdujo una esponja intravaginal impregnada en 30 mg de FGA (**Figura 4.6**) junto con una píldora con 50×10^6 UFC de Lp.
- Grupo 2 (N=15), se les introdujo un dispositivo intravaginal CIDR[®] impregnado en P4 (**Figura 4.6**) y una píldora con 50×10^6 de UFC de Lp.
- Grupo 3 (N=4), se les introdujo una esponja intravaginal con FGA.



Figura 4.6. Esponja con FGA (arriba) y CIDR® (abajo) con sus aplicadores.

En los tres grupos, las esponjas y los CIDR® permanecieron en el interior de la vagina durante 11 días. Dos días antes de retirada la esponja o del CIDR®, los animales fueron inyectados con 1 ml de cloprostenol (PGF₂α) y 300 U.I. de eCG.

En el experimento 5 participaron 30 hembras de raza MG que habían parido previamente. Fueron divididas al azar en dos grupos:

- Grupo control: se introdujo a las 15 cabras de este grupo una esponja impregnada en 30 mg de FGA.

- Grupo Lp: Durante 8 semanas se introdujo semanalmente en la vagina de cada hembra del grupo Lp 1 pastilla conteniendo 50×10^6 UFC de Lp. Durante las primeras 5 semanas estas pastillas fueron disueltas en una solución de gelatina en suero salino fisiológico, NaCl al 0,9% (0,88 g de gelatina en 50 ml de solución NaCl). Cada pastilla se disolvió en 10 ml de esta disolución. Las últimas 3 semanas se introdujo la pastilla sin diluir directamente en la vagina.

Se midió el pH del flujo vaginal de cada cabra antes de la colocación de las bacterias, introduciendo un papel medidor de pH Dosatest® sujeto por una pinza en la vagina e impregnándolo de flujo vaginal. Tras la medida del pH se introdujeron las bacterias. En el caso de la disolución, ésta se introdujo cargando 10 ml de la misma en una jeringa acoplada a un tubo de plástico flexible. Este tubo se introdujo en la vagina y tras empujar el émbolo de la jeringa, entró el

preparado de gelatina y Lp. Cuando se trataba de la pastilla sin disolver, ésta se introducía con la ayuda del aplicador que traía el preparado comercial. Se comprobó que tanto la disolución como la pastilla quedaban en el interior de la vagina.

La última de las 8 semanas del uso de probióticos coincidió con la sincronización de celos. Tras medición del pH e introducción de la pastilla de bacterias, se introdujo también una esponja impregnada en 30 mg del progestágeno FGA. Ese mismo día se inyectó a cada cabra del estudio 0,5 ml de cloprostenol (PGF_{2α}).

En este experimento se siguió un protocolo más corto de sincronización propuesto por Menchaca & Rubianes (2007), en el cual las esponjas permanecen en el interior de la vagina durante 6 días. El día de retirada de las mismas se inyectó a cada hembra 300 U.I. de eCG.

4.3.8. Medición del pH del flujo vaginal

Con ayuda de un espéculo se observó el estado de la mucosa vaginal y se midió el pH del flujo vaginal introduciendo con suavidad una tira medidora de pH (Dosatest®) en el interior vaginal y observando qué color tomaba. En el experimento 4, la medición de pH se realizó únicamente el día de retirada de los dispositivos intravaginales.

En el experimento 5, la medición de pH se realizó en el grupo Lp una vez por semana, el día de colocación de una nueva cápsula de Lp, antes de la inserción de la misma, durante las 8 semanas que se aplicó el tratamiento con probióticos. Se midió también el día de la puesta de la esponja con progestágeno (antes de su introducción), el día de la retirada de la misma (tras la retirada) y el día de la IA, antes de inseminar. En el grupo control la medición de pH se realizó el día de la puesta de esponja, día de retirada de esponja y día de la IA, de la misma manera que en el grupo Lp.

4.3.9. Inseminación artificial o puesta con los machos

En el experimento 4, las hembras sincronizadas se pusieron en contacto con un macho provisto de mandil a las 30 y a las 48 h de retirado el dispositivo intravaginal. La monta o rechazo del macho fue observada en cada una de las cabras, que fue retirada del contacto físico una vez realizada la monta o 5 min después de rechazar la monta. Pasados 15 días después del estro, las cabras fueron puestas junto con un macho para determinar la repetición del celo y la producción de una gestación mediante monta natural, una vez que las hembras caprinas volvieron a salir en estro.

En el experimento 5, las hembras sincronizadas fueron inseminadas artificialmente utilizando pajuelas de semen que había sido congelado y descongelado según el experimento 3, utilizando el diluyente IMIDA y el macho 1. Una vez descongelada la pajuela, se cortaban sus extremos y se introducía en una vaina de plástico para IA (**Figura 4.7**). El semen era depositado en la entrada del cérvix, sin forzar su entrada en el mismo. Si éste permitía la entrada del catéter, entonces se introducía en la medida de lo posible en el cuello uterino. Cada cabra se inseminó a las 48 y 53 h tras la retirada de las esponjas vaginales, utilizándose en cada IA una pajuela de 0,5 ml con 200×10^6 de espermatozoides (**Figura 4.8**).



Figura 4.7. Catéter de IA, vaina, pajuela y espéculo usados en IA.



Figura 4.8. Realización de IA.

4.3.10. Análisis del perfil inmunológico y hormonal

Se extrajo sangre de la vena yugular de cada hembra en estudio mediante sistema vacutainer® asociado a un tubo. En el experimento 4, las muestras sanguíneas se obtuvieron 48 h después de la retirada de los dispositivos intravaginales. Fueron recogidas en un tubo conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y destinadas al análisis del porcentaje de células del sistema inmune. Para este análisis se utilizó la sangre entera, sin procesar.

En el experimento 6, las muestras se tomaron el día de la IA y 21 días después de la misma. La sangre se extrajo de la misma manera, utilizándose un tubo que contenía Heparina-Litio. En estas muestras se quiso cuantificar los niveles de P4 sérica. Para este caso, las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 1448 x g durante 15 min, separándose el plasma sanguíneo de la fracción celular. El plasma sanguíneo se depositó en tubos eppendorf y se mantuvo en congelador a -20°C hasta su análisis.

Las analíticas celulares se realizaron mediante citometría de flujo, utilizando la tecnología láser (Laser-Cell, CMV) (**Figura 4.9**). Los análisis para P4 se realizaron mediante inmunoensayo empleando un inmunoanalizador (*Fineware-Vet Veterinary immunoanalyzer*) (**Figura 4.10**) y utilizando las tiras reactivas de P4 según procedimiento descrito por el fabricante.

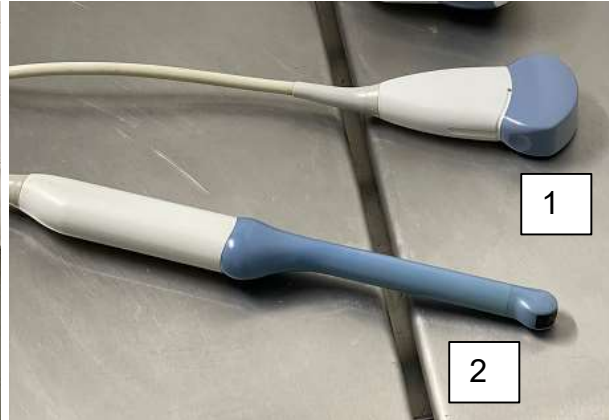


Figuras 4.9 y 4.10. Equipos utilizados para el análisis de células sanguíneas mediante citometría de flujo (izq.) e inmunoanalyzer de análisis de P4 sérica (dcha).

4.3.11. Evaluación ecográfica

El estudio ecográfico del experimento 6 comenzó 14 días después de la IA o de la monta, realizándose ecografías vaginales cada dos días hasta el día 30. Las ecografías se realizaron con el animal tumbado en decúbito supino en una camilla, sin necesidad de sedación. El equipo utilizado fue un ecógrafo General Electric GE, mod. Voluson® 730PRO (**Figura 4.11**), equipado con una sonda microconvex endovaginal de 5-9 MHz y sonda convex abdominal de 2-7 MHz (**Figura 4.12**). Para la exploración endovaginal, la sonda se cubría con un cubresonda con gel ecográfico y se introducía suavemente por la vagina de la hembra previamente lubricada (**Figura 4.13**). Mediante movimientos suaves se buscaba alguna estructura anecogénica que se pudiera corresponder con la vesícula embrionaria.

En el ensayo 4 se comprobó semanalmente si se había producido la gestación mediante ecografía abdominal (**Figura 4.14**), hasta 2 meses después, periodo en que habían transcurrido tres ciclos reproductivos.



Figuras 4.11 y 4.12. Ecógrafo GE Voluson® 730PRO (izq.). Sonda convex abdominal (1) y sonda microconvex endovaginal (2).



Figura 4.13. Exploración mediante ecografía endovaginal.



Figura 4.14. Exploración mediante ecografía abdominal.

4.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa informático *Statgraphics Centurion*[®], mediante la distribución *F* de *Snedecor* en la tabla ANOVA que determina si hay diferencias significativas entre las medias, y con la prueba de Rangos Múltiples, evaluando qué medias son significativamente diferentes de otras. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de *Fisher*, con un nivel del 95% de confianza ($p < 0,05$).

En el experimento 4 los resultados entre grupos se compararon mediante el test de *Chi-cuadrado* (χ^2) utilizando el mismo programa estadístico.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Experimento 1: Recogida de semen caprino con tres estímulos sexuales diferentes. Libido y calidad seminal del eyaculado

Los resultados de este trabajo aparecen divididos en cuatro categorías:

1. Valores promedio obtenidos durante el periodo de entrenamiento. Los machos eran más jóvenes y no tenían experiencia en la recogida seminal. Durante este periodo se obtuvieron un total de 69 eyaculados.

2. Valores promedio obtenidos una vez había transcurrido el periodo de entrenamiento, utilizando una hembra como señuelo. El número de eyaculados fue de 35.

3. Valores obtenidos en los mismos machos entrenados con hembras, sustituyendo esta hembra por un macho cabrío. El número de eyaculados obtenido fue de 43.

4. Valores promedio de los mismos machos utilizando como estímulo sexual un maniquí. El número de eyaculados obtenido fue de 58.

En el presente estudio se comprobó que los machos menores de un año de edad, previamente entrenados en la monta sobre una hembra inmovilizada, respondían de igual manera si en lugar de una hembra caprina se les suministraba un macho inmovilizado. Las variaciones observadas correspondieron a una variabilidad entre ejemplares y no a un cambio de comportamiento por la presencia de otro macho. Machos jóvenes que presentaban mayor tiempo de cortejo con las hembras siguieron siendo los que más TR mostraron al presentarles otro macho, mientras que aquellos más rápidos en la monta a la hembra también lo fueron al montar otro macho.

Sí que se aprecian diferencias, sobre todo en los TR, cuando los machos no estaban entrenados con respecto a los obtenidos una vez transcurrido un periodo de entrenamiento (**Tabla 5.1**), siendo significativamente inferiores cuando los machos ya habían sido entrenados durante varias semanas. En cambio, no se encontraron diferencias significativas al utilizar un macho o una hembra como señuelo.

En general, la presencia de otro macho no fue un impedimento para la monta y la extracción de semen. Solo un macho joven no saltó en ningún momento, siendo el mismo que no mostraba interés sexual cuando se intentaba con una hembra. Tampoco afectó a la capacidad de servicio por día de los machos cabríos, pues realizaron el mismo número de servicios que en presencia de una hembra.

El volumen de eyaculado obtenido fue mayor al usar una hembra una vez estuvieron entrenados los machos, pero no fue significativamente diferente que el obtenido al utilizar otro macho, la concentración espermática total no varió significativamente con el uso de macho o hembra, pero sí se incrementó con el paso de los meses. La calidad seminal (medida como motilidad individual espermática y porcentaje de espermatozoides móviles) no se afectó por ser estimulados con un macho en lugar de por una hembra.

Se cree que esta mejora fue debida al aumento de la edad de los machos en estudio (eran varios meses menores cuando se les entrenó con la hembra que cuando se les estudió con ambos estímulos). Los promedios de calidad de movimiento individual fueron superiores a 4, % MOT superiores al 60% en todos los casos y la concentración del eyaculado mayor de 2000×10^6 esp/ml.

Tabla 5.1. Valores promedio del tiempo de reacción (TR), volumen de eyaculado, concentración total de espermatozoides, MI y % MOT.

| | TR (s) | Volumen eyaculado (ml) | [Esp] (x10 ⁶) | MI | MOT (%) |
|-------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| ENTRENO (N=69) | 81,4 ^a ± 6,7 | 0,55 ^a ± 0,04 | 2404 ^a ± 165 | 4,08 ^a ± 0,04 | 69,1 ^a ± 1,4 |
| HEMBRA (N=35) | 19,2 ^b ± 10,2 | 0,77 ^b ± 0,07 | 3604 ^b ± 273 | 4,18 ^a ± 0,07 | 76,2 ^b ± 2,3 |
| MACHO (N=43) | 22,1 ^b ± 7,6 | 0,66 ^{a,b} ± 0,06 | 2966 ^b ± 193 | 4,20 ^a ± 0,06 | 73,4 ^{a,b} ± 1,9 |

Promedio ± error estándar. [Esp]= concentración total de espermatozoides. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas. N= número de eyaculados analizados.

El ensayo con el maniquí se realizó un año después de los otros tres, de manera que los machos contaban con un año más de edad. Los resultados se muestran en una nueva tabla (**Tabla 5.2**) junto con los promedios que se obtuvieron durante este mismo período de tiempo al utilizar una hembra como estímulo sexual. En esta tabla se incluyen los promedios de todos los machos cuando se utilizó una hembra y también los promedios de los machos que saltaban con ambos estímulos, para intentar que el efecto macho no desviara los resultados.

Se observa que se incrementó el promedio del TR también al utilizar una hembra, con respecto al obtenido el año anterior (35,1 s frente a 19,2 s), por lo que podemos atribuir este aumento medio del tiempo que los machos tardan en saltar sobre el señuelo a un aumento de la edad, y no a la utilización del maniquí.

Tabla 5.2. Valores promedio de los parámetros de calidad seminal evaluados al comparar la utilización de una hembra y un maniquí como estímulo sexual.

| | Tiempo reacción (s) | Volumen eyaculado (ml) | [Esp] (x10 ⁶) | MI | MOT (%) |
|--------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| HEMBRA (N=128)* | 35,1 ^a ± 3,18 | 1,05 ^a ± 0,04 | 2318 ^a ± 124,7 | 4,08 ^a ± 0,04 | 65,1 ^a ± 1,76 |
| HEMBRA (N=58) | 17,6 ^a ± 2,23 | 1,15 ^a ± 0,06 | 2552 ^a ± 168,4 | 4,11 ^a ± 0,05 | 69,5 ^a ± 2,11 |
| MANIQUÍ (N=58) | 51,6 ^b ± 9,12 | 0,86 ^b ± 0,06 | 1967 ^b ± 128,4 | 4,11 ^a ± 0,06 | 67,1 ^a ± 2,23 |

*= 10 machos. Promedio ± error estándar. [Esp]= concentración total de espermatozoides. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas. N= número de eyaculados analizado.

Al utilizar el maniquí como estímulo sexual la respuesta de los machos varió. De los 10 machos que fueron estudiados solo 3 de ellos saltaron regularmente sobre el maniquí. Otros 6 machos saltaron y eyacularon esporádicamente al utilizar el maniquí, pero no con regularidad y 1 macho no saltó nunca sobre el maniquí. Debido a que la mayoría de eyaculados obtenidos con este estímulo sexual pertenecían a solo 3 machos, se obtuvieron los promedios que proporcionaron esos mismos machos al utilizar una hembra, para poder comparar la calidad seminal y que ésta no estuviera influenciada por el factor macho y sí por el estímulo utilizado (**Figuras 5.1-5.5**).

En cuanto al TR, existen diferencias significativas muy notables al utilizar una hembra y un maniquí, siendo mayor cuando el estímulo sexual es este último. El tiempo promedio de todos los machos del estudio (35,1 s) se debe a una variabilidad entre machos y no al estímulo (**Figura 5.1**).

El volumen de eyaculado fue significativamente menor al utilizar el maniquí que al utilizar la hembra, al igual que la concentración de espermatozoides del eyaculado (**Figuras 5.2 y 5.3**). Sin embargo, los parámetros de motilidad

individual y porcentaje de espermatozoides móviles no fueron significativamente diferentes con distintos estímulos sexuales (**Figuras 5.4 y 5.5**).

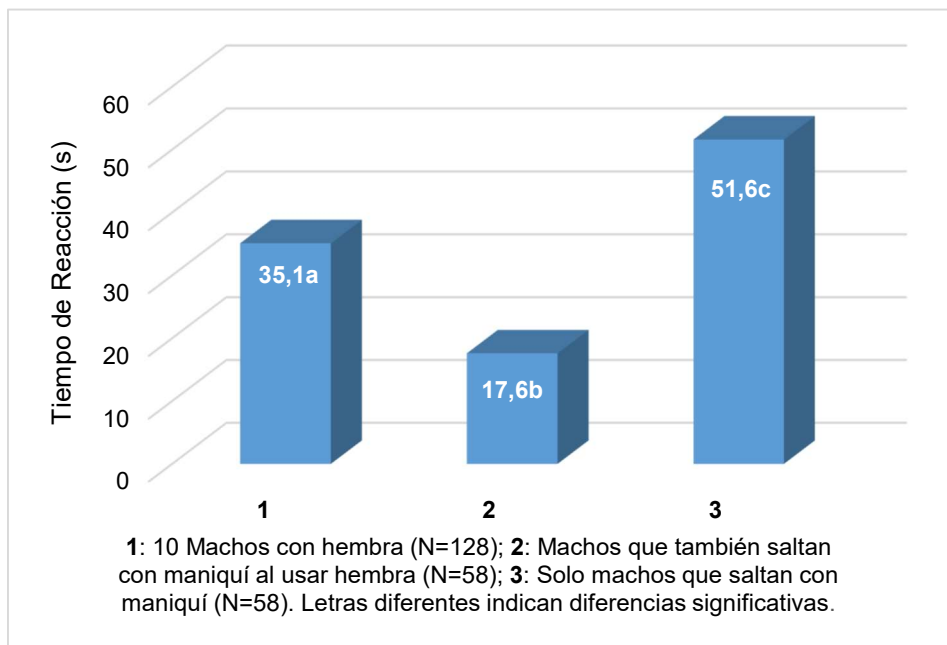


Figura 5.1. Promedio del tiempo de reacción al utilizar una hembra o un maniquí como estímulo sexual.

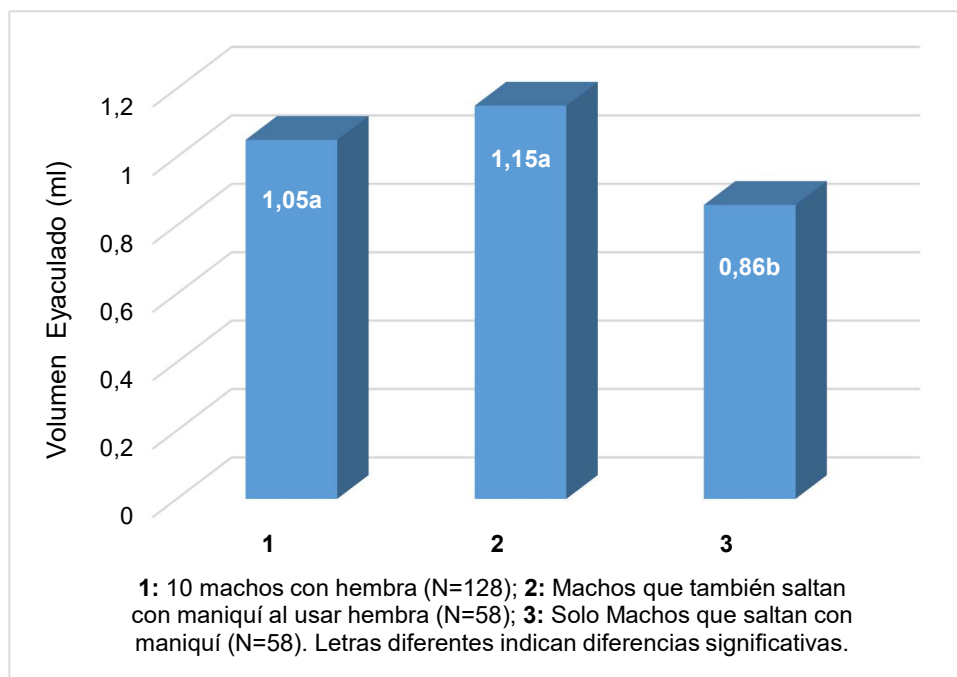


Figura 5.2. Promedio del volumen de eyaculado al utilizar una hembra o un maniquí como estímulo sexual.

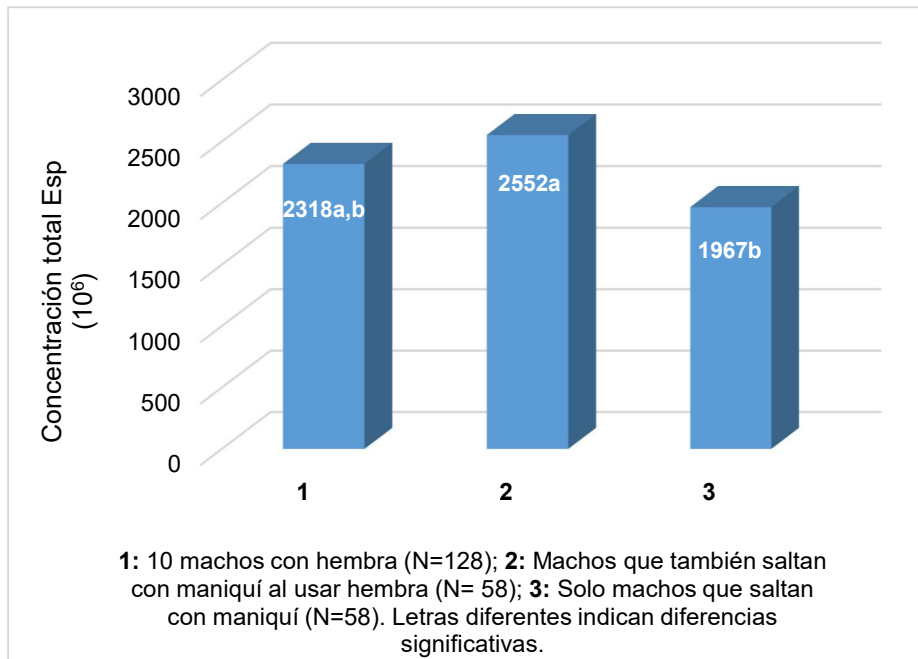


Figura 5.3. Promedio de la concentración total de espermatozoides al utilizar una hembra o un maniquí como estímulo sexual.

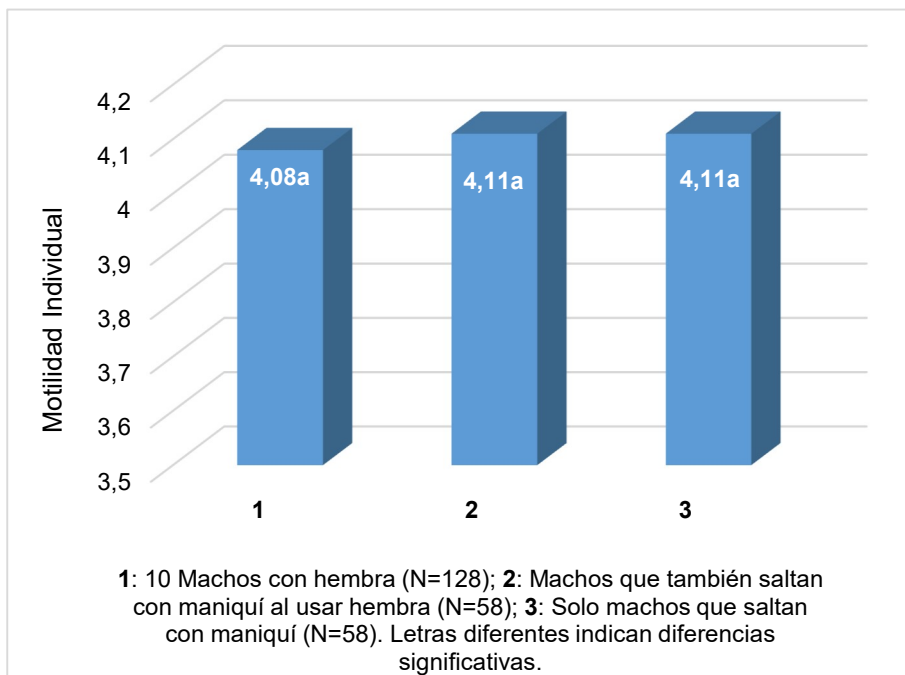


Figura 5.4. Promedio de la motilidad individual al utilizar una hembra o un maniquí como estímulo sexual.

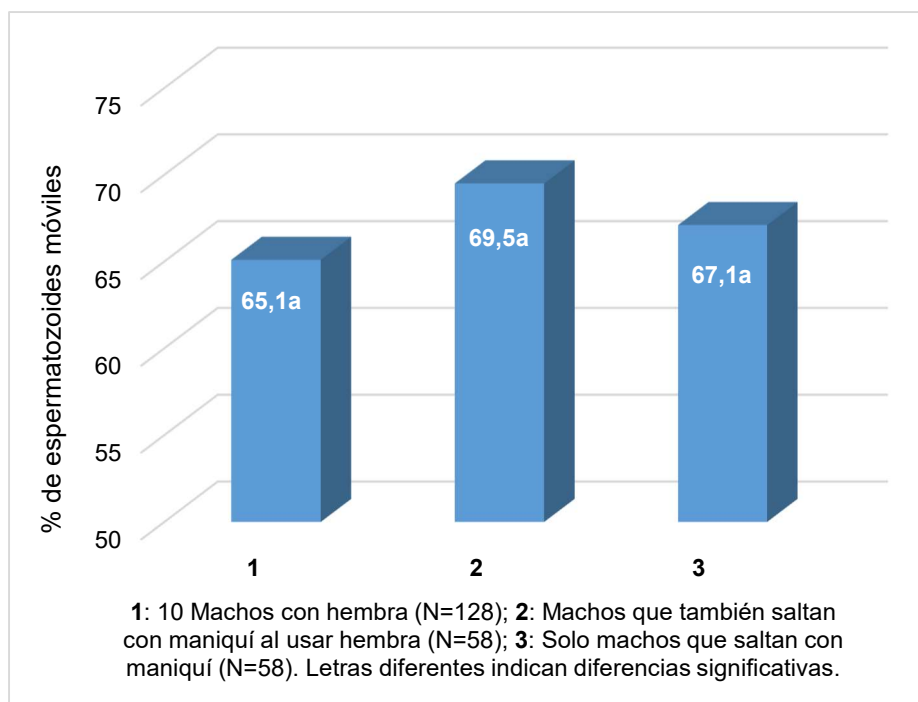


Figura 5.5. Promedio del porcentaje de espermatozoides móviles al utilizar una hembra o un maniquí como estímulo sexual.

5.2. Experimento 2: Comportamiento sexual y calidad seminal del macho cabrío MG en distintas edades

Al observar a los machos más jóvenes, se vieron grandes diferencias en su comportamiento sexual. Comenzaron a ser estudiados cuando contaban con 3 meses de edad, inicio del comportamiento sexual primario (monta sin eyaculación). A los 4,5 meses se obtuvo el eyaculado de un macho, pero con pocos espermatozoides y todos inmóviles. Este mismo macho consiguió una valoración de 4 en MI y 85% MOT cuando se le recogió semen dos meses después, al contar con 6,5 meses de edad. Otros tres machos de 4,5 meses también saltaban sobre la hembra, pero no producían aún eyaculado. Un macho produjo espermatozoides con MI de 2 y % MOT del 20% a los 3,5 meses. Otros tres machos de edades entre 3 y 6 meses no llegaron a saltar ninguna semana del estudio o lo hicieron de forma esporádica.

