

Universidad Católica Del Trópico Seco
“Pbro. Francisco Luis Espinoza Pineda”



Informe final de tesis para optar el título profesional de Ingeniero
Agropecuario

Evaluación de medios diluyentes para la conservación
de semen caprino, en el aprisco de UCATSE, Estelí, 2020

Autores

Juan Carlos Chavarría Ramírez

José Leonidas Guevara Acevedo

Tutor

MV. Medardo de Jesús Moreno Castellón

Estelí, julio 2020

Esta tesis fue aceptada en su presente forma por el Departamento de Investigación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA) de la Universidad Católica del Trópico Seco (UCATSE), y aprobada por el Honorable Sínoo Evaluador nombrado para tal efecto, como requisito parcial para optar al título profesional de: **INGENIERO AGROPECUARIO**

Tutor:

MV. Medardo de Jesús Moreno Castellón

Sínoo evaluador

M.Sc. Jaime Antonio Landero Amaya

MV. Carlos Alonso Robles García

M.Sc. Albert Williams Hernández Hernández

Sustentantes:

Br. Juan Carlos Chavarría Ramírez

Br. José Leonidas Guevara Acevedo

ÍNDICE

Contenido	Página.
INDICE DE ANEXOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
RESUMEN.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. HIPÓTESIS	4
IV. MARCO TEÓRICO	5
4.1. Aparato reproductor del cabro.....	5
4.2. Métodos de extracción de semen.....	6
4.3. Evaluación seminal.....	8
4.4. Diluyentes.....	11
4.5. Métodos de conservación	17
V. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1. Ubicación geográfica.....	19
5.2. Población y muestra.....	19
5.3. Definición de variables con su operacionalización	20
5.4. Diseño experimental.....	20
5.5. Manejo del experimento	21
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES	25

VII. CONCLUSIONES.....	30
VIII. RECOMENDACIONES	31
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	32
X. ANEXOS.....	41

INDICE DE ANEXOS

Contenido	Página.
Anexo 1: Esquema del diseño del experimento	41
Anexo 2: Hoja de campo	42
Anexo 3. Presupuesto.....	43
Anexo 4. Imágenes sobre las actividades desarrolladas en el ensayo.....	45
Anexo 5. Análisis estadísticos	48

DEDICATORIA

A Dios, padres, familiares, maestros y amigos.

Juan Carlos Chavarría Ramírez

José Leonidas Guevara Acevedo

AGRADECIMIENTO

A Dios por el don de la sabiduría y la inteligencia para concluir nuestras metas académicas.

A nuestros padres por su inmenso apoyo y comprensión.

A nuestro tutor, MV. Medardo Moreno por su conocimiento y apoyo en nuestra investigación.

A los responsables del área caprina de la universidad por su accesibilidad y permitirnos el lugar de estudio.

A Janeth Reyes Rivera por facilitarnos herramientas para la congelación de las muestras.

A todas las personas que nos ayudaron que todo esto fuera posible.

Juan Carlos Chavarría Ramírez

José Leonidas Guevara Acevedo

RESUMEN

En la presente investigación se evaluaron cuatro medios diluyentes para la conservación de semen caprino en congelación, la evaluación fue durante 94 horas con evaluaciones cada 24 horas tomando como referencia la motilidad espermática, termo resistencia y análisis costo-beneficio para cada uno de los diluyentes. Los diluyentes evaluados fueron 3 naturales y un comercial, los naturales fueron a base de leche de vaca (T1,) leche de cabra (T2), Yema de huevo (T3) y el diluyente comercial fue el Triladyl (T4), cada uno de los tratamientos con 4 repeticiones y cada repetición con 10 muestras, con un total de 160 muestras. El semen utilizado fue de un cabro Saanen de 4 años de edad, a este se le extrajo semen 4 veces con rangos de 7 a 8 días por extracción. Los volúmenes fueron de 0.5, 0.7, cuatro y dos ml por cada extracción, la concentración espermática se determinó mediante un microscopio y la cámara de Neubauer con 6.5 mil millones de espermatozoides por ml de semen, encontrándose en el rango óptimo, el color a criterio visual se determinó como amarillo cremoso sin anomalías, la motilidad progresiva post descongelación fue similar en todos los tratamientos en las primeras 24 horas con rangos de vigor entre 3 a 4 (escala de 0 a 5) en todas las repeticiones. De las 48 horas a las 96 horas el T1 y T2 fueron inferiores a los tratamientos T3 y T4 con rangos de vigor de 2 a 3 y de 3 a 4 respectivamente. La termoresistencia fue similar para todos los tratamientos hasta las 72 horas, el T4 mostró superioridad sobre los demás tratamientos en las últimas horas (72 y 96). La relación beneficio costo fue igual para todos los tratamientos con índice IOR de dos, indica que existe utilidad económica para todos los diluyentes.