En general, los machos menores de 1 año mostraron comportamientos sexuales muy diversos, desde aquellos que saltaban con regularidad sobre la hembra y eyaculaban sin dificultad a partir de los 4,5 meses, otros que comenzaban más tarde, entre los 6 y 8 meses, y aquellos que mostraban libido, pero no montaban a la hembra (exteriorizando el pene e incluso eyaculando si se les colocaba la VA). Hubo machos que saltaban a la hembra, pero sin llegar a eyacular y otro grupo que no mostraba libido ni interés por la monta. Se obtuvieron los promedios del tiempo en segundos que se tardaba en montar a la hembra en cada uno de los saltos, y los datos del volumen de eyaculado y de concentración espermática total para cada uno de los saltos. Estos parámetros se calcularon para todos los machos a la vez, sin distinguir por edad (**Tabla 5.3**), y comparando entre machos menores y mayores de un año (**Tabla 5.4 y Figuras 5.6-5.8**).

Tabla 5.3. Promedio del tiempo de reacción (TR), volumen de eyaculado y concentración de espermatozoides en el eyaculado en uno de los saltos, sin diferenciar edad de los machos.

| | TR (s) | Volumen eyaculado (ml) | [Esp] (x10 ⁶) |
|----------------|-----------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Salto 1 (N=52) | 54,9 ^a ± 6,7 | 0,77 ^a ± 0,07 | 3640 ^a ± 310 |
| Salto 2 (N=41) | 58,9 ^a ± 7,4 | 0,69 ^a ± 0,08 | 3041 ^{a,b} ± 302 |
| Salto 3 (N=30) | 74,5 ^a ± 10,5 | 0,61 ^a ± 0,07 | 2325 ^{b,c} ± 295 |
| Salto 4 (N=22) | 121,6 ^b ± 16 | 0,63 ^a ± 0,09 | 1949 ^c ± 234 |
| Salto 5 (N=17) | 152,7 ^{b,c} ± 22,2 | 0,5 ^a ± 0,09 | 1515 ^c ± 204 |
| Salto 6 (N=5) | 169,3 ^c ± 33,1 | 0,52 ^a ± 0,12 | 1861 ^{b,c} ± 359 |

Promedio ± error estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas. N= número de eyaculados de cada salto. [Esp]= concentración de espermatozoides.

Tabla 5.4. Promedio de los parámetros estudiados en cada uno de los saltos, diferenciando entre machos mayores de 1 año y menores de 1 año.

| Edad/ Nº salto (N/n) | Tiempo reacción (s) | | Volumen eyaculado (ml) | | [Esp] (x10 ⁶) | |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | < 1 año | > 1 año | < 1 año | >1 año | < 1 año | > 1 año |
| Salto 1 N=23; n=29 | 42,6 ^a ± 6,5 | 81,6 ^b ± 14,1 | 0,69 ^a ± 0,08 | 0,91 ^a ± 0,13 | 3075 ^a ± 335 | 4620 ^b ± 559 |
| Salto 2 N=21; n=20 | 44,8 ^a ± 7,7 | 87,06 ^b ± 13,8 | 0,46 ^a ± 0,05 | 1,15 ^b ± 0,17 | 2476 ^a ± 266 | 4580 ^b ± 688 |
| Salto 3 N=18; n=12 | 62,8 ^a ± 11,1 | 102,18 ^b ± 22,3 | 0,42 ^a ± 0,04 | 1,14 ^b ± 0,16 | 1888 ^a ± 180 | 4730 ^b ± 1100 |
| Salto 4 N=12; n=10 | 113,9 ^a ± 20,8 | 140,22 ^a ± 21 | 0,39 ^a ± 0,04 | 1,14 ^b ± 0,18 | 1667 ^a ± 227 | 2966 ^b ± 519 |
| Salto 5 N=10; n=7 | 141,2 ^a ± 24,6 | 190 ^a ± 74 | 0,34 ^a ± 0,06 | 0,92 ^b ± 0,12 | 1381 ^a ± 201 | 2320 ^b ± 580 |
| Salto 6 N=4; n=1 | 193,2 ± 34,5 | 61,5 [*] | 0,42 ± 0,07 | 0,95 [*] | 1606 ± 286 | 3900 [*] |

Promedio ± error estándar. *Solo una medida, no se considera para análisis estadístico. Letras distintas en la misma fila, en el mismo parámetro, indican diferencias significativas. N= nº de eyaculados <1 año. n: nº eyaculados > 1 año. [Esp]= concentración de espermatozoides.

En general, se aprecia una tendencia al aumento del tiempo que tarda un macho en saltar conforme aumenta el número de saltos. Comparando por edades, el TR de machos jóvenes fue significativamente inferior que el de los adultos, en los saltos 1, 2 y 3 (**Figura 5.6**). Los test estadísticos no muestran diferencias significativas en el TR del resto de saltos, pero estos siguen siendo inferiores en machos menores de un año que en mayores. Otra diferencia que aparecía por edad, es que los machos menores de 1 año fueron capaces de saltar un mayor número de veces en la misma mañana (un macho joven llegó a saltar 7 veces en una mañana y otros 6 machos jóvenes saltaron 6 veces en varias de las semanas de la prueba, aunque no siempre proporcionaban eyaculados), mientras que los mayores de un año saltaron como máximo 5 veces

(machos de 1,5, 4 y 5 años de edad). Los machos de 6 y 7 años dieron un máximo de 2 saltos en la misma mañana, con días en los que no saltaron ni una sola vez. Se apreció, por tanto, mayor libido en machos jóvenes o adultos jóvenes, con respecto a machos cabríos con 6 y 7 años de edad.

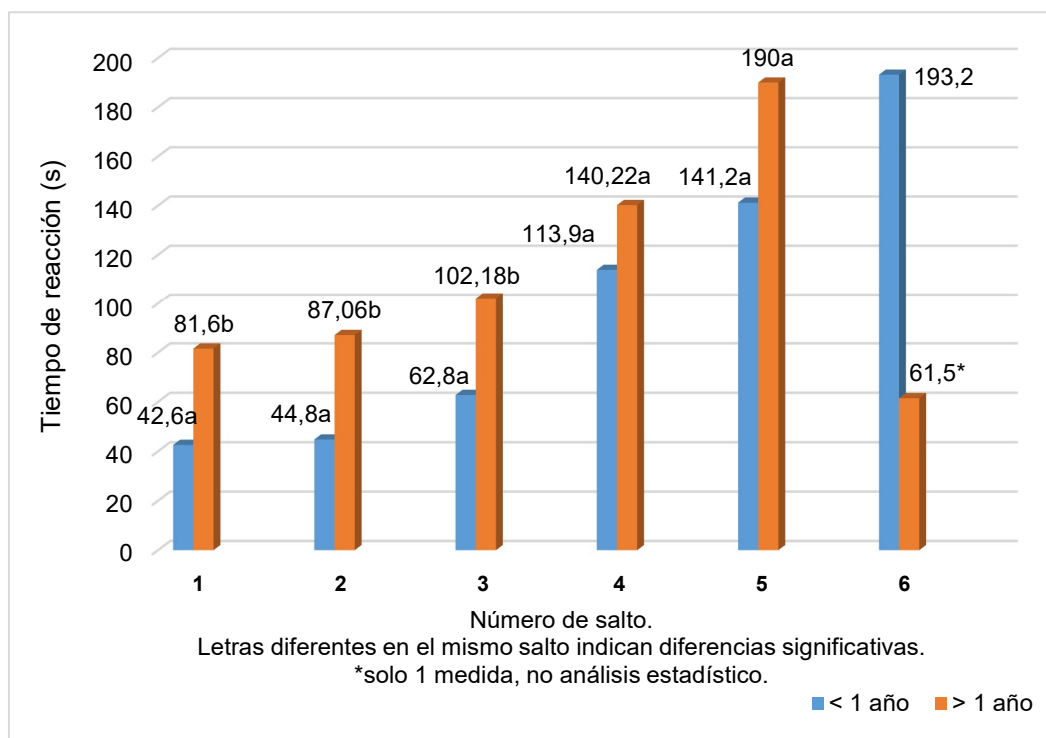


Figura 5.6. Promedio del tiempo de reacción para cada salto diferenciando entre machos menores y mayores de 1 año.

En este trabajo se midió el volumen y la concentración espermática obtenidos en el eyaculado de cada salto. Uniendo los resultados de todos los machos, sin distinguir entre grupos de edad, se obtuvieron los valores promedio para el parámetro “volumen del eyaculado” de la **Tabla 5.2**. El volumen del eyaculado disminuye en promedio en cada salto, siendo el primer eyaculado de la mañana el de mayor cantidad, no existiendo diferencias significativas entre ellos. El aumento del volumen medio del salto 6 puede explicarse debido al pequeño número de muestras para calcular el promedio de ese salto.

Si se analiza el volumen de eyaculado diferenciando a los machos por grupos de edad (menores y mayores de un año), se obtuvo que el volumen de

eyaculado fue inferior en los machos más jóvenes con respecto a los mayores (**Figura 5.7**), siendo estas diferencias significativas en los saltos 2, 3, 4 y 5. En el salto 1 el volumen es menor en los machos menores de un año, pero sin diferencia significativa estadística. Lo mismo ocurre con el salto 6, aunque en este caso puede deberse al escaso número de valores para analizar este salto.

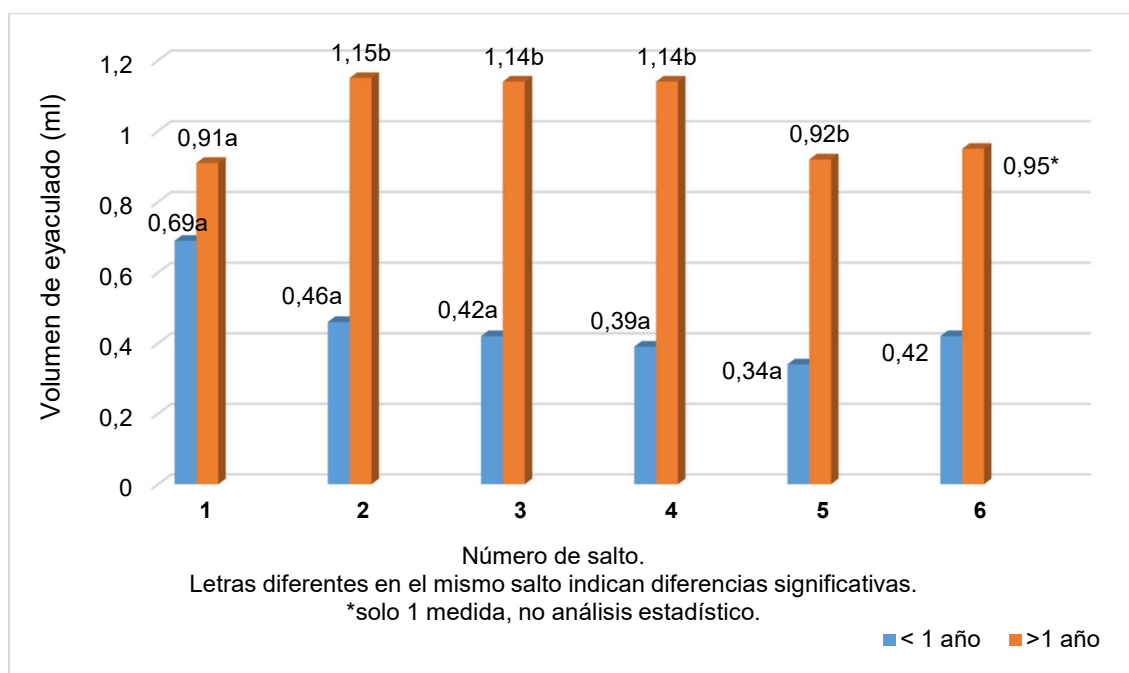


Figura 5.7. Promedio del volumen de eyaculado para cada salto diferenciando entre machos menores y mayores de 1 año.

También se observa una tendencia general a la disminución de la concentración de espermatozoides totales en el eyaculado (**Tabla 5.3**), siendo significativamente mayor la concentración del primer salto que en los saltos 3, 4, 5 y 6. El aumento de la concentración espermática en el salto 6 con respecto al salto 5 puede deberse a los escasos valores con los que hacer el promedio, ya que un bajo número de machos llegaron a saltar 6 veces. Si se diferencia por edad (**Figura 5.8**), vemos que los machos menores de 1 año presentan concentraciones espermáticas inferiores a los mayores, siendo significativas estas diferencias en los saltos 1, 2, 3, 4 y 5. La concentración del salto 6 no se consideró para análisis estadístico por contar con solo una medida en el caso de los machos mayores de 1 año.

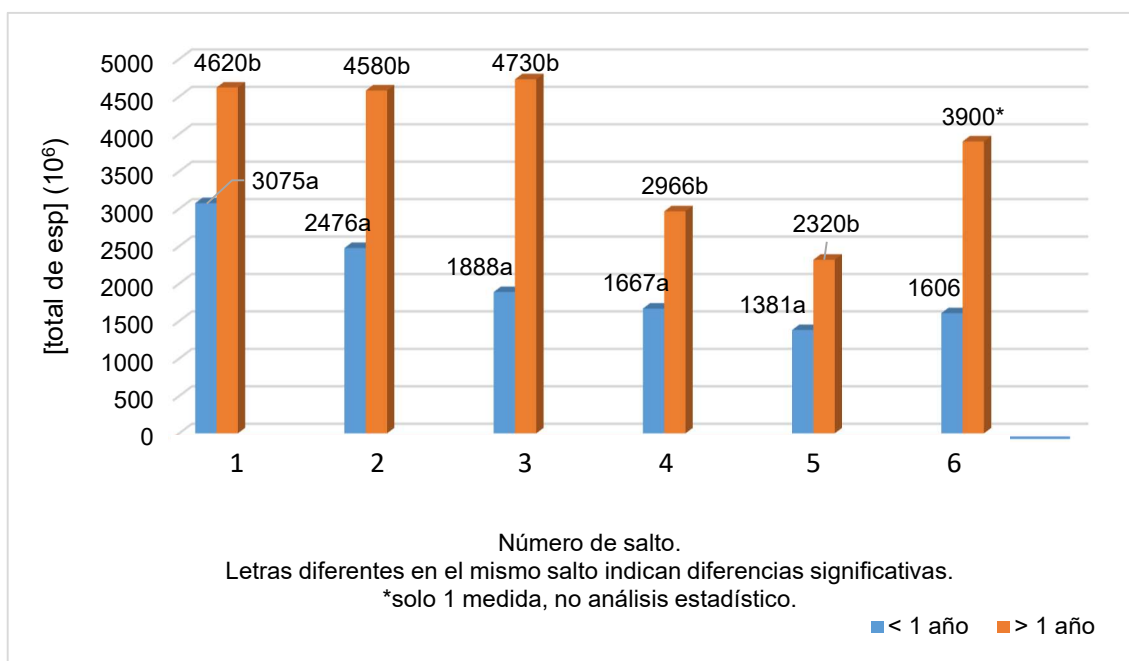


Figura 5.8. Promedio de la concentración de espermatozoides [total esp] para cada salto diferenciando entre machos menores y mayores de 1 año.

Se evaluó de forma subjetiva la calidad seminal del primer eyaculado de la mañana, midiéndose MI de cada muestra (escala 0 a 5) y %MOT. Para determinar a qué edad esta calidad seminal era óptima para realizar ensayos de IA, se dividió a los machos en distintos grupos de edad, desde los 3,5 meses hasta los 7 años. Los resultados se muestran en la **Tabla 5.5**.

Tabla 5.5. Promedio de calidad seminal del primer eyaculado matinal en los distintos rangos de edad.

| EDAD | MI | % MOT |
|-----------|----------------------------|-----------------------------|
| 3,5 meses | 2 | 20* |
| 5 meses | 4,12 ^a ± 0,24 | 58,7 ^{a,b} ± 8,8 |
| 6 meses | 4,04 ^a ± 0,2 | 63,3 ^b ± 7,2 |
| 7 meses | 3,31 ^b ± 0,24 | 52,5 ^{a,b} ± 8,8 |
| 8 meses | 4,31 ^a ± 0,24 | 70,0 ^{b,c,d} ± 8,8 |
| 9 meses | 3,31 ^b ± 0,24 | 51,9 ^{a,b} ± 8,8 |
| 10 meses | 3,37 ^{a,b} ± 0,24 | 37,5 ^a ± 8,8 |

| | | |
|----------|--------------------------|----------------------------|
| 1,5 años | 4,03 ^a ± 0,18 | 69,3 ^{b,c} ± 6,7 |
| 4 años | 4,1 ^a ± 0,14 | 78,3 ^d ± 5,1 |
| 5 años | 4,25 ^a ± 0,28 | 77,0 ^{c,d} ± 7,9 |
| 6 años | 3,98 ^a ± 0,13 | 74,7 ^{c,d} ± 4,9 |
| 7 años | 4,06 ^a ± 0,28 | 71,83 ^{c,d} ± 9,1 |

Promedio ± error estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas. *Solo una medida, no se considera para análisis estadístico.
MI: motilidad individual. % MOT: porcentaje de espermatozoides móviles.

En general, la calidad seminal es óptima para IA desde los 5 meses, cuando se obtiene un 4 en motilidad individual y más de un 50% de MOT. La menor calidad de las muestras de 9 y 10 meses se debe a variabilidad entre machos expuestos a temperaturas estivales, ya que dos machos de estas edades presentaban calidades inferiores a las del promedio. La calidad seminal de los machos menores de un año se evaluó también en los diferentes saltos, para determinar si ésta variaba en los sucesivos eyaculados. Los resultados se muestran en la **Tabla 5.6**. Estos resultados nos muestran que al contrario de lo que ocurre con el volumen de eyaculado y la concentración espermática (ambas disminuyen con los sucesivos saltos), la calidad seminal se mantiene, no habiendo diferencias significativas entre las calidades espermáticas de los eyaculados obtenidos en los distintos saltos a lo largo de la mañana.

Tabla 5.6. Promedio de la calidad seminal de los sucesivos eyaculados en machos menores de 1 año.

| | MI | % MOT |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|
| Eyaculado 1 (N=23) | 3,93 ^a ± 0,16 | 61,47 ^b ± 4,13 |
| Eyaculado 2 (N=21) | 3,96 ^a ± 0,16 | 66,53 ^b ± 4,01 |
| Eyaculado 3 (N=18) | 4,27 ^a ± 0,2 | 72,5 ^b ± 4,92 |
| Eyaculado 4 (N=12) | 4,11 ^a ± 0,21 | 71,13 ^b ± 5,14 |
| Eyaculado 5 (N=10) | 4,0 ^a ± 0,21 | 66,36 ^b ± 5,14 |
| Eyaculado 6 (N=4) | 3,5 ^a ± 0,48 | 70 ^b ± 12 |

Promedio \pm error estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. MI: motilidad individual. % MOT: porcentaje de espermatozoides móviles.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, se observa que la libido y la capacidad de monta en un mismo día es mayor en machos menores de 1 año que en los mayores, pero que el volumen de eyaculado y la concentración espermática son mayores en los adultos. Se pudo apreciar que los machos adultos dedicaban mayor tiempo a realizar las pautas de cortejo que los machos más jóvenes, pero con el paso del tiempo, a lo largo de las semanas en las que se realizó este trabajo, se vio que los machos jóvenes alargaban el tiempo de cortejo a la hembra, incorporando pateos y olfateos, aunque siendo todavía este cortejo más breve que el de machos adultos. Al estudiar la calidad seminal, se obtuvieron diferencias debidas a la edad del ejemplar, así como variaciones entre individuos. Como tendencia general, se apreció que la calidad seminal es menor en los eyaculados de los machos jóvenes que en la de los adultos, pero esta calidad fue aumentando conforme pasaban las semanas del estudio, asemejándose cada vez más a la de machos adultos.

5.3. Experimento 3: Diseño de un protocolo de congelación seminal caprina, mediante la adaptación de un protocolo utilizado en la especie porcina, y de un diluyente seminal que proporcione elevada calidad seminal post-descongelación

La calidad seminal (MI y % MOT) de las muestras en fresco de cada macho se muestra en la **Tabla 5.7**. Después de ser sometidas al proceso de congelación y descongelación, esta calidad disminuyó en mayor o menor medida según el diluyente utilizado y el macho considerado.

Tabla 5.7. Promedios de calidad seminal por macho cabrío en semen fresco.

| Macho | MI | % MOT |
|------------|-------------|--------------|
| 1 (N=16) | 4,5 ± 0,1 | 81,4 ± 3,1 |
| 2 (N=16) | 4,3 ± 0,1 | 71,1 ± 3,1 |
| 3 (N=11) | 4,0 ± 0,1 | 63,2 ± 3,7 |
| 4 (N=7) | 4,1 ± 0,15 | 63,2 ± 4,6 |
| 5 (N=7) | 4,3 ± 0,15 | 62,5 ± 4,6 |
| 6 (N=6) | 4,3 ± 0,1 | 74,0 ± 3,5 |
| POOL (N=8) | 3,92 ± 0,23 | 64,17 ± 7,10 |

Promedio ± error estándar. MI: motilidad individual.

% MOT: porcentaje de espermatozoides móviles

A través de la evaluación con el sistema CASA, para el pool de eyaculados se obtiene que el diluyente IMIDA proporcionó los mayores promedios en todos los parámetros evaluados en hora 0 (H0) y hora 2 (H2). En hora 5 (H5) no siempre sus promedios fueron los más elevados, pero no hubo diferencias significativas con el diluyente Thilmant. Solo el parámetro ALH ofreció unos resultados más variables, siendo superior con Thilmant en H0 y con leche desnatada en H2. Destacar que ningún eyaculado del pool llegó a H5 con el diluyente de leche desnatada (**Tabla 5.8**).

Tabla 5.8. Promedios de los parámetros seminales obtenidos por sistema CASA para el **pool** de machos cabríos MG en test de resistencia, según diluyente.

| POOL | H0 | | | H2 | | | H5 | | |
|------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|-------------------|
| | THILM. | LECHE | IMIDA | THILM. | LECHE | IMIDA | THILM. | LECHE | IMIDA |
| % | 48,0 ^a | 42,5 ^a | 71,8 ^b | 53,0 ^a | 43,8 ^a | 68,3 ^b | 29,9 | - | 35,2 |
| MOT | ± 4,7 (N=8) | ± 4,5 (N=8) | ± 4,2 (N=8) | ± 4,1 (N=8) | ± 3,8 (N=4) | ± 3,9 (N=8) | ± 2,28 (N=5) | | ± 6,85 (N=5) |
| % | 31,3 ^a | 25,7 ^a | 56,1 ^b | 36,8 ^a | 14,4 ^b | 54,7 ^c | 18,6 ^a | - | 10,2 ^b |
| MP | ± 3,8 | ± 3,7 | ± 3,4 | ± 2,3 | ± 2,2 | ± 2,3 | ± 2,36 | | ± 2,58 |

| | | | | | | | | | |
|--------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|-------------------|--------------------|-------------------|---|-------------------|
| VCL | 101,1 ^a | 117,2 ^b | 138,9 ^c | 118,0 ^a ± | 96,6 ^b | 137,5 ^c | 88,8 | - | 72,0 |
| (µm/s) | ± 3,4 | ± 3,3 | ± 3,0 | 3,1 | ± 2,9 | ± 2,9 | ± 5,68 | | ± 6,83 |
| VSL | 74,5 ^a | 91,1 ^b | 121,3 ^c | 100,8 ^a | 78,5 ^b | 126,9 ^c | 79,8 | - | 61,4 |
| (µm/s) | ± 3,0 | ± 2,9 | ± 2,7 | ± 4,1 | ± 3,8 | ± 4,0 | ± 7,13 | | ± 4,75 |
| LIN | 63,5 ^a | 72,9 ^b | 82,9 ^c | 78,3 ^a | 78,3 ^a | 88,5 ^b | 81,7 | - | 82,0 |
| | ± 1,4 | ± 1,4 | ± 1,3 | ± 2,0 | ± 1,8 | ± 1,9 | ± 2,4 | | ± 2,9 |
| STR | 77,6 ^a | 81,7 ^b | 89,5 ^c | 86,3 ^a | 91,0 ^b | 92,8 ^b | 89,9 ^a | - | 95,8 ^b |
| | ± 1,2 | ± 1,1 | ± 1,0 | ± 1,2 | ± 1,1 | ± 1,2 | ± 1,5 | | ± 1,8 |
| ALH | 2,6 ^a | 2,2 ^b | 2,4 ^c | 2,2 ^a | 2,4 ^b | 2,2 ^a | 1,84 | - | 1,77 |
| | ± 0,06 | ± 0,06 | ± 0,05 | ± 0,06 | ± 0,06 | ± 0,06 | ± 0,09 | | ± 0,1 |

Promedio ± error estándar. Letras diferentes en la misma fila para el mismo tiempo, indican diferencias significativas entre diluyentes. Igual N para todos los parámetros.

Si se observa la respuesta de los tres machos del ensayo de forma separada, se obtiene que el diluyente de leche desnatada proporcionó el menor número de muestras que alcanzaban H5 (**Tablas 5.9, 5.10 y 5.11**). Funcionó especialmente mal con el macho 2, del cual no se pudieron obtener eyaculados con espermatozoides móviles en H2 congelados con este diluyente. En el caso de los índices LIN y STR, los promedios muestran que el diluyente de leche desnatada funciona mejor que el resto de parámetros, obteniendo valores significativamente superiores en algunos casos. Sin embargo, la resistencia a lo largo del tiempo fue menor con este diluyente, y estos promedios pueden haber estado influenciados por el hecho de que el número de muestras que pudieron evaluarse fue demasiado pequeño para una prueba estadística fiable. Los diluyentes Thilmant e IMIDA arrojaron resultados muy similares entre ellos, lo que parece lógico por la similitud en su composición. Aún siendo muy parecidos, el diluyente IMIDA mostró los promedios más elevados de forma general.

Tabla 5.9. Promedios de los parámetros seminales obtenidos por sistema CASA para el **macho 1** en test de resistencia, según diluyente.

| MACHO 1 | H0 | | | H2 | | | H5 | | |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------|-------------------------------------|
| | THILM. | LECHE | IMIDA | THILM. | LECHE | IMIDA | THILM. | LECHE | IMIDA |
| % MOT | 55,7 ^a ± 3,9 (N=6) | 49,8 ^a ± 4,2 (N=6) | 65,6 ^b ± 2,8 (N=6) | 39,6 ^a ± 5,2 (N=6) | 18,1 ^b ± 5,6 (N=4) | 43,3 ^a ± 4,1 (N=6) | 43,8 ^a ± 5,8 (N=3) | - | 62,3 ^b ± 3,2 (N=4) |
| % MP | 35,0 ^a ± 3,1 | 36,7 ^b ± 3,4 | 43,8 ^b ± 2,3 | 25,8 ^a ± 4,2 | 8,9 ^b ± 4,5 | 26,3 ^a ± 3,3 | 37,9 ± 4,6 | - | 41,6 ± 2,5 |
| VCL (µm/s) | 120,9 ^a ± 5,0 | 129,4 ^a ± 5,5 | 142,7 ^b ± 3,7 | 113,3 ± 6,4 | 108,9 ± 6,9 | 107,4 ± 5,0 | 133,3 ^a ± 4,72 | - | 122,1 ^b ± 2,59 |
| VSL (µm/s) | 99,4 ^a ± 5,8 | 119,5 ^b ± 6,4 | 114,3 ^b ± 4,3 | 98,2 ± 7,1 | 87,8 ± 7,6 | 85,2 ± 5,6 | 129,5 ^a ± 5,4 | - | 108,7 ^b ± 3,0 |
| LIN | 75,6 ^a ± 1,8 | 88,6 ^b ± 1,9 | 74,6 ^a ± 1,3 | 79,0 ± 2,6 | 73,8 ± 2,8 | 73,3 ± 2,1 | 92,7 ± 3,6 | - | 86,4 ± 2,0 |
| STR | 85,8 ^a ± 1,08 | 93,5 ^b ± 1,2 | 85,8 ^a ± 0,8 | 87,5 ± 1,5 | 90,7 ± 1,6 | 91,0 ± 1,1 | 96,3 ± 3,7 | - | 94,3 ± 2,0 |
| ALH | 2,3 ^a ± 0,09 | 2,1 ^b ± 0,08 | 2,8 ^c ± 0,06 | 2,1 ^a ± 0,06 | 2,7 ^b ± 0,07 | 2,6 ^b ± 0,05 | 1,8 ^a ± 0,1 | - | 2,3 ^b ± 0,05 |

Promedio ± error estándar. Letras diferentes en la misma fila para el mismo tiempo, indican diferencias significativas entre diluyentes. Igual N para todos los parámetros.

Tabla 5.10. Promedios de los parámetros seminales obtenidos por sistema CASA para el **macho 2** en test de resistencia, según diluyente.

| MACHO 2 | H0 | | | H2 | | | H5 | | |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|-------|----------------------------|-------------------------------------|-------|-------------------------------------|
| | THILM. | LECHE | IMIDA | THILM. | LECHE | IMIDA | THILM. | LECHE | IMIDA |
| % MOT | 56,7 ^a ± 4,2 (N=6) | 18,2 ^b ± 4,5 (N=6) | 54,6 ^a ± 3,2 (N=6) | 40,1 ± 5,0 (N=5) | - | 49,1 ± 4,8 (N=4) | 51,6 ^a ± 4,6 (N=3) | - | 53,2 ^b ± 8,6 (N=3) |
| % MP | 33,9 ^a ± 3,4 | 10,4 ^b ± 3,7 | 34,1 ^a ± 2,6 | 20,6 ^a ± 4,4 | - | 40,1 ^b ± 4,3 | 27,2 ± 2,1 | - | 34,2 ± 6,3 |
| VCL (µm/s) | 120,6 ^a ± 4,6 | 102,7 ^b ± 5,0 | 119,3 ^a ± 3,5 | 112,6 ± 9,6 | - | 127,3 ± 8,7 | 92,8 ± 11,1 | - | 100,5 ± 8,2 |

| | | | | | | | | | |
|----------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|---|----------------------------|----------------------------|---|----------------------------|
| VSL ($\mu\text{m/s}$) | 93,5 ^a ± 5,4 | 77,0 ^b ± 5,8 | 97,5 ^a ± 4,1 | 102,6 ± 9,6 | - | 107,3 ± 9,3 | 83,7 ± 5,6 | - | 83,5 ± 11,0 |
| LIN | 72,8 ^{a,b} ± 2,7 | 68,7 ^b ± 2,9 | 72,8 ^{a,b} ± 2,7 | 84,7 ± 4,1 | - | 75,2 ± 4,0 | 82,5 ± 5,2 | - | 76,2 ± 3,8 |
| STR | 87,7 ^a ± 1,9 | 80,9 ^b ± 2,1 | 87,7 ^a ± 1,5 | 92,7 ± 2,5 | - | 88,4 ± 2,4 | 88,8 ^a ± 1,4 | - | 93,9 ^b ± 1,0 |
| ALH | 2,8 ^a ± 0,1 | 2,2 ^b ± 0,1 | 2,4 ^c ± 0,08 | 2,0 ^a ± 0,07 | - | 2,4 ^b ± 0,07 | 1,8 ^a ± 0,1 | - | 2,3 ^b ± 0,08 |

Promedio \pm error estándar. Letras diferentes en la misma fila para el mismo tiempo, indican diferencias significativas entre diluyentes. Igual N para todos los parámetros.

Tabla 5.11. Promedios de los parámetros seminales obtenidos por sistema CASA para el macho 3 en test de resistencia, según diluyente.

| MACHO 3 | H0 | | | H2 | | | H5 | | |
|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | THILM. | LECHE | IMIDA | THILM. | LECHE | IMIDA | THILM. | LECHE | IMIDA |
| % MOT | 30,6 ^a ± 4,4 (N=6) | 44,1 ^b ± 7,3 (N=6) | 54,7 ^b ± 3,9 (N=6) | 32,4 ^a ± 3,2 (N=5) | 36,4 ^a ± 4,6 (N=4) | 58,7 ^b ± 3,5 (N=5) | - | 22,6 ^a ± 2,8 (N=2) | 33,0 ^b ± 2,1 (N=2) |
| % MP | 20,7 ^a ± 3,5 | 30,4 ^b ± 5,9 | 36,6 ^b ± 3,1 | 17,4 ^a ± 2,9 | 9,1 ^a ± 4,1 | 37,9 ^b ± 3,1 | - | 9,2 ± 3,1 | 16,2 ± 2,3 |
| VCL ($\mu\text{m/s}$) | 107,1 ^a ± 6,7 | 112,6 ^{ab} ± 11,3 | 133,7 ^b ± 5,9 | 77,7 ^a ± 4,21 | 67,7 ^a ± 6,0 | 124,0 ^b ± 4,5 | - | 86,9 ± 10,18 | 99,6 ± 7,7 |
| VSL ($\mu\text{m/s}$) | 84,8 ± 6,1 | 98,2 ± 10,2 | 97,7 ± 5,4 | 65,6 ^a ± 4,6 | 58,7 ^a ± 6,6 | 99,9 ^b ± 5,0 | - | 77,9 ± 12,4 | 83,4 ± 9,4 |
| LIN | 71,0 ^a ± 2,5 | 83,4 ^b ± 4,2 | 69,4 ^a ± 2,2 | 75,1 ± 2,1 | 80,8 ± 3,0 | 75,8 ± 2,3 | - | 83,0 ± 5,0 | 76,4 ± 3,8 |
| STR | 80,8 ^a ± 1,9 | 91,5 ^b ± 3,2 | 78,3 ^a ± 1,7 | 86,0 ^a ± 1,5 | 92,8 ^b ± 2,2 | 83,4 ^a ± 1,6 | - | 92,5 ± 2,4 | 91,9 ± 1,8 |
| ALH | 2,3 ^a ± 0,1 | 2,0 ^a ± 0,2 | 2,7 ^b ± 0,1 | 1,9 ^a ± 0,06 | 1,7 ^a ± 0,09 | 2,4 ^b ± 0,07 | - | 2,0 ± 0,16 | 2,2 ± 0,12 |

Promedio \pm error estándar. Letras diferentes en la misma fila para el mismo tiempo, indican diferencias significativas entre diluyentes. Igual N para todos los parámetros.

En cuanto a los valores de VCL ($\mu\text{m/s}$), estos son más altos con el diluyente IMIDA, ya que en el tiempo 0 están por encima de 110 $\mu\text{m/s}$ en todos los machos,

lo que corresponde a espermatozoides rápidos. Contrariamente al valor de los otros parámetros, el diluyente de leche desnatada mostró promedios de LIN y STR particularmente altos, especialmente este último, y en ocasiones fue significativamente más alto que los otros diluyentes. También se observó que después de 5 horas de descongelación, las tasas de STR fueron más altas que en las muestras en el tiempo 0 después de la descongelación en todos los machos, lo que podría sugerir que la rectitud del movimiento mejora después de un tiempo de adaptación después de la descongelación.

Cinco horas después de la descongelación, se vio que muchas muestras congeladas con el diluyente de leche desnatada ya no contenían espermatozoides móviles. Concretamente, no se pudieron obtener datos del macho 2 congelado con este diluyente en H2 o H5, ni del macho 1 ni del pool tenemos muestras en H5 con diluyente de leche desnatada. El macho 3 no proporcionó ningún eyaculado que alcanzara H5 con espermatozoides móviles con el diluyente Thilmant. Sin embargo, las muestras congeladas con diluyente IMIDA proporcionaron resultados en todas las horas de evaluación y todos los machos.

La comparación de diluyentes por observación microscópica subjetiva (**Tablas 5.12, 5.13, 5.14 y 5.15**) reveló menos diferencias significativas que el sistema de evaluación CASA. Sin embargo, es interesante mencionar que el diluyente de leche desnatada es también el que ofreció los menores promedios a lo largo de esta evaluación, con diferencias significativas especialmente en las muestras recién descongeladas (H0). Los promedios de los diluyentes Thilmant e IMIDA fueron más parecidos.

El pool de machos no mostró diferencias significativas en ningún parámetro evaluado en ninguna de las horas de evaluación, pero sí se repite la tendencia a un menor promedio de las muestras congeladas con el diluyente de leche desnatada (**Tabla 5.12**).

Tabla 5.12. Promedio de parámetros de calidad seminal mediante evaluación microscópica subjetiva para el **pool** de machos cabríos en test de resistencia, según diluyente.

| POOL | H0 | | | H2 | | | H5 | | |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | THILM. | LECHE | IMIDA | THILM. | LECHE | IMIDA | THILM. | LECHE | IMIDA |
| MI | 3,9 ± 0,4 (N=8) | 4,0 ± 0,4 (N=8) | 4,1 ± 0,4 (N=8) | 3,75 ± 0,35 (N=8) | 3,75 ± 0,35 (N=4) | 4,0 ± 0,35 (N=8) | **3 N=2 | **3 N=2 | **3 N=3 |
| % MOT | 67,5 ± 3,0 | 62,5 ± 2,97 | 66,2 ± 3,0 | 53,7 ± 4,89 | 57,5 ± 4,89 | 63,7 ± 4,89 | 27,5 ± 1,98 | 18,7 ± 1,98 | 20,0 ± 2,79 |
| TV (% vivos) | 56,0 ± 6,3 | 47,0 ± 6,3 | 61,5 ± 6,3 | 52,5 ± 8,01 | 42,0 ± 8,01 | 49,5 ± 8,01 | 38,5 ± 6,49 | 32,0 ± 6,49 | 45,0 ± 9,18 |
| % NAR | 78,0 ± 4,5 | 74,0 ± 4,5 | 72,5 ± 4,5 | 78,5 ± 4,92 | 67,2 ± 4,92 | 67,5 ± 4,92 | 69,5 ± 5,71 | 61,0 ± 5,71 | 59,0 ± 8,08 |

Promedio ± error estándar. Letras diferentes en la misma fila para el mismo parámetro indican diferencias significativas entre diluyentes. Igual N para todos los parámetros.

** no hay error estándar porque todas las medidas fueron iguales.

El macho 1 muestra diferencias significativas en las muestras congeladas con leche desnatada, cuyos promedios son menores que las congeladas con los otros dos diluyentes del estudio (**Tabla 5.13**).

Tabla 5.13. Promedio de parámetros de calidad seminal mediante evaluación microscópica subjetiva para **macho 1** en test de resistencia, según diluyente.

| Macho 1 | H0 | | | H2 | | | H5 | | |
|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | THILM. | LECHE | IMIDA | THILM. | LECHE | IMIDA | THILM. | LECHE | IMIDA |
| MI | 3,9 ^a ± 0,2 (N=6) | 3,8 ^a ± 0,1 (N=6) | 4,4 ^b ± 0,1 (N=6) | 3,9 ± 0,22 (N=6) | 3,8 ± 0,22 (N=4) | 4,4 ± 0,15 (N=6) | 3,6 ± 0,48 (N=3) | 3,3 ± 0,39 (N=3) | 4,0 ± 0,25 (N=4) |
| % MOT | 65,0 ^a ± 8,1 | 37,5 ^b ± 8,1 | 74,1 ^a ± 5,8 | 66,2 ^a ± 8,44 | 48,1 ± 8,44 | 65,6 ± 5,97 | 60,0 ± 13,0 | 25,0 ± 10,62 | 48,6 ± 6,95 |
| TV (% vivos) | 71,7 ^a ± 9,1 | 39,4 ^b ± 8,2 | 67,8 ^a ± 6,5 | 64,5 ^{a,b} ± 7,71 | 43,0 ^a ± 7,71 | 66,2 ^b ± 5,83 | 67,0 ^{a,b} ± 13,18 | 34,3 ^b ± 10,76 | 48,7 ^a ± 7,05 |
| % NAR | 75,8 ^a ± 6,6 | 60,2 ^b ± 5,9 | 76,2 ^a ± 4,7 | 74,0 ^a ± 6,94 | 57,2 ^b ± 6,94 | 75,9 ^a ± 5,24 | 72,5 ± 12,44 | 51,7 ± 10,15 | 53,6 ± 6,65 |

Promedio \pm error estándar. Letras diferentes en la misma fila para el mismo parámetro indican diferencias significativas entre diluyentes. Igual N para todos los parámetros.

El macho 2 repite lo mencionado en el apartado de evaluación por CASA, respecto a la poca resistencia en el tiempo de sus muestras al ser congeladas con el diluyente de leche desnatada. Solo una muestra de las 6 evaluadas llegó a H2 y H5. Los diluyentes Thilmant e IMIDA ofrecen resultados sin diferencias significativas para este macho (**Tabla 5.14**).

Tabla 5.14. Promedio de parámetros de calidad seminal mediante evaluación microscópica subjetiva para el **macho 2** en test de resistencia, según diluyente.

| Macho | H0 | | | H2 | | | H5 | | |
|-----------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------|---------------------------------|
| | THILM. | LECHE | IMIDA | THILM. | LECHE | IMIDA | THILM. | LECHE | IMIDA |
| 2 | | | | | | | | | |
| MI | 4,0 \pm 0,2 (N=6) | 3,7 \pm 0,3 (N=6) | 4,1 \pm 0,2 (N=6) | 4,0 \pm 0,26 (N=5) | *4,0 (N=1) | 4,4 \pm 0,16 (N=4) | 3,5 \pm 0,22 (N=2) | *3,75 (N=1) | 4,2 \pm 0,18 (N=2) |
| % MOT | 55,6 \pm 12,3 | 65,0 \pm 18,1 | 62,7 \pm 9,0 | 43,3 ^{a,b} \pm 10,25 | *37,5 ^a | 65,6 ^b \pm 6,28 | 10,0 ^a \pm 3,63 | *20,0 ^a | 60,8 ^b \pm 2,96 |
| TV (% vivos) | 61,9 \pm 7,1 | 53,0 \pm 10,0 | 63,6 \pm 5,0 | 62,7 ^a \pm 7,81 | *32,0 ^b | 55,5 ^a \pm 5,12 | 47,5 ^a \pm 5,59 | *12,0 ^b | 53,2 ^a \pm 4,57 |
| % NAR | 74,5 ^a \pm 7,6 | 56,0 ^b \pm 10,8 | 65,8 ^a \pm 5,34 | 81,7 ^a \pm 10,71 | *45,0 ^b | 63,9 ^{a,b} \pm 7,57 | 82,0 ^a \pm 1,88 | *62,0 ^b | 70,9 ^b \pm 1,54 |

Promedio \pm error estándar. Letras diferentes en la misma fila para el mismo parámetro indican diferencias significativas entre diluyentes. Igual N para todos los parámetros. *solo 1 medida.

En cuanto al macho 3, también arroja los promedios más bajos cuando se utilizó el diluyente de leche desnatada, siendo significativamente inferiores los parámetros de TV y % NAR con este diluyente, sin embargo, la resistencia en el tiempo fue menor con el diluyente Thilmant, ya que no se obtuvo ningún eyaculado de este macho y diluyente a H5 (**Tabla 5.15**).

Tabla 5.15. Promedio de parámetros de calidad seminal mediante evaluación microscópica subjetiva para el **macho 3** en test de resistencia, según diluyente.

| Macho 3 | H0 | | | H2 | | | H5 | | |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------|------------------------------|-----------------------------|
| | THILM. | LECHE | IMIDA | THILM. | LECHE | IMIDA | THILM. | LECHE | IMIDA |
| MI | 4,1 ± 0,2 (N=6) | 4,1 ± 0,2 (N=6) | 3,95 ± 0,1 (N=6) | 3,8 ± 0,14 (N=5) | 3,9 ± 0,17 (N=4) | 3,7 ± 0,12 (N=5) | - | **3,75 ^a (N=2) | **3,5 ^b (N=2) |
| % MOT | 65,8 ± 9,3 | 58,7 ± 11,4 | 57,5 ± 7,2 | 46,7 ± 15,0 | 47,5 ± 18,4 | 45,6± 13,0 | - | 38,7 ^a ± 0,88 | 50,0 ^b ± 0,88 |
| TV (% vivos) | 68,3 ^a ± 8,0 | 28,5 ^b ± 9,8 | 50,2 ^a ± 6,2 | 63,7 ^a ± 9,8 | 21,0 ^b ± 16,98 | 55,5 ^{a,b} ± 12,0 | - | 17,5 ^a ± 6,70 | 58,5 ^b ± 6,70 |
| % NAR | 76,2 ^a ± 11,7 | 42,5 ^b ± 14,3 | 50,7 ^b ± 9,0 | 76,0 ^a ± 10,56 | 33,0 ^b ± 18,3 | 61,0 ^a ± 12,93 | - | 40,5 ^a ± 3,65 | 68,5 ^b ± 3,65 |

Promedio ± error estándar. Letras diferentes en la misma fila para el mismo parámetro indican diferencias significativas entre diluyentes. Igual N para todos los parámetros.

** no hay error estándar porque todas las medidas fueron iguales.

Después de dos horas de descongelación, los diluyentes Thilmant e IMIDA mostraron, en general, promedios más altos que el diluyente de leche desnatada y proporcionaron un mayor número de eyaculados.

Cinco horas después de la descongelación, el diluyente IMIDA mantuvo los espermatozoides móviles en una mayor cantidad de muestras que los otros dos diluyentes, con promedios más altos en algunos casos. En aquellos que fueron superados por el diluyente Thilmant, las diferencias no fueron significativas.

Teniendo en cuenta todos los promedios de los parámetros evaluados (% MOT, tipo de movimiento y progresión) junto con la resistencia en el tiempo, se determinó que el diluyente IMIDA era el más adecuado para la congelación de semen de caprino.

5.4 Experimento 4: Diferencias en la salida en celo y en las alteraciones vaginales provocadas por dos métodos de sincronización de estro en caprino y su relación con la fertilidad en los dos ciclos siguientes

Las hembras reproductoras presentaron síntomas de celo a las 30 y/o a las 48 h de la retirada del dispositivo intravaginal, siendo evidente por la aceptación del macho con mandil. En el grupo 1, sincronizado con esponjas impregnadas en progestágeno + cápsula de Lp, un total de 11 hembras mostraron celo en algún momento de la evaluación (9 a las 30 h y 8 a las 48h). Tres lo mostraron solo a las 30 horas, pero no a las 48 h, mientras que 2 lo mostraron solo a las 48h y no a las 30 h. Seis hembras mostraron celo en ambas evaluaciones, mientras que 2 no salieron en celo en ningún momento (**Tabla 5.16**).

En el grupo 2, cabras sincronizadas con CIDR® impregnado en progestágeno + cápsula de Lp, 14 hembras mostraron celo en alguna evaluación, mientras que solo 1 hembra no salió en celo ni a las 30 ni a las 48 h. Dos hembras no presentaron celo a las 30 h, pero sí a las 48 h, y 4 hembras sí presentaron celo a las 30 h pero no cuando se las volvió a evaluar a las 48 h.

El grupo control (esponja de FGA sola) mostró celo las dos veces que se presentaron las hembras al macho cabrío (**Tabla 5.16**).

Tabla 5.16. Número y porcentaje (%) de cabras que presentaron celo a las 30 y 48 h tras la retirada de los dispositivos intravaginales en cada grupo.

| Sincronización de celos | Grupo 1 | | Grupo 2 | | Grupo Control | |
|-------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|---------------|----|
| | SI | NO | SI | NO | SI | NO |
| Celo a las 30 h | 9 (69,2) | 4 (30,7) | 12 (80) | 3 (2) | 4 (100) | - |
| Celo a las 48 h | 8 (61,5) | 5 (38,4) | 10 (66,6) | 5 (33,3) | 4 (100) | - |

Los resultados de pH del flujo vaginal muestran diferencias en cada uno de los grupos a los que se aplicaron los 50 millones de UFC de Lp y el grupo control. Siendo los valores promedio de $6,97 \pm 0,49$, $6,77 \pm 0,48$ y $7,27 \pm 0,15$ (**Figura 5.9**), para los grupos 1, 2 y control, respectivamente. Estos datos indican valores cercanos a la neutralidad, aunque en el caso de los grupos con Lp el pH es ligeramente ácido, mientras que en el grupo control fue un pH tendente a la alcalinidad.

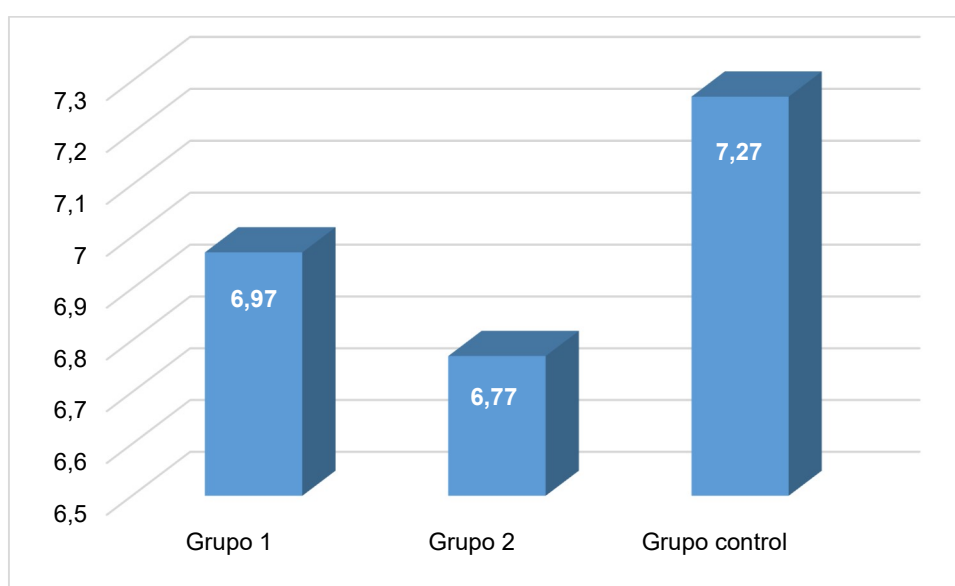


Figura 5.9. pH promedio de cada uno de los grupos.

El aspecto del flujo vaginal también fue estimado, presentando flujo sanguinolento en cuatro cabras del grupo 1 y tres del grupo 2. El grupo control no presentó flujo sanguinolento.

Del conjunto de leucocitos presentes en sangre destacan los neutrófilos y los linfocitos, los primeros se corresponden con la defensa innata del individuo, por lo que tienen importancia en la respuesta al cuerpo extraño que representan las cabras con dispositivos intravaginales durante diez días, el grupo control fue el que presentó mayor porcentaje de neutrófilos en sangre. En cuanto al número de linfocitos, fue mayor en el grupo 2, aunque este parámetro está menos relacionado con la respuesta a la inflamación localizada (**Tabla 5.17**)

Tabla 5.17. Promedio de porcentaje de leucocitos (neutrófilos y linfocitos) en las muestras sanguíneas de las hembras de cada grupo.

| Parámetros | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo Control |
|-----------------|---------|---------|---------------|
| Neutrófilos (%) | 59,5 | 52,9 | 63,7 |
| Linfocitos (%) | 33,6 | 40,1 | 30,6 |

Pasado el tiempo correspondiente al segundo ciclo sexual, el grupo 1 presentó 8 cabras con imagen ecográfica positiva a la gestación (61,5%), de estas 8 cabras, 3 quedaron gestantes en el primer ciclo tras la retirada del dispositivo intravaginal y 5 cabras en el segundo ciclo. El grupo 2 presentó 12 cabras gestantes (80%), de las cuales 5 cabras quedaron gestantes en el primer ciclo tras la retirada y 7 cabras en el 2º ciclo. El grupo control presentó 3 cabras positivas con imagen ecográfica a la gestación (75%), todas se observaron preñadas en el 2º ciclo tras la retirada de esponjas. Tras el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los valores analizados (**Tabla 5.18** y **Figuras 5.9** y **5.10**).

Tabla 5.18. Resultados de los 3 lotes en los valores de pH, % de flujo alterado, % de salida en celo a las 48 h y % de fertilidad (promedio \pm desviación estándar).

| | pH | % flujo sanguinolento | % salida en celo tras 48 h | % cabras gestantes tras 3 ciclos |
|---------------|-----------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------------|
| Grupo 1 | 6,97 \pm 0,49 | 30,8 | 84,6 | 61,5 |
| Grupo 2 | 6,77 \pm 0,48 | 20 | 93,3 | 80 |
| Grupo Control | 7,27 \pm 0,15 | 0 | 100 | 75 |

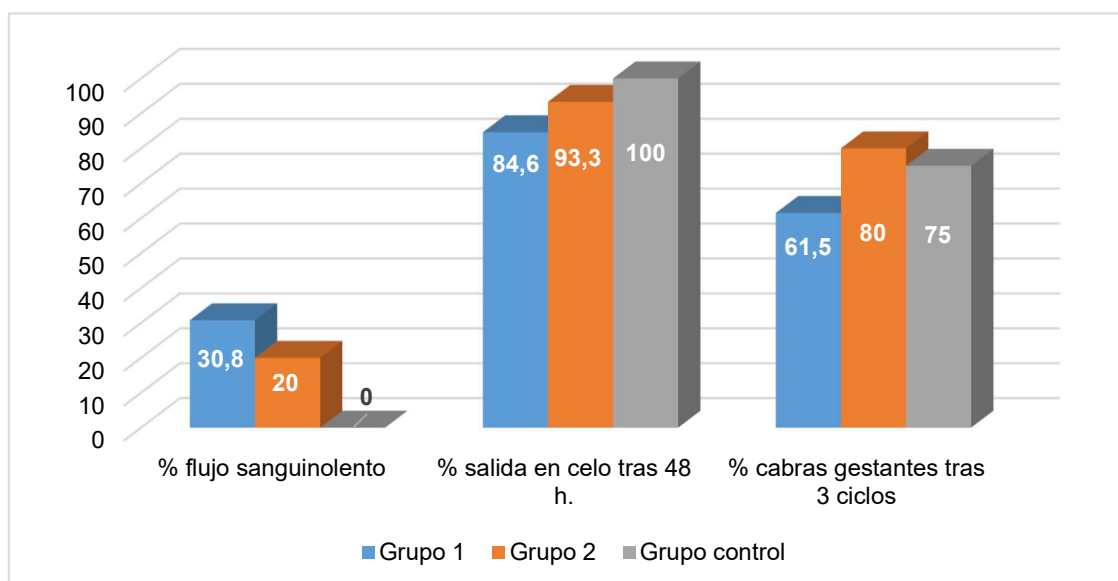


Figura 5.10. Comparación de los diferentes promedios de cada parámetro por grupo.

5.5. Experimento 5: Utilización del probiótico intravaginal *Lactobacillus plantarum*, cepa I1001 para prevenir las alteraciones vaginales derivadas del uso de esponjas intravaginales en programas de sincronización de estros y elevar la tasa de fertilidad

Las mediciones de pH del flujo vaginal en el grupo de hembras a las que se les puso el probiótico Lp intravaginal arrojaron promedios entre $6,83 \pm 0,41$ y $7,19 \pm 0,26$. El valor mínimo de 6,83 se detectó tras 9 semanas consecutivas introduciendo los probióticos intravaginalmente, el día de la retirada de las esponjas. Dos días después, el día de la IA el pH ascendió hasta $6,97 \pm 0,32$. El valor máximo de pH se detectó antes de introducir los probióticos, y fue alternando semanas de disminución con otras en las que se elevaba el promedio. Los test estadísticos no arrojaron diferencias significativas en la variación del pH, aunque sí hay una ligera tendencia a la acidificación tras la introducción continuada de bacterias del ácido láctico.

En el grupo control, las medidas se realizaron antes de la puesta de esponjas (promedio de $7,13 \pm 0,33$), el día de la retirada de las mismas ($\text{pH} = 6,85 \pm 0,40$) y el día de la IA ($\text{pH} = 7,1 \pm 0,34$). Las diferencias tampoco fueron significativas,

aunque se observa una acidificación de pH vaginal cuando se retiraron las esponjas. Este pH se recuperó tras 48 horas sin esponja intravaginal.

La **tabla 5.19** nos muestra los promedios de pH a lo largo de las semanas de estudio en el grupo con Lp intravaginal, mientras que en la **tabla 5.20** se detallan los promedios del grupo control.