PALABRAS CLAVE: Termo resistencia, Triladyl, Motilidad, Leche, Concentración Espermática.

I. INTRODUCCIÓN

Los sistemas de crianza de cabras en el país están mayormente compuestos por razas consideradas nativas o criollas. Desde su introducción por parte de los colonizadores, en un proceso de selección, adquirieron resistencia a los medios climáticos exigentes del país, encontrándose adaptadas al lugar sobre el que habitan. A medida que fueron sometidas a los sistemas de crianza, resultaron cruzamientos que llevaron a crear variabilidad genética (Rimbaud, 2004), esto provocó una degradación genética, lo que ha llevado a que ciertos genes deseables para aumentar la producción en el rubro no se manifiesten, además, consanguinidad, enfermedades infecto contagiosas, no hay control de preñez y los índices reproductivos son bajos, estas son limitantes que sufren en su mayoría los pequeños y medianos productores del país, siendo barreras que reducen las producciones de ingresos económicos.

El uso de medios diluyentes de semen posibilita la multiplicación y difusión de genes deseables, al mismo tiempo su conservación por periodos más prolongados, produciendo un impacto en el mejoramiento genético mundial, ya que acelera la circulación y transporte de material genético hacia sectores poblacionales de inferiores características productivas (Fierro, 2005). Un diluyente es considerado una solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado, preservando las características funcionales de los espermatozoides manteniendo un nivel de fertilidad adecuado, además, los componentes del diluyente proveen al semen substratos metabolizables, pH y presión osmótica adecuada, compuestos que lo protegen contra el shock frío y antibióticos que reducen la proliferación bacteriana (Valencia, 2006).

En la búsqueda de productos naturales para la conservación de semen, se han realizado diferentes investigaciones, en distintas especies, como el estudio de Cortes (2005) quien comparó dos productos comerciales, (Triladyl y Andromed) y un natural como lo es la leche de vaca descremada, en la Motilidad progresiva post descongelación de espermatozoides de cabros, donde los resultados indicaron inferioridad del producto natural comparado con los comerciales.

Existe una gran variedad de diluyentes y métodos empleados en la conservación del semen de macho cabrío. Sin embargo, todos los medios empleados para este fin, prolongan la

viabilidad de la célula espermática por un período limitado de tiempo (refrigeración) o indefinidamente (congelación), rentabilizando en cualquier caso el número de dosis obtenidas por eyaculado, entre los diluyentes naturales más utilizados para conservar semen caprino, son a base de yema de huevo y leche descremada o ultra pasteurizada (Amiridis, 2012).

En la presente investigación se estudiaron 4 diluyentes para conservar semen caprino los cuales fueron: leche de vaca pasteurizada como, tratamiento 1 (T1), leche de cabra (T2), yema de huevo (T3), y Triladyl (T4). Todos estos conservados en un mismo tiempo y bajo las mismas condiciones (Congelación), donde al menos un tratamiento fue superior en cuanto a la motilidad espermática.

II. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar cuatro medios diluyentes, para la conservación de semen caprino, en el Aprisco de UCATSE, Estelí, 2020

Objetivos Específicos

Analizar las características macroscópicas y concentración espermática del semen, determinando sus cualidades: color y volumen.

Comparar la motilidad progresiva espermática en cada diluyente destinados para la conservación de semen.

Comprobar la supervivencia de los espermatozoides mediante la prueba de termo resistencia.

Determinar la relación beneficio costo para cada uno de los diluyentes, especificando su rentabilidad.