Tabla 5.19. Promedio de pH del flujo vaginal \pm desviación estándar en cada semana del estudio de las hembras del grupo Lp (n= 15).

| Semana | pH |
|--|-----------------------------------|
| Semana 0 (antes de la 1ª puesta de Lp) | 7,19 \pm 0,26 |
| Semana 1 | 7,08 \pm 0,38 |
| Semana 2 | 6,92 \pm 0,32 |
| Semana 3 | 7,06 \pm 0,36 |
| Semana 4 | 7,13 \pm 0,37 |
| Semana 5 | 6,90 \pm 0,36 |
| Semana 6 | 6,93 \pm 0,34 |
| Semana 7 | 6,97 \pm 0,32 |
| Semana 8 (se coloca esponja FGA) | 6,89 \pm 0,45 |
| Semana 9 (se retira esponja, no se pone Lp) | 6,83 \pm 0,41 |
| Día de IA | 6,97 \pm 0,32 |

Tabla 5.20. Promedio de pH del flujo vaginal \pm desviación estándar de las hembras del grupo control (n= 15).

| Día de medida | pH |
|--------------------------|-----------------|
| Se coloca esponja de FGA | 7,13 \pm 0,33 |
| Se retira la esponja | 6,85 \pm 0,40 |
| Día de la IA | 7,1 \pm 0,34 |

En cuanto al número de hembras gestantes detectado mediante ecografía se obtuvo lo siguiente:

- *Grupo Lp*: de las 15 hembras de este grupo, 3 resultaron positivas en gestación en ecografía realizada 33 días post-IA y fueron confirmadas en día 47. De estas 3 cabras, 2 sufrieron reabsorción embrionaria, pues en una nueva revisión ecográfica en día 82 post-IA no se visualizó feto en crecimiento. La tercera hembra sí continuó con una gestación normal. Consideramos una tasa de fertilidad del 20% (3 de 15).

- *Grupo control*: se obtuvo mediante ecografía en día 32 post-IA 3 hembras gestantes. En una nueva revisión, 67 días tras IA, 1 de las hembras diagnosticadas como gestantes fue dada como vacía, mientras que una de las negativas en día 32 resultó ser positiva en día 67. Las otras dos fueron diagnosticadas como gestantes en ambas revisiones. La tasa de fertilidad en este caso fue de 26,67% (4 de 15).

5.6. Experimento 6: Comparación de 2 métodos de diagnóstico de gestación: evaluación ecográfica endovaginal y cuantificación de progesterona sérica

5.6.1. Evaluación ecográfica

En día 18, se pudo visualizar en algunas hembras la primera imagen anecogénica que podría corresponder a la vesícula embrionaria (**Figura 5.11**). No obstante, todavía la imagen era confusa y generaba dudas para dar un diagnóstico certero de gestación. Además, no era posible localizarla en todas las hembras que resultaron gestantes.

En día 23, la vesícula embrionaria se detectó en las hembras que resultaron gestantes (**Figura 5.12**), aunque el diagnóstico era menos claro en algunas de las que resultaron vacías, pudiendo incluirse como preñadas hembras que resultaron no estarlo.

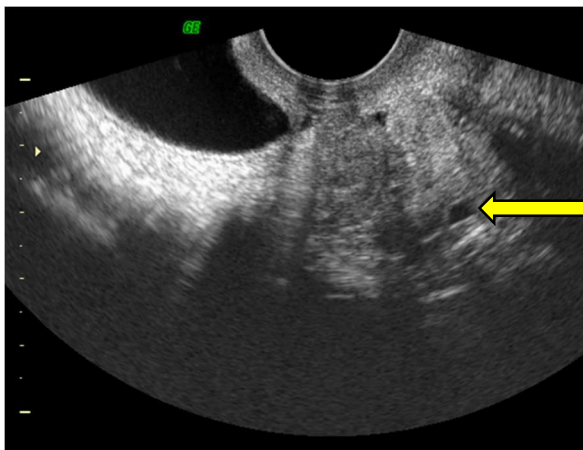


Figura 5.11. Primer esbozo de vesícula embrionaria en día 18 de gestación (flecha amarilla).

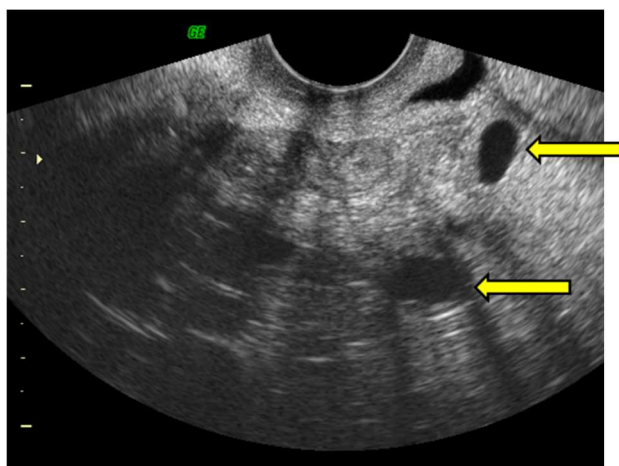
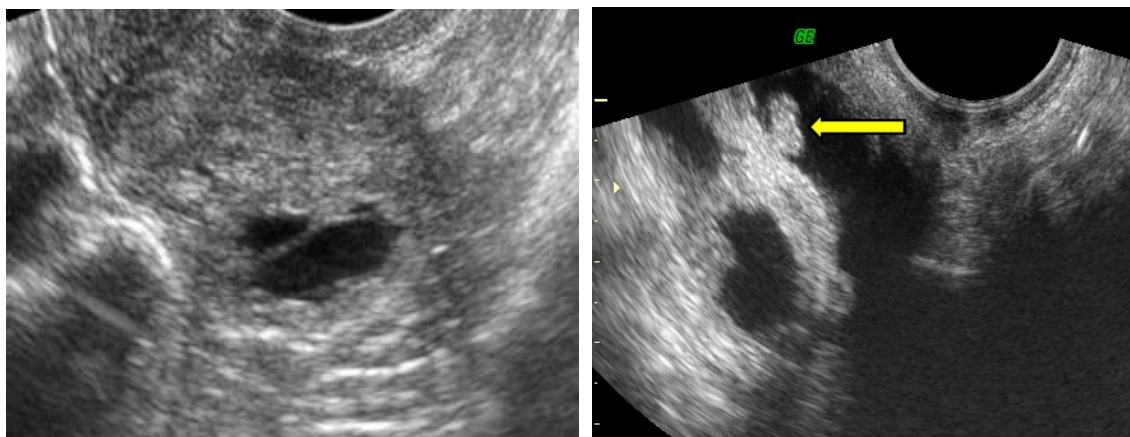


Figura 5.12. Vesículas embrionarias identificables en día 23 (flechas amarillas).

En día 25 ya no hubo error, la vesícula fue localizada en el 100% de los casos (**Figura 5.13**), intuyéndose el embrión en su interior (**Figura 5.14**). Todas las hembras preñadas fueron identificadas en día 25, aunque se clasificaron como dudosas 5 hembras que finalmente resultaron vacías en la ecografía realizada en día 30. Las 5 evaluaciones dudosas en día 25 muestran un porcentaje de aciertos del 84,4%, mientras que en el día 30 fue del 100% (**Figura 5.15**).



Figuras 5.13 y 5.14. Vesículas embrionarias visibles en día 25. En algunas hembras ya es visible el embrión (flecha amarilla).



Figura 5.15. Embrión caprino.
Día 30.

5.6.2. Análisis hormonal

Se realizaron 18 determinaciones de la concentración de P4 sérica. El día de la IA, los valores de P4 fueron <1 ng/ml en todas las hembras excepto en dos, que mostraron valores de 1,97 ng/ml y 1,78 ng/ml.

Todas las cabras que resultaron gestantes mostraron en día 21 post-IA concentraciones de P4 superiores a 7,86 ng/ml (valores comprendidos entre 12,17 - 20,24 ng/ml). Hubo 2 cabras con valores de P4 sérica > 10 ng/ml, pero que mostraron imagen negativa a la gestación en día 30. Estos resultados nos

indican que la medición de la P4 en día 21 post-IA tuvo un porcentaje de aciertos del 88,9%.

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

La técnica reproductiva denominada IA puede parecer sencilla en la práctica, pero engloba un conjunto de conocimientos teóricos y procesos prácticos que pueden ser determinantes a la hora del éxito o fracaso de la misma. Es una técnica multifactorial, con diversos puntos de susceptibilidad o mejora sobre los que actuar para obtener un resultado exitoso, que será conseguir animales recién nacidos vivos y sanos.

En esta Tesis se ha considerado que esos puntos susceptibles de actuación comienzan incluso antes que la propia inseminación, con una recogida seminal que proporcione semen de elevada calidad. Así, el ensayo de recogida seminal con varios estímulos sexuales y el de la calidad seminal a distinta edad de los machos cabríos, pretende, por un lado, determinar desde qué momento de la vida del macho su eyaculado es válido para ser utilizado en un programa de IA, y por otro, mejorar el bienestar del animal utilizado como estímulo sexual.

Conocer los meses a los que un macho cabrío puede ser utilizado como semental permitirá alargar la vida reproductiva de ese ejemplar, y si el eyaculado se recoge sin la utilización de una hembra estrogenizada, además proporcionará un mayor bienestar animal, por no necesitar el estímulo hormonal continuo de una hembra caprina del rebaño.

6.1. Experimento 1: Recogida de semen caprino con tres estímulos sexuales diferentes. Libido y calidad seminal del eyaculado

El experimento 1 mostró que la recogida seminal de calidad óptima es posible sin la utilización de una hembra estrogenizada, ya que puede lograrse utilizando como estímulo sexual un macho. La capacidad de servicio tampoco se afectó cuando el señuelo fue un macho y sorprendió que no ocurriera la extrañeza del cambio de sexo en el estímulo presentado. Tampoco este cambio ocasionó que machos jóvenes agredieran al macho sujeto al potro. Simplemente,

saltaron sobre el macho utilizado como señuelo como si de una hembra se tratara. No presentaron signos de comportamiento sexual previo a la monta, con excepción de los que lo hacían cuando el estímulo era la hembra.

Es posible que la mejora en la calidad seminal con respecto al periodo de entrenamiento fuera debida al aumento de la edad de los machos en estudio (eran varios meses menores cuando se les entrenó con la hembra que cuando se les estudió con ambos estímulos) ya que, como también encontraron otros autores, la calidad y la concentración mejoran con el aumento de edad de machos jóvenes (Zubieta, 1990; Roca *et al.*, 1991a). Ocurre lo mismo en otras razas como son Jamunapari (Shina *et al.*, 1981), Mancha (Muhuyi *et al.*, 1982) y Nubiana (Skalet *et al.*, 1988), y no parece estar influida por el sexo del animal utilizado como señuelo.

Los resultados fueron diferentes al utilizar un maniquí como estímulo sexual. El primer cambio que se apreció fue que la mayoría de los machos no saltaban ni eyaculaban sobre el maniquí. Solo 3 machos saltaron regularmente sobre él, mientras que 6 solo lo hicieron en una o dos ocasiones. Un macho no saltó nunca sobre el maniquí, el mismo que tampoco lo hacía al utilizar otro macho. Este ya es el primer inconveniente de este estímulo sexual, ya que lógicamente, el señuelo utilizado debería conseguir excitar a todos los machos donantes.

En cuanto al TR, éste se incrementó significativamente con respecto al obtenido al utilizar una hembra. Si consideramos el promedio de los machos que saltan, tanto con hembra como con maniquí, la diferencia se elevó de los 17,6 s de promedio que tardaron en montar a la hembra hasta los 51,6 s que transcurrieron hasta montar al maniquí. Este incremento de tiempo indica una menor excitación por parte de los machos que puede deberse a la ausencia de estímulos olfativos provenientes del maniquí. El macho cabrío realiza la búsqueda y contacto con la hembra en estro usando señales olfatorias y pasa gran parte del tiempo olfateando el tracto genital y la orina de la misma. Las señales olfativas pueden ser transportadas al cerebro para llegar a los centros

que controlan la actividad de GnRH por medio de dos vías: 1) a partir de la mucosa olfativa y el bulbo olfatorio principal, 2) o mediante el órgano vomeronasal y el bulbo olfatorio accesorio. En ovino, ambos sistemas podrían estar involucrados en el comportamiento sexual, aunque en caprino no se conocen las vías de activación de este comportamiento (Nowak *et al.*, 2008; Delgadillo *et al.*, 2009). Se sabe que en mamíferos las feromonas son detectadas a través del órgano vomeronasal, que se encuentra en el interior de la cavidad nasal y conecta mediante terminaciones nerviosas con el hipotálamo, donde se despiertan las sensaciones de placer (Izquierdo *et al.*, 2002). El macho responde con una conducta conocida como *flehmen*, que se basa en olores no volátiles en el órgano vomeronasal para su detección por el sistema olfatorio accesorio (Cervantes *et al.*, 2014). En ausencia de este estímulo olfatorio, al utilizar el maniquí se altera el comportamiento sexual normal que tendría ese macho, dando como resultado la ausencia de monta en muchos casos o en aquellos en los que finalmente ocurre, es necesario un mayor tiempo.

Al considerar el promedio del TR de todos los machos cuando se utiliza la hembra, este fue de 35,1 s, pero esta diferencia se debe al macho en estudio y la variabilidad en los tiempos de reacción que presentan entre ellos, no al estímulo sexual utilizado.

El volumen de eyaculado y la concentración total de espermatozoides fueron también significativamente inferiores al utilizar el maniquí con respecto al uso de la hembra. Esto también podría estar relacionado con el nivel de excitación del macho. Existen estudios, sobre todo en el hombre, que correlacionan una mayor excitación sexual con algunos parámetros de calidad seminal. Por ejemplo, en humanos, Pound *et al.* (2002) correlacionaron positivamente el tiempo de excitación sexual con la concentración espermática y Elzanaty & Malm (2008) encontraron mayor concentración espermática, motilidad total y progresiva en muestras seminales recogidas en casa, frente a aquellas obtenidas en la clínica, lo que podría relacionarse con el nivel de excitación obtenido en cada uno de estos lugares. Recientemente, Stimpfel *et al.* (2021) también encontraron

concentraciones de espermatozoides significativamente inferiores y menor motilidad en muestras obtenidas en clínica, pero no diferencias en el número de espermatozoides totales, volumen seminal o morfología.

Estudios en reproducción humana y bovina coinciden en que una mayor excitación sexual contribuiría a aumentar la calidad del eyaculado. La explicación fisiológica sería que ocurre una mayor vascularización de las glándulas que producen el líquido seminal, las vesículas seminales y la próstata, favoreciéndose una eyaculación completa que se traduciría en el aumento del número de espermatozoides del eyaculado y del volumen de este. (institutomarques.com; Rivera & Trujillo, 1990).

Los parámetros de MI y de % MOT no fueron diferentes al utilizar ambos estímulos sexuales, por lo que parece ser que estos factores son intrínsecos al ejemplar y no dependen del grado de excitación del mismo, y por tanto, tampoco del estímulo sexual.

Sería interesante estudiar si los resultados obtenidos al utilizar el maniquí podrían ser mejorados si se utilizara junto algún fluido biológico (fluido folicular, cargado de estrógenos, orina de hembra o incluso semen de otro macho) que influyera en la excitación de los machos donantes.

6.2. Experimento 2: Comportamiento sexual y calidad seminal del macho cabrío MG en distintas edades

La edad a la que un macho cabrío puede ser incluido en un programa de reproducción dependerá de su calidad seminal y de su capacidad de servicio. Esto último tendrá mayor importancia si es utilizado en monta natural, pero también facilitará la recogida seminal para utilizarla en IA (es preferible el uso de un macho que eyacule en la VA con regularidad y con tiempos cortos de reacción). La calidad seminal, la capacidad de servicio y la precocidad en la

llegada a la pubertad son factores que van a determinar el valor de un macho cabrío como reproductor.

En relación con la llegada a la pubertad, se ha publicado que depende de la raza y la condición corporal del animal. García *et al.* (2007) han publicado que los machos de la raza Alpino presentan la pubertad a los 6,5 meses, mientras que en los machos Criollos del subtrópico mexicano es a los 4,3 meses (evaluada ésta como la aparición de la primera célula espermática viable) y machos Nubio de Alabama (EEUU), la iniciaban a los 4,5 meses (Skalet *et al.*, 1988).

Los machos de raza MG evaluados mostraron capacidad de monta desde los 4,5 meses de edad, pero sin espermatozoides viables hasta los 5,5-6 meses de vida, aunque se observó gran variabilidad entre ejemplares (uno de ellos ya eyaculó espermatozoides viables a los 3,5 meses), tanto en comportamiento como en calidad seminal. Uno de los machos jóvenes igualaba a los 6 meses en motilidad individual y porcentaje de espermatozoides móviles a los mayores de un año, aunque presentó menor volumen de eyaculado y concentración espermática, y entre los 7-8 meses de edad, 4 machos jóvenes presentaron una calidad seminal óptima para IA y regularidad en la monta a la hembra. Hubo tres machos de edades entre 6 y 8 meses que todavía no mostraron una monta regular.

En todos los rangos de edad estudiados se observó una fuerte variabilidad individual entre los distintos machos, por lo que es conveniente conocer las características individuales de cada ejemplar antes de seleccionarlo como reproductor, de acuerdo con lo publicado por Pérez (1992). El número de saltos realizados por los machos de más de 5 años fue insuficiente para su mantenimiento en programas de IA y testaje, por lo que la edad óptima para la producción de semen estaría por debajo de los 5 años y por encima de los 4,5 meses.

Según Evans & Maxwell (1987), para realizar una IA, un eyaculado debe tener una concentración espermática no inferior a 2.500×10^6 esp/ml, por lo que con nuestros resultados podría utilizarse el primer eyaculado de los machos menores de un año, similar a lo referido por Roca *et al.* (1991b) quienes publicaron que machos de 9-10 meses de edad eran aptos para ser usados en programas reproductivos, aunque en el presente estudio la edad de los machos para entrar en programas de testaje disminuye entre los 6,5-8 meses. En machos de edad superior podía utilizarse hasta el 4º eyaculado de la mañana. Los parámetros de MI y % MOT no fueron significativamente diferentes entre machos jóvenes y de más edad, lo que también los hace aptos para su uso en programas de reproducción. Los valores obtenidos para la MI y la concentración total de espermatozoides para machos menores y mayores de 1 año resultan acordes con los encontrados por Roca *et al.* (1991b).

Las circunstancias ambientales también parecen afectar a la producción de semen, y más concretamente durante el tiempo de estío, observándose una disminución de la calidad en cuanto al número de espermatozoides vivos y su calidad de movimiento (en la **Tabla 5.5**, en machos con 9 y 10 meses se aprecia esta bajada en la calidad que coincide con los meses de verano). Aunque coincidimos con Zarazaga *et al.* (2003) y otros autores, en que el periodo de luz-oscuridad en la raza MG no influye en la producción seminal, las altas temperaturas del estío (en los meses de julio y agosto de 2019 se registraron temperaturas medias de 28,5 y 27,9°C, respectivamente, llegándose a alcanzar temperaturas máximas de más de 38°C, incluso sobrepasando los 40°C) sí han producido disminución de calidad (Pérez, 1992), si las comparamos con las de septiembre y octubre que tuvieron una media de 23,8 y 19,8°C y cuyos máximos quedaron siempre por debajo de los 34°C (SIAM, IMIDA). Especialmente afectados por las elevadas temperaturas estivales se vieron dos machos jóvenes, lo que hizo disminuir tanto el promedio de MI como % MOT.

En cuanto a las diferencias en los tiempos de reacción, inferiores en machos jóvenes, son debidas a la falta de actos de cortejo, o a la brevedad de estos.

Algunos autores achacan a la inexperiencia de los machos jóvenes y la competencia con machos adultos la falta de las pautas en el comportamiento sexual previo a la monta (Ungerfeld & González, 2009; Orihuela, 2014). Machos dominantes, de mayor corpulencia y fortaleza que los jóvenes pueden atacar a estos últimos si le dedican un tiempo considerable al cortejo previo a la monta, perdiendo los machos jóvenes la posibilidad de montar a las hembras del conjunto del rebaño, por lo que la estrategia de estos machos sería la rapidez en la cópula, limitando al mínimo o incluso ignorando el tiempo de cortejo.

6.3. Experimento 3: Diseño de un protocolo de congelación seminal caprina, mediante la adaptación de un protocolo utilizado en la especie porcina, y de un diluyente seminal que proporcione elevada calidad seminal post-descongelación

Una vez obtenida una muestra seminal de calidad, ésta aumenta su valor si somos capaces de preservarla en el tiempo. La criopreservación de gametos masculinos proporciona enormes beneficios y facilita el proceso de IA, como se ha comentado en las ventajas de la criopreservación de semen de la introducción, pero sin olvidar que durante el proceso de congelación-descongelación perderemos gran cantidad de células espermáticas, por los daños causados sobre las mismas (Watson, 2000).

Disponer de un protocolo que permita llevar a cabo la congelación de semen caprino con una elevada calidad espermática tras su descongelación es imprescindible para que la técnica de la IA siga creciendo.

Numerosos factores influyen en la calidad seminal tras la descongelación, como el diluyente utilizado, el protocolo de dilución y congelación o el procedimiento de evaluación (Hernández-Corredor, 2014). Por lo tanto, para que la IA tenga éxito con el semen congelado, debe existir un protocolo de congelación adecuado que utilice un diluyente que proporcione nutrientes y proteja a los espermatozoides permitiéndoles sobrevivir. Este diluyente también

debe ser sencillo de fabricar y, si es posible, económico. Además, es importante tener machos cuya calidad seminal después de la descongelación sea óptima.

En el presente experimento se evaluó la calidad post-descongelación de semen de diferentes machos de la raza MG, con edades similares, después de procesar su semen mediante criopreservación con 3 diluyentes diferentes.

Se observaron diferencias notables en los resultados, dentro de un mismo macho frente a los diferentes diluyentes. Destacar que en este experimento no se estudiaron las diferencias entre machos en el proceso de congelación. Lo que se pretendió fue estudiar la respuesta a la congelación con diferentes diluyentes, por lo que el análisis estadístico se centró en buscar diferencias significativas entre diluyentes y no entre machos, ya se hiciera con una mezcla de eyaculados de distintos machos, o congelando muestras de machos diferentes de forma individual.

Se pudo comprobar que el diluyente de leche desnatada fue en general el que produjo peores resultados, especialmente en los parámetros de motilidad total (MT) y motilidad progresiva (MP), y que la resistencia en el tiempo fue menor que con los otros dos diluyentes. Esto concuerda con otros autores como Carpio-Chuchuca (2015) en bovinos, quien también encontró diferencias significativas al utilizar un diluyente a base de leche o yema de huevo en MI, con el porcentaje de espermatozoides móviles disminuyendo del 80% al 72,5%, y el porcentaje de espermatozoides vivos después de descongelar del 82,5% con yema de huevo al 77,5% con leche desnatada. Cortés-López (2005) encontró diferencias en la MP del semen de macho cabrío, disminuyendo del 43,7% para el diluyente que contiene el 2% de yema de huevo al 35,25% para el diluyente de leche desnatada.

Utilizando el método tradicional de evaluación subjetiva, Valencia *et al.* (1994) informaron de valores de motilidad de los espermatozoides superiores al 59% después de la descongelación. Vallecillo *et al.* (2004) evaluaron la MI de

semen criopreservado con Triladyl con el 20% de yema de huevo, obteniendo un valor del 60,5% y Nava & Coronado (2010) obtuvieron el 38,6% y 35,3% de espermatozoides móviles con Tris y Triladyl, respectivamente. Konyali *et al.* (2013) evaluaron la MI utilizando el diluyente Tris a dos concentraciones de yema de huevo (2% y 20%) y una a base de leche desnatada, obteniendo valores del 58,2%, 70,1% y 69,7%, respectivamente.

Los resultados para % MOT en muestras recién descongeladas variaron de 57,5% a 74,1% para el diluyente IMIDA, 55,6% a 65,8% para el diluyente Thilmant y 37,5% a 65,0% para el diluyente de leche desnatada, dependiendo del macho. Estos resultados son levemente superiores a los encontrados por Vázquez *et al.* (2001) quienes, en la misma raza, reportaron un promedio de 3,6 en MI, 49,7% MOT, 55,3% de espermatozoides vivos con TV y 68,7% NAR.

Al observar los valores proporcionados por el sistema CASA, éstos son en su mayoría más altos que los que se encuentran en la literatura. Así, Tabarez-Rojas (2015) encontró en cabras de 1 año una MT promedio de 39,6% y MP de solo 14,2% después de utilizar un diluyente con el 15% de yema de huevo fresco en congelación. Hernández-Corredor (2014) obtuvo como mejores resultados 30,4% MT y 12,2% MP.

Los resultados mostraron que la mejor media de MT fue del 65,6% en el macho 1 congelado con el diluyente IMIDA, la media de MP para este macho y el diluyente fue del 43,8% en H0. Cuando se congeló una mezcla de eyaculados (pool), se logró el 71,8% de MT con el diluyente IMIDA, y un porcentaje de MP del 56,1% con este diluyente a H0. Con el resto de los diluyentes, los promedios oscilaron entre 18,3-56,7% MT y 10,4-36,7% MP en H0. Estos promedios disminuyeron con el tiempo, oscilando en H5 entre los valores de 13,7-62,3% para MT y 6,0-41,6% para MP. Destacar que no todos los eyaculados alcanzaron H5 con espermatozoides móviles.

Bravo *et al.* (2011), trabajando con moruecos, publicaron que los espermatozoides son móviles si su velocidad de VCL es superior a 20 $\mu\text{m/s}$, y clasifican a los espermatozoides como lentos, medios o rápidos según si su VCL es inferior a 45 $\mu\text{m/s}$, entre 45-75 $\mu\text{m/s}$ o superior a 75 $\mu\text{m/s}$. Para el experimento de la presente tesis se utilizaron estos mismos valores, solo se modificó la velocidad de los espermatozoides lentos que se bajó de 20 a 10 $\mu\text{m/s}$ (Tomás, 2007).

Muiño *et al.* (2006), para eyaculados bovinos, establecen velocidades más altas, considerando espermatozoides lentos con un VCL de 20-60 $\mu\text{m/s}$, media entre 60 y 110 $\mu\text{m/s}$ y espermatozoides rápidos que superan los 110 $\mu\text{m/s}$.

Con cualquiera de los dos métodos de evaluación, las muestras revelaron valores de VCL superiores a 110 $\mu\text{m/s}$ en todos los machos cuando se utilizó el diluyente IMIDA en muestras recién descongeladas. Solo el macho 2 no alcanzó esta velocidad con el diluyente de leche desnatada, y para el pool y para el macho 3, el VCL fue menor con el diluyente Thilmant. En todos los casos, el VCL superó los 100 $\mu\text{m/s}$ en promedio.

En cuanto a la resistencia en el tiempo, solo se obtuvieron eyaculados de todos los machos conteniendo espermatozoides móviles en H5 con el diluyente IMIDA. El macho 1 fue el único que continuó con una VCL media superior a 110 $\mu\text{m/s}$. El diluyente de leche desnatada obtuvo la VCL media más baja en H5 y el menor número de eyaculados que resistieron todas las horas de evaluación.

La resistencia en el tiempo es de gran importancia, porque eyaculados con muy buenos promedios pero que no resisten en el tiempo pueden ser incapaces de fecundar el ovocito si éste aún no está listo para ser fecundado en el momento de la IA. Sin embargo, si los espermatozoides permanecen viables, sin reaccionar y con movimiento progresivo entre 1 y 5 h después de la inseminación, aumentan las posibilidades de fecundación del óvulo. Esta mayor

resistencia proporcionada por el diluyente IMIDA en comparación con los otros dos diluyentes es también un factor de mejora de la calidad del semen.

Los promedios altos de VCL indican espermatozoides muy activos, pero no necesariamente progresivos. Los índices de linealidad (LIN) y rectitud (STR) se utilizan para determinar la progresión. LIN refleja la rectitud de la trayectoria de los espermatozoides y debe ser superior al 50% (Cox *et al.*, 2006). STR refleja la rectitud del movimiento. Para que un espermatozoide se considere progresivo, su STR debe superar el 80% (Tomás, 2007).

Los resultados promedio para estos índices están muy por encima de los valores mínimos de 50% y 80% en H0 (la única excepción es el macho 3 con el diluyente IMIDA, que tenía un STR de 78,3%). Estos buenos promedios se mantienen en el tiempo y son incluso superiores en muchas de las muestras que resisten hasta H2 y H5, por lo que parece que, tras un periodo de adaptación tras la descongelación, el movimiento de los espermatozoides comienza a ser más rectilíneo que en los espermatozoides recién descongelados.

Estos resultados muestran que efectivamente, el diluyente IMIDA que contiene SDS, proporciona promedios de calidad seminal post-descongelación similares e incluso superiores al diluyente Thilmant. La adición de este detergente aniónico ha mostrado ser beneficioso para la calidad de espermatozoides post-descongelación en diversas especies como en porcinos (Thilmant, 1997), en caninos (Stornelli *et al.*, 2001; 2002), bovinos (Arriola & Foote, 1987), caprinos (Aboagla & Terada, 2004) e incluso en felinos como el gato (Axnér *et al.*, 2004), usado junto a un diluyente con un 20% de yema de huevo. En la especie caprina, los ensayos realizados en esta Tesis muestran que proporciona también elevada calidad seminal tras la descongelación. Peña & Forsberg (2000) encontraron que este efecto beneficioso ocurría si el Equex era añadido inmediatamente antes de la congelación, mientras que su adición durante un periodo más prolongado, como durante el tiempo de calibrado, empeoraba los resultados. Sugirieron que una exposición prolongada al SDS

conferiría una excesiva fluidez de las membranas, que podría ser contraproducente. Axér *et al.* (2004) publicaron que el Equex tenía un efecto positivo en el porcentaje de acrosomas intactos inmediatamente tras la descongelación, pero que afectaba negativamente a la resistencia en el tiempo de los espermatozoides de gato mantenidos a 38°C tras ser descongelados. En los ensayos realizados en el experimento 3 no se ha visto que la exposición prolongada sea contraproducente ni que afecte a la resistencia en el tiempo, siendo al contrario, el diluyente conteniendo el SDS es el que mayor número de muestras mantuvo con espermatozoides viables durante todas las horas de evaluación. Estas diferencias podrían ser debidas a la especie utilizada o a la concentración de detergente empleada. En la especie caprina, Aboagla & Terada (2004) encontraron también este efecto beneficioso en la motilidad total y progresiva de espermatozoides congelados utilizando concentraciones entre 0.035 -0.1% de SDS. La concentración utilizada en el experimento 3 ha sido bastante superior, concretamente del 1% de SDS en el diluyente IMIDA, sin que se haya encontrado detrimento en la calidad seminal.

Hori *et al.* (2006) estudiaron en espermatozoides caninos si existían diferencias al usar SDS solo o contenido en *Orvus Es Paste* y concluyeron que ambos tenían el mismo efecto protector, utilizándolos en la concentración adecuada para esa especie. Nuestros resultados tampoco encontraron diferencias significativas en la mayoría de los promedios que utilizaron el SDS de forma aislada (diluyente IMIDA) con respecto al que lo contenía como *Orvus Es Paste* (diluyente Thilmant).

Además, tras la evaluación microscópica de las muestras, se encontró que éstas se veían con mayor claridad al utilizar el diluyente IMIDA que al usar el diluyente Thilmant, visualizando las células espermáticas de forma individual, lo que facilita su evaluación, sobre todo para la calificación de MI y % MOT. Esta característica, unida a que el Equex STM® es un producto viscoso y difícil de manejar, además de su menor precio, confiere ventajas a la utilización del SDS de forma aislada, con respecto a su uso contenido en algún producto comercial.

El protocolo de congelación Thilmant resultó adecuado para la criopreservación de semen de caprino, al menos en la experiencia *in vitro*, proporcionando los mayores promedios de calidad seminal cuando se utilizó junto con el diluyente IMIDA.

Los ensayos de IA con semen congelado con este protocolo y diluyente no han sido todo lo buenos que se esperaba. Las tasas de fertilidad que se obtuvieron al utilizar el semen así congelado en hembras sincronizadas mediante el uso de esponjas intravaginales impregnadas en FGA fueron bajas en los dos grupos de hembras caprinas evaluados en el experimento 5. Las tasas de fertilidad, tanto del grupo *Lactobacillus plantarum* (Lp) como del grupo control (20 y 26,67%, respectivamente) están por debajo de lo obtenido por otros autores que realizaron IA con semen criopreservado. Utilizando IA intrauterina con semen congelado, Dickson *et al.* (2001) registraron una fertilidad del 59,5% en cabras lecheras (Alpino francesa y Saanen), mientras que Karatzas *et al.* (1997) y Goonewardene *et al.* (1997) obtuvieron un 44,9% y 41,0%, respectivamente. Sería interesante averiguar si estos resultados se deben a la calidad seminal u otros motivos.

Los parámetros de calidad seminal evaluados, tanto de manera subjetiva como mediante sistema CASA, son óptimos y teniendo en cuenta sólo estos datos no parece que el semen utilizado sea el responsable de la baja fertilidad obtenida. Con relación a esto, un trabajo reciente de Mocé *et al.* (2022) estudió en la misma raza MG la correlación entre diversos factores que pueden influir en la tasa de fertilidad tras una IA y el éxito de la misma, concluyendo que, aunque parámetros como la motilidad espermática y la calidad de ese movimiento (trayectoria regular) influyen en el éxito de la IA, el poder predictivo de los parámetros individuales del semen con las tasas de concepción son bajos. Estos resultados parecen lógicos considerando la complejidad del proceso reproductivo y alto número de factores que pueden afectarle (calidad de la dosis espermática, edad de la hembra, número de partos previos, producción lechera

y cualquier eventualidad surgida en la sesión de realización de la IA (Mocé *et al.*, 2022).

En relación a los resultados del experimento 3 de esta Tesis, y a su relación con la baja tasa de concepción del experimento 5, hipotetizamos dos posibles causas. La primera es que se debe profundizar más en la calidad post-descongelación del semen utilizado. Quizá los parámetros de viabilidad, motilidad y estado del acrosoma son adecuados, pero estos no nos dan información sobre los daños que hayan podido ocurrir en el ADN contenido en cada espermatozoide.

Existen estudios que afirman que tras el proceso de criopreservación ocurre un aumento en la fragmentación del ADN espermático (Yildiz *et al.*, 2008; Berrios & Sánchez, 2011; Domínguez, 2014) y estas elevadas tasas de fragmentación de ADN tendrían como resultado que esos espermatozoides no fueran capaces de fecundar al ovocito, o que en el caso de hacerlo, la calidad embrionaria resultante fuera tan baja que ese embrión nunca llegara a implantarse o se detuviera en los primeros estadios de su desarrollo.

Algunos estudios en semen bovino como el de Arbaiza & Cabrera, (2021) encontraron que se producía un aumento del 3,19% de ADN fragmentado tras la descongelación, mientras que Khalil *et al.* (2018) obtuvieron un 4,9% de aumento. En porcino se ha documentado una gran variabilidad en el porcentaje de aumento de fragmentación que depende del verraco, oscilando entre el 0 y 20% (Martínez-Pastor, 2016). Por lo general, se considera un límite aceptable de fragmentación espermática si éste es inferior al 30% en humanos (Santiso-Brandariz, 2013), o del 20% en bovino (Arbaiza & Cabrera, 2021). Si el aumento en el porcentaje de fragmentación no alcanza estos límites, no tendría en principio que afectar significativamente el éxito reproductor de tales muestras descongeladas.

Serían interesantes estudios específicos de fragmentación de ADN espermático en las pajuelas que aún se conservan para evaluar si el grado es tan alto que probablemente impidió que se produjera la gestación. También comparar el grado de fragmentación de ADN de las muestras descongeladas con el que proporciona una muestra del mismo macho antes de su congelación, para determinar si es el proceso de congelación-descongelación lo que eleva la tasa de fragmentación, o esta es una característica intrínseca del macho utilizado.

La segunda hipótesis que se plantea es que la baja tasa de fertilidad sería debida a las hembras caprinas, las cuales tras haber sido sometidas previamente a repetidos ciclos de sincronización de celos con la utilización de eCG, habrían desarrollado anticuerpos anti-eCG que tendrían efectos adversos en la fertilidad de dicha cabra cuando se repite el tratamiento. Varios autores (Drion *et al.*, 2001; Simões, 2015) han estudiado que repetidas sincronizaciones utilizando eCG provocan un aumento en la respuesta inmune a esta hormona y que si la unión eCG-anticuerpos es mayor al 5% se retrasa la salida en estro más de 30 h tras la retirada de las esponjas (Baril *et al.*, 1996; Drion *et al.*, 2001). Se retrasa también el pico de LH y por tanto la ovulación, ocurriendo una desincronización entre el momento de realización de la IA y la ovulación, lo que conlleva tasas de preñez inferiores (Baril *et al.*, 1996). Mocé *et al.* (2022) encontraron que hembras que habían parido una sola vez, tenían mayor probabilidad de quedar gestantes que aquellas paridas 4 o más veces, sin aclarar cuales podrían ser las causas. Si existió sincronización hormonal en estas hembras con mayor número de partos, la explicación podría recaer en la producción de anticuerpos anti-eCG y su retraso en la ovulación. Para probar o descartar esta hipótesis sería necesario repetir el ensayo de IA con semen congelado con el protocolo y diluyente IMIDA, utilizando hembras que no hayan sido previamente sincronizadas con eCG.

Los otros tres experimentos de esta Tesis se centraron en la hembra caprina, concretamente en las alteraciones que los sistemas de sincronización de celos

producen a nivel vaginal y la repercusión que estas alteraciones pueden tener sobre la posterior fertilidad de las hembras, e intentaron probar si bacterias del ácido láctico utilizadas en la especie humana podían paliar en alguna medida estas alteraciones.

6.4. Experimento 4: Diferencias en la salida en celo y en las alteraciones vaginales provocadas por dos métodos de sincronización de estro en caprino y su relación con la fertilidad en los dos ciclos siguientes

En el experimento 4 se observa que las esponjas causan mayores porcentajes de animales con flujos purulentos y sanguinolentos que los CIDR[®], además de que esos daños a nivel del ambiente vaginal perduran durante más tiempo, traduciéndose en una tasa de fertilidad acumulada durante 3 ciclos menor que en el caso de los CIDR[®]. Las hembras con flujos sanguinolentos fueron también las que presentaron un pH de flujo vaginal superior a 7, ligeramente más alcalino que el conjunto, además de ser las hembras que menor porcentaje de salida en celo mostraron (no fueron montadas por el macho ni a las 30 ni a las 48 h tras la retirada del dispositivo intravaginal). El rechazo a la monta por parte del macho podría deberse también a que las alteraciones ocasionadas en el ambiente vaginal disminuirían la atractividad sexual de esa hembra hacia el macho (Gatti, 2010; Olivera, 2011; Gatti & Ungerfeld, 2012).

En este experimento, los animales que portaron la esponja vaginal presentaron el mayor porcentaje de alteraciones vaginales (flujo sanguinolento) y el menor porcentaje de monta por los machos, lo que concuerda con lo publicado por otros autores que reportaron que el uso de esponjas intravaginales ocasionaba mayores alteraciones en la vagina, como retención de líquidos y vaginitis, debido al material poroso del que están fabricadas (Cortés-López *et al.*, 2013) y que dispositivos como CIDR[®], debido a su material de fabricación menos poroso, contribuirían a evitar alteraciones vaginales (Cortés-López *et al.*, 2013).

Estas alteraciones vaginales desencadenan el proceso inflamatorio localizado, que ocasiona la movilización de células del sistema inmune como los neutrófilos (León-Regal *et al.*, 2015). El grupo control presentó un mayor porcentaje de neutrófilos circulantes en sangre con respecto a los otros dos grupos en los que se había utilizado la cápsula de probiótico, sugiriendo que la mayor respuesta inflamatoria ocurrida en este grupo control habría movilizado mayor número de células de defensa. La presencia de las bacterias de Lp, habría evitado un daño mayor que desencadenase una mayor movilización de neutrófilos. Mencionar que en el grupo 2, al que se colocó CIDR® + Lp fue el que menor porcentaje de neutrófilos en sangre periférica presentó, lo que concuerda con que es el dispositivo que causa menor alteración vaginal, aunque no existieron diferencias significativas entre grupos.

El porcentaje de linfocitos fue mayor en el grupo 2. Dado que un aumento en los linfocitos suele asociarse a infecciones víricas (Lèfrere & Hermine, 2009), este aumento no estaría relacionado con la presencia del dispositivo intravaginal (donde cabe esperar una proliferación mayormente bacteriana o fúngica frente a una vírica), con lo que estos resultados estarían en concordancia con la hipótesis de que el probiótico *L. plantarum* introducido en la vagina de hembras caprinas a la vez que el dispositivo de liberación hormonal, limitaría el crecimiento de bacterias patógenas, lo que se vería reflejado en un menor porcentaje de células inmunitarias movilizadas.

Estos resultados en cuanto a salida en celo fueron algo inferiores a los publicados por otros autores (100% de salida en celo a las 36 h con CIDR® y 94,4% con esponja en ovejas según Cordova-Izquierdo *et al.* (2008)), aunque concuerdan con estos en que es superior para animales sincronizados mediante CIDR®. Hernández-Ballesteros *et al.* (2012) publicaron resultados similares a los del presente experimento; 89,47% de salida en celo con el uso de esponjas y 91,67% con CIDR® en cabras de raza Boer, aunque en este caso utilizaron esponjas caducadas y CIDR® reciclados.

Los resultados mostraron mejores valores de porcentaje de fertilidad para los lotes 2 y 3, con respecto al lote 1. La inserción de CIDR® y Lp consiguió el mayor porcentaje de fertilidad acumulada tras 2 ciclos, ocasionando menos alteración en el ambiente vaginal que la esponja con el probiótico, por lo que quizá la alteración ocasionada en la mucosa vaginal perdura en el tiempo durante al menos dos ciclos, disminuyendo la fertilidad de las hembras, no solo en el ciclo de estimulación hormonal, sino también en los dos inmediatamente posteriores. Curiosamente, la introducción de la esponja sola, también produjo buenos resultados en todos los parámetros evaluados, por lo que, o bien la presencia de Lp no afecta ni a la alteración de la mucosa vaginal ni a la tasa de preñez, o bien estos resultados se deben al escaso número de animales del lote control.

Esta menor fertilidad acumulada podría ser debida principalmente a las alteraciones que la presencia del dispositivo ocasiona en el ambiente vaginal, las cuales resultan perjudiciales para los espermatozoides. Los cambios en las poblaciones bacterianas junto con el aumento de células epiteliales, neutrófilos, macrófagos y eritrocitos tras la retirada de las esponjas o CIDR® pueden ejercer un efecto tóxico sobre los espermatozoides (Suárez *et al.*, 2006; Manes *et al.*, 2015). Por ejemplo, los lipopolisacáridos de las bacterias Gram-negativas han sido relacionados con infertilidad e interrupción de embarazo en mujeres debido a la acción directa de los componentes bacterianos sobre la viabilidad y movilidad espermática (Gorga *et al.*, 2001).

Salomon & Maxwell (2000) también reportaron que los cambios en la microbiota vaginal pueden provocar una reducción de la viabilidad y del transporte espermático en el tracto reproductivo de la hembra. De manera que, si la viabilidad de los espermatozoides disminuye debido a las alteraciones provocadas, lo hará consecuentemente la tasa de fertilidad obtenida. Es de esperar que, con el paso del tiempo, el número de colonias y el tipo de especie bacteriana se recupere y vuelva a ser el habitual en las hembras caprinas, por lo que los daños a los espermatozoides se irán reduciendo cuanto mayor sea el tiempo que ha transcurrido desde la retirada de los dispositivos, elevándose la

tasa de fertilidad. En todos los grupos del estudio se produjeron más gestaciones durante el 2º ciclo tras la retirada de las esponjas o CIDR® que durante el primero, que, aunque sin diferencias significativas, parece apoyar esta hipótesis.

Una disminución de la atractividad sexual de las hembras tras haber llevado el dispositivo intravaginal podría también explicar que la tasa de fertilidad sea inferior en el primer ciclo tras la retirada del mismo. Según Gatti (2010), en ovejas, la variación de la flora vaginal causada por el dispositivo, y por tanto de las señales liberadas a través del mucus vaginal, es tan grande que no se revierte por las demás vías de comunicación, o que las mismas no son tan importantes como las señales químicas liberadas a través de la vagina. Dado que las concentraciones de estrógenos son similares en ovejas con celos espontáneos y con celos sincronizados con esponjas con MAP (Letelier, 2008) puede descartarse que la concentración de esta hormona fuera la que generara la diferencia observada. Es decir, que las variaciones de la microbiota alteran las señales químicas que son reconocidas por los machos en el flujo vaginal, haciendo a esa hembra menos atractiva sexualmente. Evidentemente, si no es montada por el macho, esa hembra con el ambiente vaginal alterado no quedará gestante. Con el tiempo, la microbiota normal volverá a instalarse en la vagina de las hembras, restaurándose las señales químicas atrayentes para los machos y recuperándose la atractividad sexual.

6.5. Experimento 5: Utilización del probiótico intravaginal *Lactobacillus plantarum*, cepa I1001 para prevenir las alteraciones vaginales derivadas del uso de esponjas intravaginales en programas de sincronización de estros y elevar la tasa de fertilidad

En el experimento 5, se estudió si la introducción a lo largo de 8 semanas del probiótico Lp evitaba las alteraciones en el flujo vaginal causadas por la presencia de una esponja impregnada en FGA, permitiendo un mejor ambiente para el paso de los espermatozoides, lo que se vería reflejado en una tasa mayor de preñez en el grupo de hembras con Lp frente al grupo control.

Diferentes autores han estudiado los cambios microbiológicos que ocurren en la vagina de hembras sincronizadas y han visto que se produce un cambio, tanto en el número como en la población bacteriana mayoritaria. Así, Manes *et al.* (2010, 2013) encontraron que, en cabras, la flora vaginal normal es mayoritariamente Gram-positiva, predominando el género *Bacillus spp.*, mientras que recientemente, Flores-Hernández *et al.* (2020) encontraron *Staphylococcus spp.* como género mayoritario en cabras. Al retirar los dispositivos hormonales la flora cambió a una dominancia de Gram-negativas, en ovejas *Escherichia spp.* fue el género mayoritario (Manes *et al.*, 2010), mientras que en cabras, la microbiota vaginal cambió a un predominio de *Arcanobacterium pyogenes* (Manes *et al.*, 2013). Estos cambios ocurren tanto en tratamientos largos (11-12 días) como en protocolos más cortos (6-7 días) de tratamiento hormonal intravaginal. No obstante, el día del estro el número de colonias volvió a valores normales, tanto en cabras como en ovejas (Suárez *et al.*, 2006; Manes *et al.*, 2013).

En el experimento 5 se trató de comprobar si la administración vía vaginal del probiótico *L. plantarum* era útil para evitar daños en el ambiente vaginal de la hembra caprina, ocasionados por la presencia de una esponja dentro de la vagina durante varios días, que pudieran resultar contraproducentes para la fertilidad de las cabras, por afectar, como hemos mencionado previamente a la supervivencia y motilidad de los espermatozoides a su paso por la vagina.

No se han encontrado estudios en cabras donde se hayan probado estos BAL en relación con las alteraciones en el tracto reproductor, pero Quereda *et al.* (2020) publicaron un estudio en ovejas a las que introducían intravaginalmente una infusión de un preparado comercial de 3 especies de *Lactobacillus spp.* junto con la esponja de FGA para sincronización de celos. No encontraron diferencias significativas en el número total de enterobacterias (presumiblemente patógenas en el tracto reproductor) entre el grupo tratamiento y control, ni tampoco en el número de BAL de ambos grupos. Tampoco las hubo en la tasa de fertilidad con monta natural, aunque ésta varió del 60% en el grupo

control al 91% en el de tratamiento, por lo que sí se aprecia un aumento de la fertilidad en el grupo que recibió los probióticos. La ausencia de diferencia estadística puede deberse al escaso número de muestras. Sí que aparecieron diferencias significativas en el número de animales con neutrófilos localizados en el epitelio vaginal, siendo en el grupo control superior al grupo de tratamiento (80% frente a 36% de hembras que presentaban neutrófilos en la vagina) indicando que el uso de estas bacterias podría tener efecto beneficioso reduciendo la inflamación vaginal.

Pero los efectos beneficiosos de los lactobacilos no quedarían tan solo a nivel vaginal, ya que según varios autores (Moreno *et al.*, 2016; Benner *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2021) existe una relación entre la microbiota vaginal y la uterina. Gracias a técnicas de diagnóstico molecular, el dogma previamente aceptado de que el útero era un ambiente estéril está siendo desmontado, y se está reconociendo la importancia del microbioma uterino en los procesos de implantación embrionaria exitosa. De esta manera, en la especie humana, una población prevalente de *Lactobacillus spp.* beneficiaría la implantación embrionaria aumentando el éxito de las transferencias realizadas tras un ciclo de FIV (Moreno *et al.*, 2016) frente a pacientes con un microbioma donde el porcentaje de especies de *Lactobacillus spp.* es inferior al 90%.

Una posibilidad que explique la relación entre microbioma y éxito reproductivo es que un microbioma uterino anormal pueda desencadenar una respuesta inflamatoria en el endometrio que afecte negativamente a la implantación de los embriones, ya que durante la ventana de implantación los mediadores inflamatorios del endometrio están estrictamente regulados. El sistema inmunitario está íntimamente involucrado en todos los aspectos del proceso reproductivo, particularmente en el momento de la concepción y del periodo peri-implantatorio (Robertson *et al.*, 2011).

Además, una microbiota adecuada protegería al útero de infecciones por defender su nicho ecológico frente a especies patógenas. Cuando se realiza IA

quizá sea esta microbiota uterina la que cobra mayor importancia en el éxito de las tasas de gestación, ya que, aunque especies de bacterias vaginales causen un ambiente desfavorable para los espermatozoides, la presencia de los mismos en la vagina es muy reducida al realizar IA intracervical, o vaginal, pero con depósito de semen en la apertura del cuello uterino. La colocación de una cápsula de *L. plantarum* en la vagina de hembras caprinas antes de una sincronización de celos mediante colocación de esponja intravaginal busca limitar el crecimiento bacteriano de especies que puedan alterar no solo el ambiente vaginal, sino también el uterino, y favorecer el de especies que se asocian a un mayor éxito reproductivo por favorecer la implantación embrionaria.

Los resultados no mostraron diferencias significativas en las tasas de fertilidad de ambos grupos, siendo incluso algo superior en el grupo control que no había recibido el tratamiento con probiótico. Al no haber obtenido diferencias significativas entre grupos en ninguno de los ensayos se debe replantear cuáles pueden ser las causas. Una posible causa es que se ha utilizado como probiótico una cepa bacteriana que ha sido utilizada para la vagina de mujeres, y no de cabras. Como se comenta en la introducción del experimento 5, el género bacteriano *Lactobacillus spp.* sí que parece tener una gran importancia en los resultados de fertilidad de mujeres, favoreciendo la gestación en aquellas en las que es el género predominante.

Pero la microbiota vaginal de la hembra caprina no tiene por qué corresponderse con esto, de hecho, los estudios consultados no otorgan al género *Lactobacillus spp.* un papel protagonista en la vagina de las cabras, sino que aparece como uno de los géneros secundarios (Shallali *et al.*, 2001; Gomes, 2006). Quizá lo que parece funcionar para las mujeres no es la misma bacteria que proporcionaría un beneficio equivalente en las hembras caprinas. Estudios más profundos sobre la microbiota natural de la cabra fértil podrían orientar a utilizar otro microorganismo con beneficios más claros. Sin olvidar que los resultados del experimento 5 pueden deberse también a las razones

comentadas previamente de síntesis de anticuerpos anti-eCG o alteraciones espermáticas que no conocemos.

El pH del flujo vaginal puede actuar como indicador del crecimiento bacteriano que se está produciendo en el interior de la vagina. En ambos grupos de hembras se midió el pH el día de la colocación y retirada de la esponja de FGA y el día de la IA. En el grupo del tratamiento se midió durante todas las semanas que duró el estudio. Existió una tendencia a la acidificación del flujo a medida que avanzaban las semanas que podría ser debida al crecimiento bacteriano ocurrido por la introducción de las cápsulas de probiótico, del crecimiento bacteriano ocasionado por la presencia de la esponja intravaginal o de ambos. El valor promedio de pH más bajo en los dos grupos se obtuvo el día de la retirada de las esponjas, lo que concuerda con la hipótesis de que el aumento del número bacteriano acidifica el ambiente por producción de CO₂. No obstante, en ambos grupos, el día de la realización de la IA el valor del pH había ascendido quedando cercano al que se midió antes de la colocación de las esponjas, lo que estaría en concordancia con lo que ya hemos comentado de que el día de estro el número de colonias bacterianas volvía a los valores iniciales (Suárez *et al.*, 2006; Manes *et al.*, 2013), normalizando por tanto los valores de pH.

La mayoría de autores concuerdan en que el pH óptimo para los espermatozoides de macho cabrío está en valores cercanos a la neutralidad. Así, Ramos-Flores (2019) publicó que la motilidad espermática óptima se alcanza con pH entre 7,0 y 7,2 y según Hafez (2000) es necesario que el semen muestre un pH cercano a 7,0 cuando está en la vagina y que el rango normal de pH del semen caprino esté entre 6,7-6,9.

Los valores promedio de pH del flujo vaginal de las hembras caprinas obtenidos en el experimento 5 se encontraban el día de la IA en valores muy próximos a 7,0 en ambos grupos, ligeramente superior en el grupo control, que

fue de $7,1 \pm 0,34$, por lo que estaban dentro de los rangos óptimos para una buena motilidad espermática.

6.6. Experimento 6: Comparación de 2 métodos de diagnóstico de gestación: evaluación ecográfica endovaginal y cuantificación de progesterona sérica

Finalmente, al igual que es importante la obtención de semen con bienestar animal, la realización de la IA con óptimos resultados y la puesta a punto de un protocolo de congelación seminal, una vez inseminadas las hembras, conocer con prontitud si han resultado gestantes o no va a proporcionar un valioso conocimiento para favorecer el rendimiento de la explotación ganadera.

El experimento 6 pretende dar a conocer el día más temprano en el que se puede determinar un diagnóstico certero de gestación, mediante ecografía vaginal y utilizando un equipo ecográfico de alta calidad de imagen. Se hizo una comparación del diagnóstico mediante ecografía frente a la cuantificación de la P4 sérica 21 días tras la realización de la IA.

La determinación de P4 sérica caprina 21 días después de la inseminación resultó adecuada en la detección de preñez, ya que todas las hembras que efectivamente resultaron gestantes y parieron tenían una concentración elevada de P4. La concentración mínima de P4 encontrada en cabras preñadas en día 21 de edad gestacional fue de 12,17 ng/ml, bastante superior al mínimo que señala el positivo a la gestación reportado por Léga *et al.* (2006), quienes encontraron una concentración promedio de 7,86 ng/ml de P4 en cabras gestantes en día 23 post-monta. Ortega-Pacheco *et al.* (1999) establecieron que concentraciones superiores a 2 ng/ml entre los días 19-23 post-monta eran indicativo de preñez. Estos mismos autores concluyeron que la determinación de la concentración de P4 era un método más adecuado para determinar gestación temprana que la ecografía en este mismo día.

Ambas técnicas presentan ventajas y desventajas. La ultrasonografía es un método más subjetivo ya que depende del ecógrafo o transductor utilizados (ya que no todos proporcionan igual calidad de imagen ni tienen las mismas características técnicas), del estado del animal (si ha consumido agua o alimentos, número de partos previos, etc.) (Ortega-Pacheco *et al.*, 1999) y de la experiencia del técnico.

Numerosos autores han publicado que desde el día 16-18 de la gestación ya es posible visualizar una estructura anecogénica en el tejido uterino que se correspondería con la vesícula embrionaria, primer signo ecográfico de gestación, aunque con estos días no es posible visualizarla en el 100% de los casos (Santiago-Moreno *et al.*, 1995a,b; Martínez *et al.*, 1998). La mayoría de autores detectan en la especie caprina la vesícula embrionaria aproximadamente en el día 25-26 de gestación, prácticamente en el 100% de los casos, realizando ecografía transrectal o transvaginal (Basaran, 1999; Gonzales *et al.*, 2004; Galián *et al.*, 2021).

En los primeros estadios gestacionales puede confundirse la vesícula gestacional con otras estructuras como vasos sanguíneos y folículos ováricos. Esta subjetividad puede conducir a errores en el diagnóstico antes de los 30 días de gestación. La determinación de la P4 es, sin embargo, un método objetivo, en cuya determinación no influye la persona que realiza la técnica. Su principal desventaja es que, en ocasiones, elevadas concentraciones de P4 pueden deberse a otras razones distintas a una gestación, como un CL persistente o un estado de pseudogestación (El-Zarkouny *et al.*, 2008), clasificando como gestantes hembras que no lo están.