III. HIPÓTESIS

El tratamiento a base de yema de huevo dará mejores resultados en cuanto a la motilidad espermática en comparación con los demás tratamientos naturales.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1. Aparato reproductor del cabro

El aparato reproductor del cabro está compuesto por dos testículos, escroto, conductos espermáticos, uretra, vesículas seminales, próstata, glándulas bulbo uretrales o glándulas de Cowper y el pene. Los testículos se encuentran en la región inguinal, son los encargados de producir y reservar los espermatozoides. La vesícula seminal aporta al semen ácido ascórbico, ácido cítrico, fructosa seminal, fósforo inorgánico y fósforo soluble en ácido siendo la mayor parte del líquido seminal. La próstata proporciona minerales. Las glándulas bulbo uretrales proporcionan al semen alto contenido de proteínas aportando nutrientes a los espermatozoides. La uretra es un canal muscular que se extiende hasta la vejiga urinaria, y sirve de transporte del líquido seminal. El pene es el órgano copulatorio. Este al momento de la erección se extiende por el relajamiento de los músculos retractores (Sáenz, 2007).

4.1.1. Espermatozoide

Un espermatozoide normal en diferentes especies como conejo, cerdo y borrego, suelen tener una apariencia similar, con cabeza ovalada con longitud de 3-8 μm y ancho entre 2 a 4 μm ; la pieza intermedia es recta y de contorno regular, y mide 7 a 8 μm , y su cola un largo de 45 a 60 μm (Ávalo, González, Vargas, & Herrera, 2018). Macedo, et al, (2001) explican que en los espermatozoides de mamíferos es necesario que se presenten tres procesos fisiológicos para que obtengan la capacidad fertilizante, estos son: maduración epididimaria, capacitación y reacción acrosomal. La maduración del espermatozoide se adquiere durante su tránsito por el epidídimo. Una vez que los espermatozoides son transportados en el epidídimo y transitan a través de la cabeza, cuerpo hasta llegar a la cola del epidídimo, se consideran igualmente maduros que los eyaculados y son potencialmente fértiles; también mencionan que la capacitación y reacción acrosomal ocurren después de que el espermatozoide ha sido eyaculado dentro del aparato reproductor de la hembra y es transportado hacia el oviducto.

El espermatozoide adquiere la capacidad de mover el flagelo en su tránsito por el epidídimo, pero el movimiento empieza después de la eyaculación. Este proceso es conocido como la activación del esperma.

En la capacitación espermática, el espermatozoide pasa de estar inmerso en plasma seminal (compuesto por sustancias como glucosa, colesterol, triglicéridos, albumina, calcio y otros compuestos), para pasar al moco uterino, donde sufrirán cambios como la salida del colesterol, eliminación de glicoproteínas, cambios en la distribución de fosfolípidos, movilización de calcio intracelular. Otras sustancias involucradas encontramos iones de calcio, sodio, cloro, potasio, bicarbonato y hormonas como progesterona y estradiol (Avalos, y otros, 2004). Otro cambio muy marcado en los espermatozoides que han adquirido la capacitación es el aumento de la movilidad flagelar conocido como hipermovilidad (Olivera, Ruiz, Tarazona, & Giraldo, 2006).

4.1.2. Características para la selección del padrote

Para la selección del macho se deben tomar en cuenta el propósito de producción (carne o leche), para luego tomar en cuenta aspectos como: “ser el más pesado del rebaño, con pecho amplio y tronco bien desarrollado, cuerpo en excelente condición y patas fuertes, no debe tener defectos físicos, ser mellizo y agresivo, tener buena conformación sobre el cuello y hombros, y buenas características de semen” (OEIDRUS, s.f).

4.1.3. Entrenamiento del padrote

El entrenamiento del cabro inicia con el reconocimiento y adaptación de la persona que lo va a manejar, primero se colocan bozales y amarrarlos, luego darles masajes y hablarles, de manera que se acostumbren a la presencia humana, además de alimentarlos bien. Luego de esto es necesario el uso de hembras en celo, inducidas con estrógenos a dosis de 0.5 cc intramuscular 3 – 4 días antes de la extracción, como lo recomiendan (Gibbons & Cueto, 2007). Se inmoviliza a la hembra en un potro de sujeción o caballete, el operario se sitúa en el lado derecho de la hembra con la vagina artificial, en el momento del salto se dirige con la mano el pene hacia el interior del artefacto, se procura tomarlo del prepucio para evitar la extracción del mismo, cuando el pene entra en contacto con la vagina, el semental hace el golpe de riñón y eyacula dentro del extremo superior del tubo recolector.

4.2. Métodos de extracción de semen

Los métodos para la extracción de semen deben tomarse muy en cuenta a la hora de desarrollar un plan de inseminación artificial, por eso Cueto M. , Gibbons, Macarena, Galarraga, & Fernandez (2016) mencionan: “La calidad del semen que vayamos a utilizar

al momento de la inseminación, depende tanto del método y época de recolección, como del estado general de los reproductores”. Los métodos más usados y de bajo costo en la extracción de semen caprino son el uso de una vagina artificial y el uso de un electroeyaculador.

4.2.1. Electro Eyaculador

El principal y más importante uso del electroeyaculador es la obtención de semen de forma rápida y fácil para la evaluación reproductiva de los machos. El uso del electroeyaculador es fácil de realizar, no requiere hembras en celo ni equipo para la monta y se lo puede realizar en campo abierto (Gomez, 2013).

Gomez (2013) también indica que el uso del electroeyaculador puede contaminar la muestra con residuos de orina si no se prepara adecuadamente al macho; por tanto, la extracción por electroeyaculación disminuye la concentración de espermatozoides en el eyaculado por lo que es aconsejable su uso en fresco para inseminación directa.

4.2.2. Vagina Artificial

La vagina artificial es un método efectivo para la extracción de semen en cabros. “La recolección de semen mediante la vagina artificial es el método más usado en ganado ovino y caprino, debido a su rapidez y limpieza permitiendo la obtención de varios eyaculados consecutivos” (Muñoz, 2018)

Muñoz (2018) también indica que esta unidad (vagina artificial) proporciona la temperatura, presión y lubricación adecuada para provocar la eyaculación.

La manipulación y presencia del hombre puede resultarle al cabro estresante he inusual, siendo esta una desventaja ya que los cabros pierden la excitación y por lo tanto no hay eyaculación, es por esto que el cabro debe pasar por un proceso de entrenamiento que le ayude a adaptarse, Rodrigues, Gonzales, Vargas, & Herrera (2018) mencionan: “Inicialmente es común entrenar los machos con hembras en celo natural o sincronizado, y posteriormente y con algo de práctica puede utilizarse cualquier hembra, aún sin estar en celo”.

4.3. Evaluación seminal

El análisis del líquido seminal o espermiograma consiste en varias pruebas de tipo macro y microscópico, para evaluar las características del semen y determinar si la muestra es viable o no para el uso en inseminación artificial.

4.3.1. Características macroscópicas

La valoración macroscópica estará determinada por la valoración visual del color, densidad, aspecto y presencia de algún material extraño, así como el volumen.

Color del semen: El semen del cabro es de color blanco o amarillento con apariencia cremosa, Cueto, et al (2011) mencionan que el color rojo indica la presencia de sangre; los colores grises son indicadores de la presencia de alguna infección o anomalías. Sin embargo, se pueden encontrar muestras de material seminal de color verde-amarillento, lo cual corresponde con un pigmento llamado riboflavina que se produce en las glándulas vesiculares y que es inocuo; esto no debe confundirse con orina, la cual tiene un olor característico (Hafez, 2003).

Volumen: Puede variar su eyaculado, pero en promedio es de 1-1.2 ml en cabros, pero está en dependencia de la condición del animal, frecuencia y método de recolección (Gallego, 2006).