También es importante el hecho de que el diagnóstico mediante determinación de P4 no es inmediato, requiere la extracción de sangre y el envío de las muestras al laboratorio. El resultado puede tardar entre 24-48 horas. Además, esta técnica incrementa considerablemente los costes, sobre todo en rebaños con gran número de animales, donde hay que realizar muchos análisis.

El diagnóstico mediante ecografía, una vez adquirido el ecógrafo es inmediato y a la larga resulta más económico.

Tanto la ecografía como la determinación de la concentración de P4 tienen la desventaja de diagnosticar como positivas preñeces que no evolucionarán debido a muerte embrionaria temprana. De hecho, una de las hembras con elevados niveles de P4 en día 21 ofreció un diagnóstico dudoso de gestación en día 25 y negativo en día 30. En este caso podría haber ocurrido una pérdida embrionaria temprana, lo que justificaría los elevados valores de P4 en día 21 post-IA.

La ecografía permite conocer desde los primeros estadios de gestación el número de embriones, pudiendo diferenciar desde el día 30 gestaciones únicas de múltiples (Galián *et al.*, 2021). Esto le confiere una ventaja frente a la determinación de P4, ya que, aunque hay estudios que determinan que los niveles de P4 son inferiores en gestaciones únicas frente a gestaciones múltiples (Hussain, 2015), la gran variabilidad en los valores de P4 obtenidos hacen que la sospecha de gestación múltiple deba confirmarse ecográficamente de todos modos.

Con todo esto, estamos de acuerdo con Boscós *et al.* (2003) y El-Zarkouny *et al.* (2008) en que una determinación de P4 baja (<1 ng/ml) prácticamente siempre se va a corresponder con un animal no gestante, pero una concentración elevada puede deberse a varias causas, lo que puede inducir a error y clasificar como preñadas hembras que no lo están. Por tanto, la técnica de la determinación de la cantidad de P4 sérica sería útil en la detección de hembras vacías, pero no sería tan eficaz en detectar gestaciones sin errores. Sería recomendable un estudio ecográfico de las hembras clasificadas como preñadas mediante determinación de P4 para confirmar la gestación a partir del día 30. Por su parte, la ecografía, para ser fiable al 100% debería realizarse de forma intravaginal entre los días 25-30 post-IA o monta, lo que nos permitiría también estimar la viabilidad embrionaria si se dispone de ecografía Doppler, valorando

la existencia y frecuencia del latido cardíaco y además, la posibilidad de determinar el número de cabritos esperados.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. La recogida de semen de machos cabríos puede realizarse utilizando como estímulo sexual una hembra u otro macho, una vez los machos donantes han sido entrenados, sin afectar a la calidad seminal ni a la libido. La utilización de un maniquí que simula una hembra caprina proporcionó menor número de machos que saltan y eyaculan sobre él, necesitando mayor tiempo de reacción, así como diferencias significativas en el volumen de eyaculado y concentración espermática, por lo que este método no es el más idóneo. Sería interesante estudiar si el uso del maniquí junto con algún fluido corporal, como orina o semen, puede mejorar este método de recolección de semen.
2. Los machos cabríos de raza Murciano-Granadina menores de un año presentan menor tiempo de reacción y mayor capacidad de servicio que los machos adultos. La calidad seminal de machos cabríos de entre 6,5 y 8 meses de edad es suficiente para ser utilizados como reproductores, aunque existe gran variabilidad entre ejemplares.
3. Acorde a los promedios de calidad seminal presentados *in vitro*, el diluyente IMIDA y el protocolo de congelación de semen propuesto por Thilmant (1997), son adecuados para la crioconservación seminal en la especie caprina.
4. El uso de esponjas de FGA como dispositivo intravaginal de liberación hormonal produjo mayor alteración de la mucosa vaginal y menor tasa de salida en celo en cabras que el dispositivo CIDR®. La tasa de fertilidad acumulada durante 3 ciclos tras la retirada de los dispositivos fue inferior con el uso de esponjas, por lo que puede existir una durabilidad en el tiempo de las alteraciones causadas que alteren el ambiente vaginal, disminuyendo la fertilidad, al menos, durante los dos ciclos posteriores. Debido a que estas diferencias no fueron significativas, son necesarios estudios más profundos

y con mayor número de animales para determinar si la utilización de un probiótico intravaginal junto con el dispositivo hormonal es efectivo para evitar o disminuir las alteraciones en la mucosa vaginal ocasionadas por el mismo.

5. La introducción del probiótico *Lactobacillus plantarum* de forma intravaginal durante 8 semanas no ocasionó diferencias significativas en la tasa de gestación ni en el pH vaginal de las hembras tratadas con respecto al grupo control. Son necesarios estudios de la microbiota vaginal caprina que determinen las especies microbianas mayoritarias en el tracto reproductor de cabras fértiles.
6. La determinación de la cuantificación de progesterona sérica en día 21 post-IA es eficaz para reconocer hembras vacías, pero puede dar lugar a errores en hembras clasificadas como gestantes. La ecografía transvaginal en el día 30 post-IA ha resultado ser un método económico, seguro para el animal y eficaz en el diagnóstico de gestaciones tempranas en caprino, por lo que esperar estos 9 días resulta conveniente a la hora de dar un diagnóstico de gestación certero.

8. RESUMEN

8. RESUMEN

La Inseminación Artificial (IA) puede definirse como el conjunto de técnicas mediante las cuales los espermatozoides del macho son obtenidos, trasladados y depositados en los genitales de la hembra sin la existencia de la cópula. Es la tecnología de reproducción asistida más utilizada actualmente en el mundo animal gracias a su simplicidad, su bajo coste y su capacidad de producir cambios significativos en la productividad de la progenie de forma rápida.

El éxito reproductivo de cualquier especie recae en ambos progenitores, por lo que para mejorar la eficacia de la IA como método reproductivo se deben estudiar factores que afectan tanto al macho de la especie (y sus gametos) como a la hembra.

En esta Tesis se ha trabajado en la especie caprina, concretamente en la raza Murciano-Granadina, en la que se ha tratado de actuar en diversos puntos susceptibles de ser modificados para conseguir elevar el éxito de la técnica de IA, que se traduciría en una mayor tasa de recién nacido vivo.

Se ha actuado tanto a nivel del macho como de la hembra caprina dividiendo la parte experimental de esta Tesis en diferentes experimentos, tres de ellos centrados en el macho y la obtención y crioconservación de sus espermatozoides, y otros tres experimentos que han tenido como objetivo el estudio de daños que los protocolos de sincronización de celos pueden ocasionar en el ambiente vaginal de la hembra, la utilización de probióticos para paliar estos daños y el diagnóstico temprano de gestación.

En el experimento 1, *Recogida de semen caprino con tres estímulos sexuales diferentes. Libido y calidad seminal del eyaculado*, se trató de determinar si la libido de los machos cabríos de raza MG, determinada por el tiempo de reacción (TR) y la capacidad de servicio en una mañana, se veían afectados si el estímulo sexual utilizado en lugar de ser una hembra

estrogenizada era sustituido por otro macho cabrío o incluso un maniquí. Además de evaluar la libido de los animales frente a varios estímulos sexuales, también se quiso conocer si la calidad de su eyaculado sufría cambios significativos al utilizar uno u otro señuelo. Se evaluó de cada eyaculado obtenido el volumen, la motilidad individual (MI) y el porcentaje de espermatozoides móviles (% MOT). Se emplearon para ello 10 machos cabríos que habían alcanzado la pubertad y eran menores de un año, entrenados previamente en el sistema de recogida de semen mediante vagina artificial (VA) y utilizando una hembra inmovilizada como estímulo sexual durante el periodo de entrenamiento.

Los resultados obtenidos en este experimento mostraron que machos menores de un año de edad, previamente entrenados en la monta sobre una hembra inmovilizada, respondían de igual manera si en lugar de una hembra caprina se les suministraba un macho inmovilizado. Las variaciones observadas correspondían a una variabilidad entre ejemplares y no a un cambio de comportamiento por la presencia de un macho. Se aprecian diferencias significativas en los tiempos de reacción de machos no entrenados con respecto a las obtenidas tras un periodo de entrenamiento. No se afectó la capacidad de servicio en una mañana al utilizar un macho o una hembra. Tampoco los parámetros de calidad seminal evaluados fueron significativamente diferentes al utilizar un estímulo sexual de un sexo u otro, las variaciones encontradas se deben a cambios en la edad de los ejemplares. En cambio, el uso de un maniquí que simulaba la forma de una hembra caprina proporcionó menor número de machos que saltaban y eyaculaban sobre él, así como una reducción significativa en el volumen de eyaculado y concentración espermática. El TR fue significativamente superior al utilizar el maniquí.

En el experimento 2, *Comportamiento sexual y calidad seminal del macho cabrío MG en distintas edades* se estudió el comportamiento sexual (TR y capacidad de cubrición) de los machos cabríos de raza MG de diferentes edades, a la vez que la calidad seminal de sus eyaculados y la precocidad de la libido. Se quiso averiguar a qué edad un macho de esta raza puede ser incluido en un

programa de reproducción por presentar una capacidad de servicio y calidad seminal óptima. Se emplearon 18 machos cabríos MG que tenían entre 3 meses y 7 años, y 260 observaciones, de las cuales 167 fueron eyaculados.

Se obtuvo como resultado que machos cabríos menores de un año presentaron menor TR y mayor capacidad de servicio que machos adultos. La calidad seminal de machos cabríos de entre 6,5 y 8 meses de edad fue suficiente para ser utilizados como reproductores, pero existe gran variabilidad entre ejemplares, que debe ser tenida en cuenta a la hora de elegir a un macho como reproductor a una edad temprana.

En el experimento 3, *Diseño de un protocolo de congelación seminal caprina, mediante la adaptación de un protocolo utilizado en la especie porcina, y de un diluyente seminal que proporcione elevada calidad seminal post-descongelación*, se utilizó el protocolo de congelación de semen propuesto por Thilmant (1997), tradicionalmente diseñado para la especie porcina, en el cual se hicieron modificaciones para adaptarlo a la especie caprina. A la vez, se probaron tres diluyentes diferentes, el utilizado en el protocolo de Thilmant (1997), un diluyente con base de leche desnatada, tradicionalmente usado en los protocolos de congelación seminal caprina, y un nuevo diluyente diseñado por el Equipo de Mejora Genética Animal del IMIDA, denominado diluyente IMIDA, en el que se sustituyó el *Orvus Es Paste* por dodecil sulfato sódico (SDS). El objetivo era conocer si el protocolo de Thilmant (1997) era adecuado para ser utilizado en caprino y comprobar qué diluyente proporcionaba mejor calidad seminal en muestras descongeladas.

Este experimento arrojó que los promedios de calidad seminal *in vitro* de muestras seminales congeladas mediante el protocolo de Thilmant (1997) y la utilización del diluyente IMIDA, elaborado con base de yema de huevo y en el que los tensioactivos protectores de membrana se han sustituido por SDS son adecuados para la criopreservación seminal en la especie caprina. Los promedios proporcionados por el diluyente IMIDA superaron ampliamente a los

del diluyente de leche desnatada y también fueron mayores a los del diluyente Thilmant, aunque con menores diferencias. El diluyente IMIDA fue el que proporcionó una mayor resistencia en el tiempo en cuanto a vitalidad de los espermatozoides, por lo que fue el elegido para los ensayos de IA posteriores.

En el experimento 4, *Diferencias en la salida en celo y en las alteraciones vaginales provocadas por dos métodos de sincronización de estro en caprino y su relación con la fertilidad en los dos ciclos siguientes*, se compararon dos métodos de sincronización de estros, uno utilizando una esponja de poliuretano impregnada de acetato de fluorogestona (FGA) junto con una cápsula que contenía 50×10^6 UFC de *Lactobacillus plantarum* (Lp) cepa I1001. El segundo fue la sincronización mediante un sistema CIDR® y también una cápsula de Lp. A un tercer grupo se le introdujo una esponja de FGA sin cápsula de Lp. El dispositivo intravaginal permaneció 11 días en la vagina de hembras caprinas y se pretendió estudiar si los distintos tratamientos causaban distinta tasa de salida en celo, diferencias en las alteraciones vaginales (pH, flujo vaginal sanguinolento), aumento de células del sistema inmune en sangre, e incluso si las tasas de gestación eran distintas en ese ciclo y en los dos ciclos posteriores, utilizando la monta natural.

Como resultados se obtuvo que el uso de esponjas de FGA como dispositivo intravaginal de liberación hormonal produjo mayor alteración de la mucosa vaginal y menor tasa de salida en celo en cabras que el dispositivo CIDR®. La tasa de fertilidad acumulada durante 3 ciclos tras la retirada de los dispositivos fue inferior con el uso de esponjas, por lo que puede existir una durabilidad en el tiempo de las alteraciones causadas que modifiquen el ambiente vaginal, disminuyendo la fertilidad, al menos, durante los dos ciclos posteriores. Sin embargo, las diferencias no fueron significativas para ninguno de los parámetros estudiados.

En el experimento 5, *Utilización del probiótico intravaginal Lactobacillus plantarum, cepa I1001 para prevenir las alteraciones vaginales derivadas del uso*

de esponjas intravaginales en programas de sincronización de estros y elevar la tasa de fertilidad, se quiso averiguar si existían diferencias en las tasas de gestación entre un grupo de hembras que recibió tratamiento intravaginal consistente en una cápsula de 50×10^6 UFC de Lp, introducida semanalmente durante 8 semanas y posterior sincronización utilizando una esponja intravaginal de FGA con respecto al grupo control, en el que se colocó la esponja de FGA pero no la cápsula de probiótico. Ambos grupos portaron el dispositivo intravaginal durante 6 días. Se realizaron mediciones en el pH del flujo vaginal para ver las oscilaciones del mismo y las hembras de ambos grupos fueron inseminadas artificialmente a las 48 y 53 h de la retirada de la esponja intravaginal con semen congelado según el protocolo del experimento 3, utilizándose el diluyente IMIDA. La tasa de gestación se determinó mediante imagen ecográfica positiva.

Con respecto a los resultados de este experimento, la introducción del probiótico *Lactobacillus plantarum* de forma intravaginal durante 8 semanas no ocasionó diferencias significativas en la tasa de gestación ni en el pH vaginal de las hembras tratadas con respecto al grupo control.

Finalmente, en el experimento 6, *Comparación de 2 métodos de diagnóstico de gestación: evaluación ecográfica endovaginal y cuantificación de progesterona sérica*, se compararon dos métodos de diagnóstico temprano de gestación: la ecografía endovaginal frente a la determinación de progesterona (P4) sérica 21 días post-IA. Por medio de ecografías vaginales realizadas cada 2 días desde el día 14 al 30 post-IA a 30 hembras, se determinó el día más temprano de diagnóstico certero de gestación y se comparó con la cuantificación de P4 sérica de 18 cabras sometidas a IA. La cuantificación de P4 se realizó el mismo día de la inseminación y 21 días después. Aquellas hembras con concentraciones de P4 $> 7,86$ ng/ml, 21 días post IA se las consideró gestantes.

El diagnóstico temprano de gestación de este experimento fue determinado con un 100% de acierto a los 30 días post-IA. La determinación de la

cuantificación de P4 sérica en día 21 post-IA fue eficaz para reconocer hembras vacías, aquellas con una concentración < 1 ng/ml, pero puede dar lugar a errores en hembras clasificadas como gestantes, ya que existen otras causas, además de una preñez, que pueden provocar que la concentración de esta hormona permanezca elevada sin que exista una gestación. Por esto y por otras razones, como inmediatez y economía, es preferible diagnosticar mediante ecografía en día 30 frente a la determinación de P4 sérica.

En conclusión, la técnica de la IA en caprinos puede ser optimizada conociendo la edad mínima a la que un ejemplar de macho cabrío puede ser utilizado como reproductor, en base a su capacidad de servicio y calidad seminal, lo que podría alargar la vida reproductiva de un ejemplar de interés, a la vez que otro macho cabrío puede ser utilizado como estímulo sexual, liberando a la hembra caprina de ser continuamente hormonada para que presente celo. También que el protocolo de congelación de Thilmant (1997) puede adaptarse a la especie caprina y que el diluyente IMIDA proporciona *in vitro* elevados promedios de calidad seminal y resistencia en el tiempo. No obstante, son necesarios estudios *in vivo* que confirmen la capacidad fecundante de este semen y que el mismo proporcione óptimas tasas de fertilidad.

A nivel de las hembras también pueden hacerse modificaciones en los sistemas de sincronización de estros que minimicen los daños en el ambiente vaginal que puedan traducirse en menores tasas de fertilidad. El uso de bacterias beneficiosas está proporcionando buenos resultados en otras especies como la humana, pero estudios más profundos de la microbiota del tracto reproductor de hembras caprinas son necesarios para su uso provechoso.

Finalmente, un diagnóstico fiable de gestación puede ser determinado 30 días tras la monta o IA mediante ecografía transvaginal, utilizándose equipos que proporcionen elevada calidad de imagen.

9. SUMMARY

9. SUMMARY

Artificial Insemination (AI) can be defined as the set of techniques by which the male's sperm are obtained, transferred and deposited in the female's genitalia without copulation having taken place. It is currently the most widely used assisted reproduction technology in the animal world because of its simplicity, its low cost and its ability to quickly produce significant changes in the productivity of offspring.

The reproductive success of any species falls on both parents, so to improve the effectiveness of AI as a reproductive method, factors that affect both the male of the species (and his gametes) and the female must be studied.

In this Thesis we have worked on the goat species, specifically on the Murciano-Granadina breed, in which we have tried to act on various points that could be modified in order to increase the success of the AI technique, which would translate into a higher live birth rate.

The experimental part of this Thesis has been divided into different experiments, 3 of them focused on the male and the obtaining and cryopreservation of his sperm, and another 3 experiments that aimed at the studying the damage that estrus synchronization protocols can cause in the vaginal environment, the use of probiotics to alleviate these damages and the early pregnancy diagnosis.

In the experiment 1, *Collection of goat semen with three different sexual stimuli. Libido and seminal quality of the ejaculate*, we tried to determine whether the libido of MG goats, determined by the reaction time (RT) and the service capacity in one morning, was affected if the sexual stimulus used instead of an estrogenized female was replaced by another male goat or even a dummy. In addition to evaluating the libido of the animals to various sexual stimuli, we also wanted to know if the quality of their ejaculate underwent significant changes

when using one or another lure. The volume, individual motility (IM) and the percentage of motile spermatozoa (% MOT) were evaluated for each ejaculate obtained. For this purpose, we used 10 male goats that had reached puberty and were less than one year old, previously trained in the semen collection system using an artificial vagina (AV) using an immobilized female as a sexual stimulus during the training period.

The results obtained in this experiment showed that males under one year of age, previously trained in mounting on an immobilized female, responded in the same way if they were given an immobilized male instead of a female goat. The variations observed corresponded to a variability between specimens and not to a change in behavior due to the presence of a male. There were significant differences in the reaction times of untrained males compared to those obtained after a period of training. Capacity of service in one morning was not affected by using either a male or a female. Nor were the seminal quality parameters evaluated significantly different when using a sexual stimulus of one sex or another, the variations found are due to changes in the age of the specimens. In contrast, the use of a dummy simulating the shape of a female goat provided fewer males jumping and ejaculating on it, as well as a significant reduction in ejaculate volume and sperm concentration. RT was significantly higher when using the dummy.

In experiment 2, *Sexual behavior and seminal quality of MG goat at different ages*, the sexual behavior (TR and mating ability) of MG goats of different ages was studied, as well as the seminal quality of their ejaculates and precocity of libido. The aim was to find out at what age a male of this breed can be included in a reproduction program for presenting an optimal service capacity and seminal quality. Eighteen GM goats between 3 months and 7 years old were used, and 260 observations, of which 167 were ejaculated.

As a result, we found that male goats under one year old presented lower TR and higher service capacity than adult males. The seminal quality of male goats

between 6.5 and 8 months of age was sufficient to be used as breeders, but there is great variability between specimens, which should be taken into account when choosing a male as a breeder at an early age.

In experiment 3, *Design of a caprine seminal freezing protocol, by adapting a protocol used in the porcine species, and a seminal extender that provides high post-thaw seminal quality*, we used the semen freezing protocol proposed by Thilmant (1997), traditionally designed for the porcine species, in which modifications were made to adapt it to the goat species. At the same time, we tested 3 different extenders, the one used in the Thilmant protocol (1997), a skimmed milk-based extender, traditionally used in caprine seminal freezing protocols, and a new extender designed by our team, called IMIDA extender, in which *Orvus Es Paste* was replaced by sodium dodecyl sulfate (SDS). The objective was to find out if the protocol of Thilmant (1997) was adequate to be used in goats and to verify which extender provided better seminal quality in thawed samples.

This experiment showed that the in vitro seminal quality averages of frozen semen samples using the Thilmant protocol (1997) and the use of the egg yolk-based IMIDA extender, in which the membrane protecting surfactants have been replaced by SDS, are suitable for semen cryopreservation in the goat species. The averages provided by the IMIDA extender greatly exceeded those of the skimmed milk extender and were also higher than those of the Thilmant, although with smaller differences. The IMIDA extender was the one that provided the greatest resistance over time in terms of vitality of the spermatozoa, and was therefore chosen for the subsequent AI trials.

In experiment 4, *Differences in coming into heat and in vaginal alterations caused by two estrus synchronization methods in goats and their relationship with fertility in the two following cycles*, two estrus synchronization methods were compared, one using a sponge of polyurethane impregnated with fluorogestone acetate (FGA) together with a capsule containing 50×10^6 CFU of *Lactobacillus*

plantarum (Lp) strain I1001. The second was synchronization using a CIDR® system and also an Lp capsule. A third group received an FGA sponge without Lp capsule. The intravaginal device remained in the vagina of female goats for 11 days and it was intended to study whether the different treatments caused different rates of coming into heat, differences in vaginal alterations (pH, bloody vaginal discharge), increased cells of the immune system in the blood and even if pregnancy rates were different in that cycle and in the two subsequent cycles, using natural mating.

The results showed that the use of FGA sponges as an intravaginal hormone-releasing device produced greater alteration of the vaginal mucosa and a lower rate of coming into heat in goats than the CIDR® device. The fertility rate accumulated during 3 cycles after the removal of the devices was lower with the use of sponges, so there may be a durability over time of the alterations caused by modifying the vaginal environment such as decreasing fertility, at least during the two subsequent cycles. However, the differences were not significant for any of the parameters studied.

In experiment 5, *Use of the intravaginal probiotic Lactobacillus plantarum, strain I1001 to prevent vaginal alterations derived from the use of intravaginal sponges in estrus synchronization programs and to increase the fertility rate*, we wanted to find out if there were differences in the pregnancy rates between a group of females that received intravaginal treatment consisting of a capsule of 50 CFU of Lp, introduced weekly for 8 weeks and subsequent synchronization using an intravaginal FGA sponge with respect to the control group, in which the FGA sponge was placed but not the FGA probiotic capsule. Both groups wore the intravaginal device for 6 days. Vaginal discharge pH measurements were taken to monitor its pH oscillations, and the females of both groups were artificially inseminated 48 and 53 h after removal of the intravaginal sponge with frozen semen according to the protocol of experiment 3, using the IMIDA extender. The pregnancy rate was determined by positive ultrasound imaging.

Regarding the results of this experiment, the introduction of the probiotic *Lactobacillus plantarum* intravaginally for 8 weeks did not cause significant differences in the pregnancy rate or in the vaginal pH of the treated females with respect to the control group.

Finally, in experiment 6, *Comparison of 2 pregnancy diagnosis methods: endovaginal ultrasound evaluation and serum progesterone quantification*, two early pregnancy diagnosis methods were compared: endovaginal ultrasound versus serum progesterone (P4) determination 21 days post AI. Through vaginal ultrasound performed every 2 days from days 14 to 30 post-AI to 30 females, we determined the earliest day of accurate diagnosis of pregnancy and compared it with the quantification of serum P4 of 18 goats subjected to AI. P4 quantification was performed on the same day as insemination and 21 days later. Those females with P4 concentrations $>7,86$ ng/ml 21 days after AI were considered pregnant.

The early pregnancy diagnosis of this experiment was determined with 100% accuracy at 30 days post-AI. The determination of the quantification of serum P4 on day 21 post-AI was effective in recognizing empty females, those with a concentration <1 ng/ml, but it can give rise to errors in females classified as pregnant, since there are other causes besides a pregnancy that can cause the concentrations of this hormone to remain high without there being a pregnancy. For this and for other reasons such as immediacy and economy, we consider that it is preferable to diagnose by ultrasound on day 30 rather than by determining serum P4.

We conclude that the AI technique in goats can be optimized by knowing the minimum age at which a male goat can be used as a breeder, based on its service capacity and seminal quality, which could lengthen the reproductive life of a goat. specimen of interest, while another male goat can be used as a sexual stimulus, freeing the female goat from being continuously hormone-treated so that she stays in heat. Also that the freezing protocol of Thilmant (1997) can be adapted

to the goat species and that the IMIDA extender provides in vitro high averages of seminal quality and resistance over time. However, in vivo studies are needed to confirm the fertilizing capacity of this semen and that it provides optimal fertility rates.

At the level of females, modifications can also be made in the estrus synchronization systems that minimize damage to the vaginal environment that can translate into lower fertility rates. The use of beneficial bacteria is providing good results in other species such as humans, but deeper studies of the microbiota of the reproductive tract of female goats are necessary for their beneficial use.

Finally, a reliable pregnancy diagnosis can be determined 30 days after mating or AI by transvaginal ultrasound, using equipment that provides high image quality

10. ABREVIATURAS

10. ABREVIATURAS

- ALH: Desplazamiento lateral de la cabeza.
- BAL: Bacterias del ácido láctico.
- BCF: Frecuencia de batida de la cola.
- CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*): Sistema automatizado de evaluación espermática.
- CFDA: Diacetato de carboxifluoresceína.
- CIDR® (*Controlled Internal Drug Releasing*): Dispositivo de aplicación intravaginal de progesterona.
- CL: Cuerpo lúteo.
- DAR: Borde apical dañado.
- E2: Estradiol.
- eCG (*equine Chorionic Gonadotrophin*): Gonadotropina coriónica equina.
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
- esp: Espermatozoide.
- FGA: Acetato de fluorogestona.
- FSH: Hormona folículo estimulante.
- GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*): Hormona liberadora de gonadotropinas.
- HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

- IA: Inseminación artificial.
- i.m.: intramuscular.
- IMIDA: Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental.
- IP: Ioduro de propidio.
- KRP: medio Krebs-Ringer-Fosfato.
- LAC: Borde apical suelto.
- LD: microbiota dominante de *Lactobacillus*
- LDL: Lipoproteínas de baja densidad.
- LH: Hormona luteinizante.
- LIN: Índice de linealidad.
- Lp: *Lactobacillus plantarum*.
- MAD: Media del desplazamiento angular de la cabeza.
- MAP: Acetato de medroxiprogesterona.
- MAR: Borde apical perdido.
- MG: Murciano-Granadina.
- MI: Motilidad individual.
- MP: Móviles progresivos.
- MT: Móviles totales.
- NAR: Borde apical normal.