4.3.2. Concentración espermática

Arrebola, Pérez, & Moreno (2010) explican que la concentración espermática va de 3.5 a 6 mil millones de espermatozoides por mililitro. El conteo espermático que se llevó a cabo para la investigación fue el explicado por, Cueto et al. (2016) quienes usaron la cámara de Neubauer, siguiendo los siguientes pasos: se adhiere un cubre objeto a la cámara, ejerciendo presión, luego se aspiran 5 microlitros de semen en una micropipeta (haciendo previa homogenización del eyaculado) y se diluyen los 5 microlitros de semen en un tubo de 2 ml de líquido de dilución (puede ser agua común). (Dilución 1/400)

Luego de agitar el tubo con el semen diluido, se carga la micropipeta con 10 microlitros del líquido, luego se descarga la micropipeta en el borde de la unión cubreobjeto y cámara y que esta se distribuya por capilaridad y verificar no quede burbujas de aire. Luego de esto se colocó la cámara bajo el microscopio bajo 100 aumentos, si los espermatozoides no están distribuidos uniformemente bajo la cámara debe repetirse la operación.

Luego se deja reposar la dilución para iniciar el recuento, al iniciar el recuento se cuentan el número de espermatozoides en un cuadrado grande por cada cuadrante, y se repite el conteo en uno de los cuadrantes elegido al azar, para completar 5 cuadrados. Llevando este procedimiento a cabo se procede a calcular:

La concentración se calcula multiplicando la suma de los espermatozoides contados en los 5 cuadrantes por 12,800,000. Esto corresponde a:

Dilución 1:400, volumen correspondiente a 16 cuadrados grandes= 0.1mm³

Espermatozoides en 0.1 mm³ de espermatozoides = suma de los espermatozoides en los 5 cuadrantes x 400 x 16

Esp/ml = suma de los espermatozoides en los 5 cuadrados x 400 x 16 x 10000

Esp/ml = suma de los 5 cuadrados x 12,800,000 (constantes = 400x16x10000/5)

Recordar 1ml = 1cm³= 1000mm³

4.3.3. Motilidad masal

Definida como el movimiento en remolinos del total de espermatozoides de la muestra. Es valorada de forma subjetiva en una escala de 0 a 5, el valor más alto cuando los movimientos son rápidos y vigorosos, y cero cuando no hay movimiento en ondas (Phillips, Evans, & McGowan, 2004).

4.3.4. Motilidad progresiva

Es una prueba utilizada para tener una aproximación a la calidad del semen, es necesario el uso de un microscopio compuesto y mantener el semen a una temperatura de 30 a 37 °C. El procedimiento utilizado es el recomendado por (Catena & Cabodevila, 1999).

La motilidad y el vigor de los espermatozoides es evaluada inmediatamente luego de descongelado en baño maría a 37°C y luego de 2 horas de incubación en los mismo 37°C, el método utilizado fue la estimación visual rápida, sin efectivamente contar células. Para las estimaciones se coloca una gota de semen delgada y uniforme entre el porta y cubre objetos tibios, evaluando a 100 aumentos en el microscopio, se evalúan los espermatozoides con motilidad progresiva y luego de 2 horas la tasa de progresión o termorresistencia, utilizando la siguiente escala:

0= sin movimiento

1= ligera ondulación o vibración de cola, sin progresión

2= progresión lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento.

3= Movimiento progresivo continuo y moderada velocidad.

4= Movimiento progresivo rápido

5= Movimiento progresivo muy rápido, en el cual las células son difíciles de seguir visualmente.

Se determina semen de calidad cuando después de descongelar muestran un 40 a 50% de motilidad progresiva con escalas de 4-3, después de 2 horas de tasa de progresión estos tienden a disminuir un 10 a 15% con escalas de 1.

4.3.5. Viabilidad

Es una técnica que permite diferenciar las células vivas de los muertos, el procedimiento más usado es la tinción con eosina-nigrosina. El procedimiento muestra una extensión donde aparecen células vivas de color blanco sobre un fondo purpura, o células rosas si están muertas, se utiliza el proceso recomendado por Peña & Linde (2000):

Para realizar el procedimiento se toman 4 µl de la muestra con espermatozoides y se mezclan con 4 µl de solución de eosina al 0.5 % mezclando suavemente y permitiendo la tinción por dos minutos. Se realiza la observación en aumento de 40X en diferentes campos para observar espermatozoides con una coloración rojiza, aquellos que hayan perdido la permeabilidad celular se consideran muertos, y por otra parte aquellos sin coloración indican que conservan la permeabilidad, se consideran como vivos. Se cuentan al menos 100 espermatozoides en total, haciendo la diferencia entre vivos y muertos y de esta manera se determina el porcentaje de vitalidad.