- NLD: microbiota no dominante de *Lactobacillus*
- N₂L: Nitrógeno líquido.
- P4: Progesterona.
- PGF₂α: Prostaglandina F₂ alfa.
- PMSG (*Pregnant Mare Serum Gonadotrophin*): Gonadotropina sérica de yegua gestante.
- PNA: *Peanut agglutinin*.
- SDS: Dodecil sulfato sódico.
- STR: Índice de rectitud.
- TR: Tiempo de reacción.
- TV: Tinción vital.
- UFC: Unidades formadoras de colonias.
- UFL: Unidad forrajera leche
- UI: Unidades internacionales.
- VA: Vagina artificial.
- VAP: Velocidad media.
- VCL: Velocidad curvilínea.
- VSL: Velocidad lineal.
- WOB: Índice de oscilación.
- % MOT: Porcentaje de espermatozoides móviles.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboagla, E.M.E. & Terada, T. (2004). Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 62(5): 809-818.
- Abril, S. (2017). Métodos alternativos de colección de semen en pequeños rumiantes para la mejora del bienestar animal y la calidad seminal. *Tesis Doctoral*. Universidad de Murcia. Murcia, España.
- Acosta, J., López, Z. & Valdés, M. (2007). Efecto del benzoato de estradiol en la población folicular de cabras no cíclicas. *Ciencia y Tecnología Ganadera*. 1: 49-54.
- Aguirre, F.V., Vázquez, R.R. & Orihuela, T.A. (2005). Entrenamiento de carneros para recolección de semen mediante vagina artificial, utilizando como estímulo objetos inanimados. *Veterinaria México*. 36(1): 105-111.
- Aisen, E.G. & Medina, V. (1992). Evaluación del semen ovino congelado-descongelado. Correlación entre los parámetros vinculados. *VI Jornadas Internacionales de Reproducción animal e IA*. Salamanca, España.
- Aisen, E.G. (2004). Procesamiento y conservación del material seminal. En: *Reproducción Ovina y Caprina*. Ed. Intermédica. Buenos Aires, Argentina. Pp.73-83.
- Aisen, E.G. & Venturino, A. (2004). Recolección y evaluación del semen. En: *Reproducción Ovina y Caprina*. Ed. Intermédica. Buenos Aires, Argentina. Pp. 55-69.
- Alba, L.O. & Silveira, E.A. (2006). La leucorrea vaginal bovina de carácter no inflamatorio y su significación clínica. *Revista Electrónica de Veterinaria. RedVet*. 7(10).
- Arbaiza, M.D. & Cabrera, P.C. (2021). Efecto de la criopreservación espermática en la fragmentación del ADN, viabilidad, y parámetros cinéticos en toros Brown Swiss. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*. 13(1): 787.
- Arieta, R.D.J., Fernández, J. & Menchaca, J. (2014). Métodos de extracción de semen bovino. *Revista Electrónica de Veterinaria. RedVet*. 15(6).

- Arriola, J. & Foote, R.H. (1987). Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *Journal of Dairy Science*. 70(8): 1664-1670.
- Ávila-Portillo, L.M., Madero J.I., López, C., León M.F., Acosta, L, Gómez, C., Delgado, L.G., Gómez, C., Lozano, J.M. & Reguero, M.T. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 57: 291-300.
- Axné, E., Hermansson, U. & Linde-Forsberg, C. (2004). The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 84(1-2): 179-191.
- Baldassarre, H. (2007). Reproducción asistida en la especie caprina: inseminación artificial a clonación. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 31(2): 274-282.
- Barbas, J.P. & Mascarenhas, R.D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking*. 10(1): 49-62.
- Baril, G., Remy, B., Leboeuf, B., Beckers, J.F. & Saumande, J. (1996). Synchronization of estrus in goats: the relationship between eCG binding in plasma, time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology*. 45(8): 1553-1559.
- Basaran, D.A. (1999). Diagnosis of Ovulation Rate and Embryonal, Foetal Development by Transrectal Ultrasonography in the White Goats. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 23(6): 567-574.
- Bazer, F.W., Thatcher, W.W., Hansen, P.J., Mirando, M.A., Ott, T.L. & Plante, C. (1991). Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants. *Journal of Reproduction & Fertility*. 43: 39-47.
- Benner, M., Ferwerda, G., Joosten, I. & Van der Molen, R. G. (2018). How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium. *Human Reproduction Update*. 24(4): 393-415.
- Bergeron, A., Créte, M.H., Brindle, Y. & Manjunath, P. (2004). Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction*. 70(3): 708-717.

- Berrios, O. & Sánchez, G.R. (2011). Congelación ultra rápida de espermatozoides humanos: Efecto sobre la función espermática y producción de especies reactivas de oxígeno. *International Journal of Morphology*. 3: 899-906.
- Binns, N. (2013). Probiotics, prebiotics and gut microbiota. *Monografías del Instituto Internacional de Ciencias de la Vida de Europa. ILSI Europe Concise Monograph*. Pp. 1-32.
- Boscos, C.M., Samartzi, F.C., Lymberopoulos, A.G., Stefankis, A. & Belibasaki, S. (2003). Assessment of progesterone concentration using enzymeimmunoassay, for early pregnancy diagnosis in sheep and goats. *Reproduction in Domestic Animals*. 38: 170-174.
- Bravo, J.A., Montanero, J., Calero, R. & Roy, T.J. (2011). Relación entre variables subjetivas e informatizadas del movimiento espermático del morueco. *Archivos de Zootecnia*. 60(232): 1087-1094.
- Buitrón-García, F.R., Bailón-Uriza, R., Santoyo-Haro, S. & Díaz-Sánchez, V. (2017). Evidencias en indicaciones de la progesterona. *Ginecología y Obstetricia de México*. 85(8): 489-497.
- Cabodevila, J. & Catena, M. (2012). Evaluación de semen bovino congelado. www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/evaluacion-semen-bovino-congelado-t29765.htm
- Cabrera, F., Gonzalez, F., Batista, M., Calero, P., Medrano, A. & Gracia, A. (2005). The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). *Reproduction of Domestic Animals*. 40: 191-195.
- Carpio-Chuchuca, S.V. (2015). Evaluación de dos diluyentes para la crioconservación de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada. *Tesis de Master*. Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca, Ecuador.
- Carretero, M.I., Giuliano, S.M., Casaretto, C.I., Gambarotta, M.C. & Neild, D.M. (2009). Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. *Investigación Veterinaria*. 11(1): 55-63.

- Cervantes, R.E., Izquierdo, A.C. & González, R.S. (2014). Comportamiento sexual en ovinos y caprinos. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*. 26: 99-116.
- Chávez, M. (2014). Historia de la reproducción asistida veterinaria. *Tesis Fin de Grado*. Universidad Autónoma de Aguas Calientes. Aguas Calientes, México.
- Chemineau, P., Gauthier, D., Poirier, J.C. & Saumande, J. (1982). Plasma levels of LH, FSH, prolactin, oestradiol-17 β and progesterone during natural and induced oestrus in the dairy goat. *Theriogenology*. 17(3): 313-323.
- Chemineau, P. (1986). Sexual behavior and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. Male mating behavior, testis diameter, ejaculate characteristics and fertility. *Reproduction Nutrition Development*. 26: 453-460.
- Chemineau, P., Cagnie, Y., Guerin, Y., Orgeur, P. & Vallet, J.C. (1991). Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. *FAO APHP-83*. FAO, Roma, Italia.
- Chen, C., Song, X., Wei, W., Zhong, H., Dai, J., Lan, Z., ... & Jia, H. (2017). The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nature Communications*. 8(1): 1-11.
- Colas, G. (1980). Variations Saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile de France. I. Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. *Reproduction Nutrition Development*. 20(6): 1789-1799.
- Córdova-Izquierdo, A., Córdova-Jiménez, M.S., Córdova-Jiménez, C.A. & Guerra-Liera, J.E. (2008). Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras. *Revista Veterinaria*. 19(1): 67-79.
- Corteel, J.M. (1974). Viabilité des spermatozoïdes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal: effet du glucose. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*. 14: 741-745.
- Corteel, J., Baril, G. & Leboeuf, B. (1987). Development and application of Artificial Insemination with deep frozen semen and out of season breeding of goats in France. *Proc. 4th Int. Conf. Goats*. Brasilia, Brasil. Pp. 523-531.

- Cortés, S. (2003). Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Cortés-López, H.A. (2005). Comparación de Tres Diluyentes (Triladyl[®], Andromed[®] y Leche Descremada) en la Motilidad Progresiva Post-descongelación de Semen de Macho Caprino.
- Cortés-López, N.G., Abad-Zavaleta, J., Bravo-Delgado, H.R., Meza-Villalvazo, V.M., Sachman-Ruiz, B., García-Arellano, C. & del Moral Ventura, S.T. (2013). Efecto del acetato de fluorogestona en la microbiota vaginal de borregas pelibuey en la cuenca del Papaloapan. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 16(3): 309-314.
- Cox, F., Alfaro, V., Montenegro, V. & Rodriguez-Martinez, H. (2006). Computer assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology*. 66: 860-867.
- Cruz, T.A.A. (2004). Historia de la inseminación artificial. Curso de inseminación artificial en ovejas y cabras. Desarrollo Agropecuario y Recursos Hidráulicos. San Luis Potosí, México.
- Cueto, M.I., Gibbons, A.E., Bruno, M.M. & Fernandez, J. (2016). *Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino*. Ed. INTA. Pp. 1-21.
- Dauphas, S., Beaumal, V., Riaublanc, A. & Anton, M. (2006). Hen egg yolk low-density lipoproteins film spreading at the air-water and oil-water interfaces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(10): 3733-3737.
- Deng, Q., Odhiambo, J.F., Farooq, U., Lam, T., Dunn, S.M. & Ametaj, B.N. (2015). Intravaginal lactic acid bacteria modulated local and systemic immune responses and lowered the incidence of uterine infections in periparturient dairy cows. *PLoS One*. 10(4): e0124167.
- Delgadillo, J.A. Características anatómicas y funcionales del sistema reproductor del macho. (2004). En: *Reproducción Ovina y Caprina*. Ed. Intermédica. Buenos Aires, Argentina. Pp. 1-9.

- Delgadillo, J.A., Gelez, H., Ungerfeld, R., Hawken, P.A. & Martin, G.B. (2009). The 'male effect' in sheep and goats-revisiting the dogmas. *Behavioural Brain Research*. 200(2): 304-314.
- De Montigny, G., Millerioux, P. & Jeanguyot, N. (1982). Milk fat progesterone concentrations in goats and early pregnancy diagnosis. *Theriogenology*. 17: 423-432.
- Dickson, U.L., Rangel, S.R., Torres, H.G., Becerril, P.C. & González, C.F. (2001). Fertilidad y prolificidad de cabras Alpino Francés y Saanen inseminadas con semen congelado importado. *Memorias del II Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos*. XI Congreso Nacional de Producción Ovina. Cuellar, J.A., Rimbaud, G. & Román U. (eds.). Mérida, Yucatán, México.
- Domínguez, M. (2014). Análisis de la fragmentación de ADN espermático en muestras criopreservadas por vitrificación y ultravitrificación. *Tesis Master*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México.
- Drevius, L. & Eriksson, H. (1966). Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Experimental Cell Research*. 42: 136-156.
- Driancourt, M.A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55: 1211-1239.
- Drion, P.V., Furtoss, V., Baril, G., Manfredi, E., Bouvier, F., Pougard, J.L., ... & Lebœuf, B. (2001). Four years of induction/synchronization of estrus in dairy goats: effect on the evolution of eCG binding rate in relation with the parameters of reproduction. *Reproduction Nutrition Development*. 41(5): 401-412.
- Duarte, O.A. (2010). Manual de inseminación artificial de ganado. *Sitio Argentino de Producción Animal*. Pp. 1-53.
- Elzanaty, S. & Malm, J. (2008). Comparison of semen parameters in samples collected by masturbation at a clinic and at home. *Fertility & Sterility*. 89(6): 1718-1722.
- El-Zarkouny, S.Z., El-Din, A.N., Ghobashy, H. & Abdel-Gawad, E.I. (2008). Accuracy of early pregnancy diagnosis and detection of twins using real-time

- ultrasonography compared to progesterone concentration in Barki goats. *Egyptian Journal of Animal Production*. 45(2): 131-38.
- Engeland I., Ropstad E., Andresen O. & Eik L. (1997). Pregnancy diagnosis in dairy goats using progesterone assay kits and oestrous observation. *Animal Reproduction Science*. 47: 237-243.
 - Evans, G. & Maxwell, W.M. (1987). *Salamons' artificial insemination of sheep and goats*. 2nd ed. Ed. Butterworths. Sidney, Australia.
 - Evans, G. & Maxwell, W.M. (1989). Manejo y valoración del semen. En: *Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras*. Evans, G. & Maxwell, W.M. (eds). Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp. 95-107.
 - Evans, G. & Maxwell, W.M. (1990). Conservación de semen durante corto tiempo. En: *Inseminación Artificial en Ovejas y Cabras*. Evans, G. & Maxwell W.M. (eds). Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp. 119-122.
 - Evans, A.C.O. (2003). Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproduction of Domestic Animals*. 38: 240-246.
 - Farrell, P.B., Presicce, G. A., Brockett, C.C. & Foote R.H. (1998). Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*. 49: 871-879.
 - Fatet, A., Pellicer-Rubio, M.T. & Leboeuf, B. (2011). Reproductive cycle of goats. *Animal Reproduction Science*. 124: 211-219.
 - Ferrari, S., Leinz, F. & Bernanbe, V.H. (1998). Inseminação Artificial em cabras com sêmen congelado: Resultados preliminares. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 35(5): 223-224.
 - Flores-Hernández, W., Luna-Castro, G., Peña-Avelino, L., Barrios-García, H. & Alva-Pérez, J. (2020). Microbiota vaginal y susceptibilidad quimioterapéutica en cabras criollas. *Abanico Veterinario*. 10: 1-14.
 - Folch, J. & Roca, M. (1982). Características sexuales del morueco de Rasa Aragonesa durante el primer año de vida. Influencia de la época de nacimiento. *Anales INIA*. 16: 99.

- Foote, R.H. & Arriola, J. (1987). Motility and fertility of bull sperm frozen-thawed differently in egg yolk and milk extenders containing detergent. *Journal of Dairy Science*. 70(12): 2642-2647.
- Foote, R.H. (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*. 80: 1-10.
- Fortune J. (2003). The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. 78: 135-63.
- Fraczek, M. & Kurpisz, M. (2007). Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa. *Journal of Andrology*. 28: 325-333.
- Franco, J. & Uribe-Velásquez, L.F. (2012). Hormonas reproductivas de importancia veterinaria en hembras domésticas rumiantes. *Biosalud*. 11(1): 41-56.
- Freitas, V.J. & Rubianes, E. (2004). Preparación de hembras. Detección y control del estro y la ovulación. En: *Reproducción ovina y Caprina*. Ed. Intermédica. Buenos Aires, Argentina. Pp. 87-97.
- Galián, S., Peinado, B., Poto, A. & Almela, L. (2019). Calidad seminal porcina de dosis congeladas durante más de 10 años. *Anaporc*. 165: 18-22.
- Galián, S., Peinado, B., Ruiz, S., Poto, A., Almela, L., Castillo, J. & Lozano, S. (2021). Uso de la ecografía para el diagnóstico y seguimiento de la gestación en la cabra Murciano-Granadina. *Archivos de Zootecnia*. 70 (269): 104-111.
- García, O.A., Veliz, F.G., Carrillo, E. & Rivas, R. (2007). Determinación del inicio de la pubertad en machos cabríos de la raza Alpino nacidos en invierno en el subtrópico mexicano. *Tesis Doctoral*. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". Torreón, México.
- García, Y. (2018). Efectos adversos de los estrógenos endógenos en hembras caninas. Tesina de Grado. Facultad de Ciencias Veterinarias UNCPBA. Tandil, Argentina.

- Garde, J. (1993). Congelación de semen en la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Gatti, M. (2010). Utilización de un dispositivo intravaginal (esponja) y flora bacteriana vaginal: control con antibióticoterapia y atractividad sexual en ovinos. *Tesis de Master*. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Gatti, M. & Ungerfeld, R. (2012). Intravaginal sponges to synchronize estrus decrease sexual attractiveness in ewes. *Theriogenology*.78: 1796-1799.
- Genís, S., Sánchez-Chardi, A., Bach, À., Fàbregas, F. & Arís, A. (2017). A combination of lactic acid bacteria regulates *Escherichia coli* infection and inflammation of the bovine endometrium. *Journal of Dairy Science*. 100(1): 479-492.
- Gibbons, A. (2002). Inseminación artificial con semen congelado en cabras de raza Angora. *Taurus*. 16: 24-32.
- Giraldo, G.J.J. (2007). Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos. *Revista Lasallista de Investigación*. 4(1): 51-57.
- Giuliano, S., Director, A., Gambarotta, M., Trasorras, V. & Miragaya, M. (2008). Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Animal Reproduction Science*. 104: 359-369.
- Goel, A.K. & Agrawal, K.P. (1992). A review of pregnancy diagnosis techniques in sheep and goats. *Small Ruminant Research*. 9: 255-264.
- Gomes, M.C. (2006). Microbiota vaginal de cabras nas fases do proestro, pós cópula e pós-parto. *Tesis Doctoral*. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.
- Gonzales, F., Cabrera, F., Batista, M., Rodriguez, N., Alamo, D., Sulon, J., Beckers, J.F. & Gracia, A. (2004). A comparison of diagnosis of pregnancy in the goat via transrectal ultrasound scanning, progesterone and pregnancy-associated glycoprotein assays. *Theriogenology*. 62: 1108-1115.
- González de Bulnes, A. (2013). Actualización en sistemas de manejo reproductivo. *XXXVIII Congreso Nacional SEOC*. Málaga, España.

- González, A., Pescador, N., Lucero, F. & Vázquez, J.F. (2021). Fisiología y endocrinología de la reproducción en ovejas y cabras. En: *Fisiología de la Reproducción y Productividad en Pequeños Rumiantes*. Ed. Académica Española. Beau Bassin, Mauricio. Pp. 12-27.
- Goonewardene, L.A., Whitmore, S.W., Jaeger, S. & Emond, S. (1997). Effect of prebreeding maintenance diet on artificial insemination in Alpine and Saanen goats. *Theriogenology*. 48: 151-159.
- Gorga, F., Galdiero, M., Buommino, E. & Galdiero, E. (2001). Porins and lipopolysaccharide induce apoptosis in human spermatozoa. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. 8(1): 206-208.
- Graham, E., Schmehl, M. & Nelson, D. (1980). Problems with laboratory assays. *8th Proc. NAAB Tech. Conf. A.I. Reprod.* Pp. 59-66.
- Greyling, J.P.C. & Van der Nest, M. (2000). Synchronization of oestrus in goats: dose effect of progestagen. *Small Ruminant Research*. 36(2): 201-207.
- Groenenberg, A., Fernández, G. & Catalano, R. (2016). Uso de la ecografía en ovinos como método de diagnóstico de gestación. Descripción de la metodología y análisis de resultados. *Tesis Fin de Grado*. UNCPBA. Buenos Aires, Argentina.
- Hafez, E. (2000). *Reproduction in Farm Animals*. 4th ed. Blackwell Scientific. Philadelphia, USA. Pp. 512.
- Hernández-Ballesteros, J.A., Pessoa-Guerra, M.M., Gómez-Gurrola, A., Benítez-Meza, J.A. & Navarrete-Méndez, R. (2012). Inducción de estro en cabras de raza Boer con esponjas caducadas y CIDR reciclado. *Abanico Veterinario*. 2(2): 17-24.
- Hernández-Corredor, L. (2014). Evaluación de la motilidad espermática de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes a través del sistema CASA. *Tesis Doctoral*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). Cúcuta, Colombia.
- Hernández, P.J., Fernández, R.F., Rodríguez, S.J., Negrete, R.M., Soto, M.Y. & García, R.A. (2012) Efecto de la criopreservación de semen de conejo

- Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) sobre su viabilidad y estado acrosomal. *Revista Salud Animal*. 34: 188-191.
- Hori, T., Kaseki, H., Fukuhara, Y., Oba, H., Mizutani, T., Kawakami, E. & Tsutsui, T. (2006). Effects of addition of sodium lauryl sulfate on frozen-thawed canine spermatozoa. *Journal of Veterinary Medical Science*. 68(10): 1125-1128.
 - Humblot P., De Montigny, G., Yeanguyot, N., Tetedoie, F., Payen, M., Thibier, M. & Sasser, R. (1990). Pregnancy-specific protein β and progesterone concentrations in French Alpine goats throughout gestation. *Journal of Reproduction & Fertility*. 89: 205-212.
 - Hussain, S.O. (2015). Serum progesterone analysis for monitoring estrus, pregnancy and parturition in Shami goats. *Al-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences*. 14(2): 69-73.
 - Hyman, R.W., Fukushima, M., Diamond, L., Kumm, J., Giudice, L. C. & Davis, R.W. (2005). Microbes on the human vaginal epithelium. *PNAS*. 102(22): 7952-7957.
 - Izquierdo, A.C., Noriega, J.R.N. & Gutiérrez, J.F.P. (2002). Importancia de las feromonas en la reproducción animal. *Medicina Veterinaria*. 19(7): 99-107.
 - Jarrell, V.L., & Dzink. P.J. (1991). Effect of number of corpora lutea and fetuses on concentration of progesterone in blood of goats. *Journal of Animal Science*. 69: 770-773.
 - Jeyendran, R., Van Der Ven, Il., Pérez-Peláez, M., Grabo, B. & Zanaveld, L. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship with other semen characteristics. *Journal of Reproduction & Fertility*. 70: 219-228.
 - Jones, R.C. & Footer, R.H. (1972). Non-dialyzable skim milk in diluents for ram and bull semen. *Journal of Dairy Science*. 55: 856-861.
 - Kandiel, M.M., Watanabe, G., Abdel-Ghaffar, A.E., Sosa, G.M., Abou-El Roos M.E., El-Azab A.E., Li, J.Y., Manabe, N. & Taya, K. (2010). Ovarian follicular dynamics and hormonal changes in goats during early pregnancy. *Journal of Reproduction and Development*. 56(5): 520-526.

- Karatzas, G., Karangiannidis, A., Varsakeli, S. & Brikas, P. (1997). Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology*. 48: 1049-1059.
- Karen, A., Samir, H., Ashmawy, T. & El-Sayed, M. (2014). Accuracy of B-mode ultrasonography for diagnosing pregnancy and determination of fetal numbers in different breeds of goats. *Animal Reproduction Science*. 147(1-2): 25-31.
- Khalil, W.A., El-Harairy, M.A., Zeidan, A.E.B., Hassan, M.A.E. & Mohey-Elsaeed, O. (2018). Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 6: S49-S56.
- Khanum, S. A., Hussain, M. & Kausar, R. (2008). Progesterone and estradiol profiles during estrous cycle and gestation in Dwarf goats (*Capra hircus*). *Pakistan Veterinary Journal*. 28(1): 1-4.
- Konyali, C., Tomas, C, Blanch, E., Gomez, E., Graham, J. & Moce, E. (2013). Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology*. 67(2): 124-131.
- Leboeuf, B., Restall, B. & Salamon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 62: 113-141.
- Lefrère, F. & Hermine, O. (2009). Linfocitosis. *EMC-Tratado de Medicina*. 13(3): 1-2.
- Léga, E., Toniollo, G.H. & Ferraudo, A. S. (2006). Concentração sérica de progesterona para diagnóstico precoce de gestação na cabra doméstica. *Ciência Animal Brasileira*. 6(1): 35-40.
- León-Regal, M., Alvarado-Borges, A., de Armas-García, J., Miranda-Alvarado, L., Varens-Cedeño, J. & Cuesta-del Sol, J. (2015). Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares: cifras alarmantes. *Revista Finlay*. 5(1): 47-62.
- Letelier, C.A. (2008). Caracterización de la funcionalidad ovárica e hipofisaria producida por el tratamiento progestativo para la sincronización de celo en ovinos. *Tesis Doctoral*. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

- Li, J., McCormick, J., Bocking, A. & Reid, G. (2012). Importance of vaginal microbes in reproductive health. *Reproductive Sciences*.19(3): 235-242.
- Lorenzo, M., Fresno, M., Darmain, N., Molina, A., & Ramos, R. (1997). Estudio del comportamiento reproductivo y calidad seminal de los machos y de la fertilidad mediante inseminación artificial en la Agrupación caprina Canaria. *XXII Jornadas Científicas SEOC*. Tenerife, España. Pp. 307-318.
- Manes, J., Fiorentino, M. A., Kaiser, G., Hozbor, F., Alberio, R., Sanchez, E. & Paolicchi, F. (2010). Changes in the aerobic vaginal flora after treatment with different intravaginal devices in ewes. *Small Ruminant Research*. 94(1-3): 201-204.
- Manes, J., Fiorentino, M.A., Hozbor, F., Paolocchi, F., Alberio, R. & Ungerfeld, R. (2013). Changes in the aerobic vaginal bacteria load and antimicrobial susceptibility after different oestrous synchronization treatments in goats. *Animal Production Science*. 53: 555-559.
- Manes, J., Campero, C., Hozbor, F., Alberio, R. & Ungerfeld, R. (2015). Vaginal histological changes after using intravaginal sponges for oestrous synchronization in anoestrous ewes. *Reproduction in Domestic Animals*. 50(2): 270-274.
- Manes, J. & Ungerfeld, R. (2015). Sincronización de celos en ovejas y cabras con dispositivos intravaginales liberadores de progestágenos: alteraciones en ambiente vaginal y su relación con la fertilidad. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 39(1): 104-108.
- Marco-Jiménez, F., Puchades, S., Gadea, J., Vicente, J.S. & Viudes-de-Castro, M.P. (2005). Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology*. 64: 1756-1765.
- Martinez, M.F., Bosch, P. & Bosch, R.A. (1998). Determination of early pregnancy and embryonic growth in goats by transrectal ultrasound scanning. *Theriogenology*. 49: 1555-1565.
- Martínez-Pastor, F., Tizado, E.J., Garde, J.J., Anel, L. & de-Paz, P. (2011). Statistical series: opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology*. 75: 783-795.

- Martínez-Pastor, F. (2016). Integridad de la cromatina nuclear espermática: Aplicaciones en el análisis de semen de verracos. *Avances en Tecnología Porcina*. 13(129): 56-60.
- Martins, G., Figueira, L., Penna, B., Brandao, F., Vargas, R., Vasconcelos, C. & Lilenbaum, W. (2009). Prevalence and antimicrobial susceptibility of vaginal bacteria from ewes treated with progesterin-impregnated intravaginal sponges. *Small Ruminant Research*. 81: 182-184.
- Mateos, E. (1990). Avances en reproducción caprina. *Mundo Ganadero*. 9: 41-51.
- Mateos, E. & Zubieta, M. (1990). Influencia del estímulo sexual en los niveles de testosterona plasmática de machos cabríos. *Investigación agraria. Producción y Sanidad Animales-INIA*. 5(3): 109-119.
- Matsas, D. (1993). Pregnancy examination in goats. En: *Society for Theriogenology. Theriogenology Handbooks. Caprine I*. Blacksburg, American College of Theriogenologists. Pp. 8.
- Maxwell, W.M.C. & Evans, G. (1990). *Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras*. Ed. Acribia. Madrid, España. Pp. 19-32.
- Memon, M.A. & Ott, R.S. (1980). Methods of pregnancy diagnosis in sheep and goats. *Cornell Veterinarian*. 70: 226-231.
- Memon, M.A. & Ott, R.S. (1981). Methods of semen preservation and Artificial Insemination in sheep and goats. *Animal Production*. 17(1): 19-25.
- Memon, M.A., Bretzlaff, K.N. & Ott, R.S. (1986). Comparison of semen collection techniques in goats. *Theriogenology*. 26: 823-827.
- Menchaca, A. & Rubianes, E. (2002). Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and follicular dynamics in goats. *Theriogenology*. 57: 1411-1419.
- Menchaca, A. & Rubianes, E. (2007). Pregnancy rate obtained with short-term protocol for timed artificial insemination in goats. *Reproduction in Domestic Animals*. 42(6): 590-593.
- Mickensen, W.D., Paisley, L.G. & Dahmen, J.J. (1981). The effect of scrotal circumference, sperm motility and morphology in the ram on conception rates and lambing percentage in the ewe. *Theriogenology*. 16: 53-57.

- Mitchell, C.M., Haick, A., Nkwopara, E., Garcia, R., Rendi, M., Agnew, K., ... & Eschenbach, D. (2015). Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 212(5): 611.
- Mocé, E., Martínez-Granell, M., Bernácer, J., Lozano-Palazón, S.A., Vicente, C., Mocé, M.L., Lavarra, R. & Gómez, E.A. (2019). La labor de los centros de sementales en el Programa de Mejora Genética de Ganado Caprino de la Raza Murciano-Granadina: Reproducción y Genética. *Tierras Ovino Caprino*. 25: 34-42.
- Mocé, E., Mocé, M. L., Lozano-Palazón, S. A., Bernácer, J., Martínez-Granell, M. M., Esteve, I. C., ... & Gómez, E. A. (2022). Fertility prediction in dairy goats from Murciano-Granadina breed: The role of sperm evaluation and female traits. *Animal*, 16(5), 100525.
- Monserrat, J. (2016). CASA, análisis de semen automatizado: aplicabilidad y tendencias de futuro. Curso online de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular "Reproducción humana y Laboratorio clínico".
- Morello, H. & Chemineau, P. (2004). Características anatómicas y funcionales del sistema reproductor de la hembra. En: *Reproducción Ovina y Caprina*. Ed. Intermédica. Buenos Aires, Argentina. Pp. 11-23.
- Moreno, I., Codoñer, F.M., Vilella, F., Valbuena, D., Martinez-Blanch, J.F., Jimenez-Almazán, J., ... & Ramon, D. (2016). Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 215(6): 684-703.
- Moreno, L. (2004a). *Aportación a la historia de la inseminación artificial ganadera en España: su significado en el desarrollo pecuario y la repercusión económica en el período 1931-1971*. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
- Moreno, L. (2004b). *La apasionante aventura del conocimiento. Datos para la historia de la inseminación artificial porcina: aportación a la memoria del Profesor Dr. D. Santiago Martín Rillo*. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.

- Mortimer, S.T. (2000). CASA-practical aspects. *Journal of Andrology*. 21: 515-524.
- Muhuyi, W., Drobniš, E.Z., Nelson, E.A. & Lin, T.Y. (1982). Season, breed and age influences on production and freezability of dairy goat semen. *Proc. 3rd. International Conference on Goat Production and Disease*. Dairy Goat Journal Pub., Scottsdale. USA.
- Muño, R., Fernández, M. & Peña, A.I. (2006). Parámetros cinéticos en eyaculados bovinos de toros de raza frisona y rubia gallega. *Información Técnica Agraria-ITEA*. 102(1): 55-66.
- Nava, A. & Coronado, L. (2010). Comparación de dos diluyentes de base Tris (Hidroximetilaminometano) sobre la motilidad del semen caprino congelado-descongelado. *Tesis Doctoral*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD), Cúcuta, Colombia.
- Nicholas, F.W. (1996). Genetic improvements through reproductive technologies. *Animal Reproduction Science*. 42: 205-214.
- Niño, T. (2005). Congelación y conservación del semen en la especie caprina mediante la utilización de ultracongeladores de -152°C: Tasa de fertilidad tras inseminación con semen congelado por diferentes protocolos de criopreservación. *VectorPlus*. 1: 59-66.
- Nowak, R., Porter, R.H., Blache, D. & Dwyer, C.M. (2008). Behaviour and the welfare of the sheep. In: *The Welfare of Sheep*. C.M. Dwyer (ed.). Springer-Verlag. New York, USA. Pp. 81-134.
- Nunes, J.F., Corteel, J.M.; Combarous, Y.; Baril, G. & Leboeuf, B. (1982). Rôle du plasma séminal dans la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. *Reproduction, Nutrition and Development*. 22(4): 611-620.
- Olivera, C.E. (2011). Uso de esponjas intravaginales con medroxiprogesterona y atractividad sexual en la oveja. *Tesis Doctoral*. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Ombelet, W. & Robays, J.V. (2010). History of human artificial insemination. *Facts Views Vis Obgyn*. Monograph. 1-5.
- Ombelet, W. & Robays, J.V. (2015). Artificial insemination history: hurdles and milestones. *Facts Views Vis Obgyn*. 7(2): 137-143.

- Orihuela, A. (2014). La conducta sexual del carnero. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 5(1): 49-90.
- Ortega-Pacheco, A., Montes-Pérez, R., Torres-Acosta, J.F., Aguilar-Caballero, A. & Avalos-Borges, E. (1999). Diagnóstico de gestación en cabras criollas (*Capra hircus*) mediante determinación de los niveles sanguíneos de progesterona y ultrasonografía de tiempo real. *Revista Biomédica*. 10(4): 229-234.
- O'shea, T. & Wales, R.G. (1966). Effect of casein, lecithin, glycerol, and storage at 5°C on diluted ram and bull semen. *Australian Journal of Biological Sciences*. 19(5): 871-882.
- Otero, C., Saavedra, L., Silva De Ruiz, C., Wilde, O., Holgado, A.R. & Nader-Macías, M.E. (2000). Vaginal bacterial microflora modifications during the growth of healthy cows. *Letter in Applied Microbiology*. 31: 251-254.
- Peinado, B., Poto, A., Gadea, J. & Ruiz, S. (1998). Estudios preliminares en la crioconservación de espermatozoides porcinos de raza Chato Murciano. *Archivos de Zootecnia*. 47: 305-310.
- Pellicer-Rubio, M.T. & Combarous, Y. (1998). Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *Reproduction*. 112(1): 95-105.
- Pellicer-Rubio, M.T., Magallon, T. & Combarous, Y. (1997). Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biology of Reproduction*. 57(5): 1023-1031.
- Peña, A. & Forsberg, L.C. (2000). Effects of Equex, one-or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*. 54(6): 859-875.
- Pérez, B. (1992). Estudio de los parámetros de valoración del rendimiento reproductivo en macho cabrío de las razas Verata y Malagueña. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense, Madrid, Spain.
- Pérez, B. & Mateos, E. (1993). Evaluación del comportamiento sexual en machos cabríos. *Mundo Ganadero*. 12: 41-44.

- Pérez, B., Mateos-Rex, E. & Pintado, B. (1992). Seasonal influence on sexual behavior in bucks. *V International Conference on Goats*. New Delhi, India. Pp. 274.
- Pontbrandt, D., Howard, J.C., Schiewe, M.L., Stuart, L.D. & Wildt, D.E. (1989). Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*. 26: 341-354.
- Poto, A., Peinado, B., Lorenzo, M., Domínguez, M.C., Gergatz, E., Göker, E., & Bali Pap, A. (1995). Inseminación artificial en caprino. Aportaciones en ganado de raza Murciano-Granadina. *Mundo Ganadero*. 12: 46-50.
- Poto, A., Peinado, B., Rosique, M., Martínez, M. & Barba, C. (2000a). Comportamiento del cerdo chato murciano frente maniquí en la sala de extracción de semen. Estudio preliminar de la libido. *Archivos de Zootecnia*. 49(186): 87-93.
- Poto, A., Peinado, B., Barba, C., & Delgado, J.V. (2000b). Congelación de semen porcino de razas autóctonas en peligro de extinción. Influencia de la metodología en bancos de germoplasma para pequeñas poblaciones. *Archivos de Zootecnia*. 49(186): 493-496.
- Poto, A., Almela, L., Galián, S. & Peinado, B. (2021). Diversas metodologías en la extracción de semen caprino y su influencia en el bienestar animal. *Tierras Caprino*. 33: 50-53.
- Pound, N., Javed, M.H., Ruberto, C., Shaikh, M.A. & Del Valle, A.P. (2002). Duration of sexual arousal predicts semen parameters for masturbatory ejaculates. *Physiology & Behavior*. 76(4-5): 685-689.
- Purdy, P.H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 63(3): 215-225.
- Pursel, Y. & Johnson, L. (1974). Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*. 1(2): 63-68.
- Pursel, V.G., Schulman, L.L. & Johnson, L.A. (1978). Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *Journal of Animal Science*. 47(1): 198-202.

- Quereda, J.J., García-Roselló, E., Barba, M., Mocé, M.L., Gomis, J., Jiménez-Trigos, E., ... & Gómez-Martín, Á. (2020). Use of probiotics in intravaginal sponges in sheep: a pilot study. *Animals*.10(4): 719.
- Quiterio-Nuñez, M. (1993). Morfología del tracto genital de los pequeños rumiantes. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 3(2): 76-86.
- Ramos-Flores, V.M. (2019). Comparación de tres dilutores en la crioconservación y viabilidad espermática de semen caprino en la estación experimental Tunshi. *Tesis Master*. Universidad Nacional de Chimborazo, Chimborazo, Ecuador.
- Restall, B.J., Milton, J.T.B., Klong-yutti, P. & Kochapakdee, S. (1990). Pregnancy diagnosis in Thai native goats. *Theriogenology*. 34: 313-317.
- Rivera, M. & Trujillo, L.E. (1990). Evaluación de algunas características del eyaculado en toros holstein. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 43(1-2): 3-27.
- Rivera, G.M., Alanis, G.A., Chaves, M.A., Ferrero, S.B. & Morello, H.H. (2003). Seasonality of estrus and ovulation in Creole goats of Argentina. *Small Ruminant Research*. 48(2): 109-117.
- Robertson, S.A., Chin, P.Y., Glynn, D.J. & Thompson, J.G. (2011). Peri-conceptual cytokines-setting the trajectory for embryo implantation, pregnancy and beyond. *American Journal of Reproductive Immunology*. 66: 2-10.
- Roca, J., Martínez, E., Vázquez, J.M., Ruiz, S. & Coy, P. (1991a). Influence of season on testicle size and libido in male goats from the Mediterranean area. *Animal Production*. 52: 317-321.
- Roca, J., Martínez, E., Vázquez, J.M., Ruiz, S. & Coy, P. (1991b). Influencia de la edad sobre los parámetros reproductivos de machos cabríos de raza Murciano-Granadina. *Archivos de Zootecnia*. 40: 173-179.
- Rodríguez, M. (2009). Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. *Tesis Doctoral*. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España.
- Rodríguez, A. (2016). El sistema reproductivo de la cabra. *Ruminantia*. (Puerto Rico) 2(2). Pp. 1-4.

<https://es.scribd.com/document/177042278/Sistema-Reproductivo-de-La-Cabra>

- Rodríguez-Miranda, D.A. (2018). Efecto de esponjas vaginales sobre la microbiota vaginal e impacto en la eficiencia reproductiva en cabras. *Tesis Doctoral*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México.
- Roelofs, J., López-Gatius, F., Hunter, R.H.F., Van Eerdenburg, F.J.C. & Hanzen, C. (2010). When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. *Theriogenology*. 74: 327-344.
- Rojas, A. (2014). Optimización del protocolo de crioconservación de semen caprino de la raza autóctona en peligro de extinción Blanca de Rasquera. *Tesis Doctoral*. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España. Pp. 25-264.
- Romano, J.E. (2004). Synchronization of estrus using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the season breeding in Nubian goats. *Small Ruminant Research*. 55: 15-19.
- Romero, T., Balado, J., Althaus, R. L., Beltran, M. C. & Molina, M. P. (2016). Drug residues in goat milk after prophylactic use of antibiotics in intravaginal sponges for estrus synchronization. *Journal of Dairy Science*. 99(1): 141-145.
- Rota, A., Ström, B., Linde-Forsberg, C., & Rodriguez-Martinez, H. (1997). Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38 C. *Theriogenology*. 47(5): 1093-1101.
- Rubianes, E. & Menchaca, A. (2003). The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Animal Reproduction Science*. 78: 271-287.
- Salamon, S. & Maxwell, W.M.C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62(1-3): 77-111.
- Salmani, H., Towhidi, A., Zhandi, M., Bahreini, M. & Sharafi, M. (2014) *In vitro* assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*. 68(2): 276-280.
- Santiago-Moreno, J., González-Bulnes, A.; García-López, M. & López-Sebastián, A. (1995a). Diagnóstico precoz de gestación y determinación del número de embriones mediante ecografía transrectal en la cabra. *Información Técnica Agraria-ITEA*. 91: 37-43.

- Santiago-Moreno, J., Gonzalez-Bulnes, A., García-López, M. & López-Sebastián, A. (1995b). Valoración de estadíos precoces de gestación en oveja y cabra mediante ecografía transrectal. *Investigación Agraria*. 10: 53-61.
- Santiso-Brandariz, R. (2013). Análisis de la fragmentación del ADN de espermatozoides humanos mediante el test de dispersión de la cromatina espermática: origen, causas e impacto en reproducción asistida. *Tesis Doctoral*. Universidade da Coruña. A Coruña, España.
- Sawyer, D.E. & Brown, D.B. (1995). The use of an in vitro sperm activation assay to detect chemically induced damage of human sperm nuclei. *Reproductive Toxicology*. 9(4): 351-357.
- Scudamore, C.L. (1988). Intravaginal sponge insertion technique. *Veterinary Record*. 123: 554.
- Sequeira, L.T. (2013). Compendio sobre Reproducción Animal. Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua.
- Shallali, A.A., Hussein, A.M., Salih, M.M. & Dafalla, E.A. (2001). A preliminary report on bacteria isolated from the female genital tract of Sudanese sheep and goats. *The Sudan Journal of Veterinary Research*. 17: 56-63.
- Shelton, J.N. (1965). Identification of progestagens of high activity for control of the oestrus cycle in the sheep. *Nature*. 206: 156-158.
- Shina, N.K., Wani, G.M. & Sahni, K.L. (1981). Effect of seasons and age on seminal attributes of Jamunapari buck. *Indian Veterinary Journal*. 58(12): 963-965.
- Sias, B., Ferrato, F., Pellicer-Rubio, M.T., Forgerit, Y., Guillouet, P., Leboeuf, B. & Carrière, F. (2005). Cloning and seasonal secretion of the pancreatic lipase-related protein 2 present in goat seminal plasma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1686(3): 169-180.
- Silva, P. & Gadella, B. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*. 65: 958-978.
- Silva, R.F. & Loaiza, A.M. (2007). Piómetra en pequeños animales. *Revista de Veterinaria y Zootecnia*; 1(2): 71-86.

- Simões, J., Almeida, J.C., Valentim, R., Baril, G., Azevedo, J., Fontes, P. & Mascarenhas, R. (2006). Follicular dynamics in Serrana goats. *Animal Reproduction Science*. 95: 16-26.
- Simões, J. (2015). Recent advances on synchronization of ovulation in goats, out of season, for a more sustainable production. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 4(2): 157-165.
- 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. *American Journal of Veterinary Research*. 49(8): 1284-1289.
- Stimpfel, M., Jancar, N. & Vrtacnik-Bokal, E. (2021). Collecting semen samples at home for IVF/ICSI does not negatively affect the outcome of the fresh cycle. *Reproductive BioMedicine Online*. 42(2): 391-399.
- Stornelli, M.A., Stornelli, M.C., Arauz, M.S., Savignone, C.A., García, M. & De La Sota, R.L. (2001). Estudio comparativo del efecto de tres diluyentes sobre la supervivencia de semen canino almacenado refrigerado a 4°C. *Revista Brasileira de Reproducao Animal*. 25(3): 468-470.
- Stornelli, M.A., Stornelli, M.C., Arauz, M.S., Savignone, C.A., García, M. & de la Sota, R.L. (2002). Effects of two different temperatures and three different extenders on survival and longevity of chilled canine semen. *Theriogenology*. 57: 483.
- Suarez, G., Zunino, P., Carol, H. & Ungerfeld, R. (2006). Changes in the aerobic vaginal bacterial mucous load and assessment of the susceptibility to antibiotic after treatment with intravaginal sponges in anestrus ewes. *Small Ruminant Research*. 63: 39-43.
- Suttiyotin, D. & Thwaiter, C.J. (1991). The ability of trypan blue to differentiate live and dead ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 25: 209-224.
- Tabarez Rojas, A. (2015). Optimización del protocolo de crioconservación de semen caprino de la raza autóctona en peligro de extinción Blanca de Rasquera. *Tesis Doctoral*. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. <https://ddd.uab.cat/record/128793>.

- Talbot, P. & Chacon, R.S. (1981). A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *Journal of Experimental Zoology*. 215: 201-208.
- Tasseron, F., Amir, D. & Schindler, H. (1977). Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution cooling and freezing. *Journal of Reproduction & Fertility*. 55: 461-462.
- Taverne, M. & Noakes, D. (2009). Pregnancy and its diagnosis. In: *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. D.E. Noakes, T.J. Parkinson & G.C.W. England (eds.). Saunders, Philadelphia, USA. Pp. 76-122.
- Tecirlioglu, R.T., Hayes, E.S. & Trounson, A.O. (2002). Semen collection from mice: electroejaculation. *Reproduction, Fertility and Development*. 14(6): 363-371.
- Thérien, I., Moreau, R. & Manjunath, P. (1999). Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction*. 61(3): 590-598.
- Thilmant, P. (1997). Freezing of boar sperm in 0.5 ml straw. Results in the field (Congelation du sperme de verrat en poillete de 0.5ml. Resultats sur le terrain. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 141: 457-462.
- Thomas, A.J. (1983). Ejaculatory dysfunction. *Fertility and Sterility*. 39: 445-454.
- Tirado, M.M. (2019). Efecto del acetato de medroxiprogesterona y benzoato de estradiol, sobre la emergencia folicular en cabras con baja condición corporal *Tesis Master*. Universidad Técnica de Ambato. Ceballos, Ecuador.
- Tomás, C. (2007). Nuevos protocolos para la crioconservación de espermatozoides de macho cabrío. *Tesis Master*. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- Tuli, R.K., Schmidt-Baulain, R. & Holtz, W. (1992). Computer-assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of the bull, boar and goat. *Theriogenology*. 38: 487-490.
- Ungerfeld, R. & González-Pensado, S.P. (2009). Social dominance and courtship and mating behaviour in rams in non-competitive and competitive pen tests. *Reproduction in Domestic Animals*. 44(1): 44-47.

- Uribe-Velásquez, L.F., Correa-Orozco, A. & Osorio, J.H. (2009). Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud*. 8(1): 117-131.
- Umland, J. (1984) Possibilities and limitations of semen evaluation for the prognosis of male fertility. In: *The Male in Farm Animal Reproduction*. Courot M. (ed.), Martinus Nijhoff Pub. Boston, USA. Pp. 269-289.
- Valencia, J., González, G., González, M. & Trejo, A. (1994). Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0,25 ml y 0,5 ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. *Veterinaria México*. 25 (2): 127-131.
- Valle, G.R., Cassali, G.D., Nogueira, J.C., Castro, A.C.S., Reis, A.M., Cardoso, F.M. Figueiredo, C.B.O. & Nascimento, E.F. (2007). Nuclear estrogen and progesterone receptors in the oviduct of heifers under natural and superovulated estrous cycles. *Animal Reproduction Science*. 101: 28-37.
- Vallecillo, A., Wheat, P., Thin, J., Hair, A., Santos, E. & Tenorio, T. (2004). Effects of cryopreservation on sperm motility in white Andalusian Serrana goat. *South African Journal of Animal Sciences*. 34: 116-118.
- Vázquez, I., Tapia, A., Herrera, J., Serrano, M.A., Sánchez, B. & Fischer, P. (2001). Effect of a frozen method on the viability results of goat spermatozoa (Murciano-Granadina). En: *Serie Ganadería Ovino-Caprino*. Junta de Andalucía, España.
- Vera, T.A., Chagra-Dib, E.P., Leguiza, H.D., Brizuela, R. & Valdivia, C.L. (2004). Incidencia del tipo de servicio sobre parámetros reproductivos de cabras criollas en Los Llanos de La Rioja. *Revista Argentina de Producción Animal*. 24(1): 273-274.
- Vera, T.A. 2009. Evaluación de viabilidad y fertilidad de espermatozoides caprinos congelados con diluyente sin proteína animal y el agregado de plasma seminal posdescongelado. *Tesis Doctoral*. Universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata, Argentina.

- Voglmayr, O.J., Chartier, D. & Sawyer, R. (1983). Viability of ram testicular spermatozoa following criopreservation in rete testis fluid. *Cryobiology*. 20: 421-431.
- Wang, R., Zhou, G., Wu, L., Huang, X., Li, Y., Luo, B., Zhu, H. & Huang, W. (2021). The Microbial Composition of Lower Genital Tract May Affect the Outcome of *in vitro* Fertilization-Embryo Transfer. *Frontiers in Microbiology*. 12: 729-744.
- Watson, P.F. (1976). The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and Deep-freezing. *Journal of Thermal Biology*. 1: 137-141.
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60: 481-492.
- Watson, P.F. & Martin, I.C.A. (1972). A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. *Journal of Reproduction & Fertility*. 28: 99-101.
- Wulster-Radcliffe, M.C., Williams, M.A., Stellflug, J.N. & Lewis, G.S. (2001). Artificial vagina vs a vaginal collection vial for collecting semen from rams. *Journal of Animal Science*. 79: 2964-2967.
- Yildiz, C., Fleming, C., Ottaviani, P. & McKerlie, C. (2008). Fresh and frozen-thawed sperm quality, nuclear DNA integrity, *in vitro* fertility, embryo development, and live-born offspring of N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) mice. *Cryobiology*. 57: 156-162.
- Zarazaga, L., Guzmán, J. & Pérez, M. (2003). Estacionalidad reproductiva en caprino y su relación con las concentraciones plasmáticas de melatonina. En: XXXVIII Jornadas Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Badajoz, España. Pp. 218-221.
- Zubieta, M. (1990). Evolución y valoración de la actividad funcional en machos reproductores caprinos durante su desarrollo. *Tesis Doctoral*. Universidad de Zaragoza. Zaragoza, España.
- <https://www.cabrandalucia.com/asociaciones/raza-murciano-granadina/>
- <https://feagas.com/razas/caprino/murciana-granadina/>

- <https://institutomarques.com/noticias/noticias-2019/la-excitacion-sexual-aumenta-la-calidad-del-eyaculado/>
- <http://www.kubuscan.com/publicaciones/sistema-casa-para-evaluacion-objetiva-de-la-motilidad-seminal/>
- https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/Programa%20de%20Mejora%20de%20la%20Raza%20Murciano_Granadina.%20Definitivo.tcm30-114417.pdf
- <https://www.murcigran.es/la-raza-murciano-granadina/3-historia>
- <https://ovigen.es/razas/raza-murciano-granadina/>
- <https://treseus.com/cabra-murciano-granadina/>
- http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/14_15_42_TFM_CONSTANZA.pdf
- <http://www.uco.es/zootecniaygestion/menu.php?tema=120>

ANEXOS

ANEXOS

A. Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 4.1. Composición del medio Krebs-Ringer-Fosfato. | 51 |
| Tabla 4.2. Composición de la tinción eosina-nigrosina. | 52 |
| Tabla 4.3. Composición del diluyente para congelación espermática IMIDA (fracción A) para un volumen total de 1 l (H ₂ O destilada + yema de huevo). | 52 |
| Tabla 4.4. Composición del diluyente para congelación espermática Thilmant (1997) (fracción A) para un volumen total de 1 l (H ₂ O destilada + yema de huevo). | 53 |
| Tabla 4.5. Composición del diluyente para congelación espermática de leche desnatada (fracción A) para un volumen total de 1 l. | 53 |
| Tabla 5.1. Valores promedio del tiempo de reacción (TR), volumen de eyaculado, concentración total de espermatozoides, MI y % MOT. | 77 |
| Tabla 5.2. Valores promedio de los parámetros de calidad seminal evaluados al comparar la utilización de una hembra y un maniquí como estímulo sexual. | 78 |
| Tabla 5.3. Promedio del tiempo de reacción (TR), volumen de eyaculado y concentración de espermatozoides en el eyaculado en cada salto, sin diferenciar edad de los machos. | 82 |
| Tabla 5.4. Promedio de los parámetros estudiados en cada uno de los saltos, diferenciando entre machos mayores de 1 año y menores de 1 año. | 83 |
| Tabla 5.5. Promedio de calidad seminal del primer eyaculado matinal en los distintos rangos de edad. | 86 |
| Tabla 5.6. Promedio de la calidad seminal de los sucesivos eyaculados en machos menores de 1 año. | 87 |
| Tabla 5.7. Promedios de calidad seminal por macho cabrío en semen fresco. | 89 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 5.8. Promedios de los parámetros seminales obtenidos por sistema CASA para el pool de machos cabríos MG en test de resistencia, según diluyente. | 89 |
| Tabla 5.9. Promedios de los parámetros seminales obtenidos por sistema CASA para el macho 1 en test de resistencia, según diluyente. | 91 |
| Tabla 5.10. Promedios de los parámetros seminales obtenidos por sistema CASA para el macho 2 en test de resistencia, según diluyente. | 91 |
| Tabla 5.11. Promedios de los parámetros seminales obtenidos por sistema CASA para el macho 3 en test de resistencia, según diluyente. | 92 |
| Tabla 5.12. Promedio de parámetros de calidad seminal mediante evaluación microscópica subjetiva para el pool de machos cabríos en test de resistencia, según diluyente. | 94 |
| Tabla 5.13. Promedio de parámetros de calidad seminal mediante evaluación microscópica subjetiva para macho 1 en test de resistencia, según diluyente. | 94 |
| Tabla 5.14. Promedio de parámetros de calidad seminal mediante evaluación microscópica subjetiva para el macho 2 en test de resistencia, según diluyente. | 95 |
| Tabla 5.15. Promedio de parámetros de calidad seminal mediante evaluación microscópica subjetiva para el macho 3 en test de resistencia, según diluyente. | 96 |
| Tabla 5.16. Número y porcentaje (%) de cabras que presentaron celo a las 30 y 48 h tras la retirada de los dispositivos intravaginales en cada grupo. | 97 |
| Tabla 5.17. Promedio de porcentaje de leucocitos (neutrófilos y linfocitos) en las muestras sanguíneas de las hembras de cada grupo. | 99 |
| Tabla 5.18. Resultados de los 3 lotes en los valores de pH, % de flujo alterado, % de salida en celo a las 48 h y % de fertilidad (promedio \pm desviación estándar). | 99 |
| Tabla 5.19. Promedio de pH del flujo vaginal \pm desviación estándar en cada semana del estudio de las hembras del grupo Lp (n= 15). | 101 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 5.20. Promedio de pH del flujo vaginal \pm desviación estándar de las hembras del grupo control (n= 15). | 101 |
|---|-----|

B. Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figuras 3.1 y 3.2. Ejemplares de macho cabrío (izq.) y de hembra caprina (dcha.) de raza Murciano-Granadina. | 21 |
| Figura 4.1. Recogida de semen mediante VA. | 61 |
| Figura 4.2. Macho cabrío MG saltando sobre otro macho. | 61 |
| Figura 4.3. Maniquí con forma de hembra caprina. | 61 |
| Figura 4.4. Macho cabrío MG saltando sobre el maniquí. | 61 |
| Figura 4.5. Reflejo de Flehmen de un macho cabrío como parte del cortejo previo a la cópula. | 62 |
| Figura 4.6. Esponja con FGA (arriba) y CIDR [®] (abajo) con sus aplicadores. | 67 |
| Figura 4.7. Catéter de IA, vaina, pajuela y espéculo usados en IA. | 69 |
| Figura 4.8. Realización de IA. | 69 |
| Figuras 4.9 y 4.10. Equipos utilizados para el análisis de células sanguíneas mediante citometría de flujo (izq.) e inmunoanalizador de análisis de P4 sérica (dcha). | 71 |
| Figuras 4.11 y 4.12. Ecógrafo GE Voluson [®] 730PRO (izq.). Sonda convex abdominal (1) y sonda microconvex endovaginal (2). | 72 |
| Figura 4.13. Exploración mediante ecografía endovaginal. | 72 |
| Figura 4.14. Exploración mediante ecografía abdominal. | 72 |
| Figura 5.1. Promedio del tiempo de reacción al utilizar una hembra o un maniquí como estímulo sexual. | 79 |
| Figura 5.2. Promedio del volumen de eyaculado al utilizar una hembra o un maniquí como estímulo sexual. | 79 |
| Figura 5.3. Promedio de la concentración total de espermatozoides al utilizar una hembra o un maniquí como estímulo sexual. | 80 |
| Figura 5.4. Promedio de la motilidad individual al utilizar una hembra o un maniquí como estímulo sexual. | 80 |

| | |
|---|-----|
| Figura 5.5. Promedio del porcentaje de espermatozoides móviles al utilizar una hembra o un maniquí como estímulo sexual. | 81 |
| Figura 5.6. Promedio del tiempo de reacción para cada salto diferenciando entre machos menores y mayores de 1 año. | 84 |
| Figura 5.7. Promedio del volumen de eyaculado para cada salto diferenciando entre machos menores y mayores de 1 año. | 85 |
| Figura 5.8. Promedio de la concentración de espermatozoides [total esp] para cada salto diferenciando entre machos menores y mayores de 1 año. | 86 |
| Figura 5.9. pH promedio de cada uno de los grupos. | 98 |
| Figura 5.10. Comparación de los diferentes promedios de cada parámetro por grupo. | 100 |
| Figura 5.11. Primer esbozo de vesícula embrionaria en día 18 de gestación. | 103 |
| Figura 5.12. Vesículas embrionarias identificables en día 23. | 103 |
| Figuras 5.13 y 5.14. Vesículas embrionarias visibles en día 25. En algunas hembras ya es visible el embrión. | 104 |
| Figura 5.15. Embrión caprino. Día 30. | 104 |