Björndahl, Söderlund, & Kvist, (2003) evaluaron la técnica de tinción eosina-nigrosina, cuya solución consistía en 0.67% de eosina y 10% de nigrosina con cloruro de sodio al 0.9% en 100 ml de agua destilada con calentamiento suave; al igual que el autor anterior clasificaron a los que tenían tinción rosa o roja como muertos, y los que no tenían tinción como vivos, sin embargo hubo una excepción, mencionan que los espermatozoides con un ligero aspecto rosado restringido a la región del cuello, fueron evaluados como vivos.

4.3.6. Test de termorresistencia

Luego de la eyaculación o inseminación artificial, las células espermáticas necesitan varias horas para alcanzar el ovulo. Maeder et al, (2012) explican que la prueba de termorresistencia tiene por principio la exposición de los espermatozoides a condiciones fisiológicas de temperatura similares a las condiciones del aparato reproductor femenino, a fin de evaluar la capacidad del esperma de mantener la motilidad espermática, es utilizada para determinar la vitalidad del semen luego de descongelado. La prueba consiste en incubar las muestras diluidas en baño maría a 37-38 °C durante 2-3 horas, o incluso más tarde, la motilidad espermática se puede hacer antes y después del test (Ferreira, 1993)

4.4. Diluyentes

Salamon y Maxwell (como se citó en Tabarez, 2014) definen que un dilutor es aquel que proporciona a las células espermáticas, una fuente de energía protege a las células del daño relacionado con la temperatura, mantiene un pH óptimo y osmolaridad adecuada para que los espermatozoides puedan sobrevivir en periodos cortos y largos de tiempo.

En investigaciones realizadas por Fiser et al. Y Garde et al. Como se cito en Muñoz (2018) Indican que un dilutor debe contener, moléculas que protejan los espermatozoides contra el frío, contener la capacidad de mantener un pH neutro, ser isotónico con el plasma seminal, cuando es utilizado en refrigeración e hiperosmótico en congelación, estar libre de bacterias y contaminación por lo cual se debe incluir antibióticos en su fórmula, contener un suministro de energía como lo es la glucosa y fructosa, y aumentar el volumen del eyaculado para obtener en varios servicios de inseminación.

Tampones: “Los medios para la conservación espermática deben incluir sustancias de tipo iónico que mantenga una adecuada presión osmótica y que protejan los cambios bruscos de pH. El plasma seminal secretada por las glándulas bulbouretrales tiene la función de amortiguar los cambios de pH in vivo, pero no bajo condiciones in vitro” (Tabarez, 2014). Debido a esto es que se requiere integrar sustancias que ayuden a los cambios de pH en los medios diluyentes para la conservación de semen.

En un conjunto de investigaciones realizadas por Purdy, y otros (2010) Explican “que en los diluyentes se deben utilizar tampones que ayuden a reducir los cambios bruscos de pH”. Sustancias tales como Tris, Ácido Cítrico, Citrato de Sodio entre otros, son utilizadas en

los diluyentes para realizar esta función (protección de semen ante los cambios de pH.) En la utilización de citrato de sodio Muñoz (2018) utiliza 2.9 gramos en 100ml de agua destilada obteniendo buenos resultados. En la investigación realizada por Dunner 1991 (como se citó en Cortes S. , 2000) indica que la cantidad adecuada de ácido cítrico utilizado en los diluyentes para conservar semen es de 0.9 gramos en una dilución de 100 ml de agua destilada.

Glicerol: en 1984 el investigador Mazur y Medeiros (2002) como se cito en Garcia (2014), determinó que la función principal del glicerol es el aumentar el volumen y la proporción de agua en estado de no-congelación, haciendo disminuir las concentraciones de los electrolitos y minimizando los efectos de solución, por otra parte, el glicerol consigue disminuir el volumen de agua intracelular disponible para congelarse, disminuyendo la cristalización del agua al momento de congelar el semen. En una investigación realizada por Gao como se citó en Garcia (2014), indica que el glicerol que se combina a 5° C da mejores resultados que al mezclarlo a 30 °C, Barbas & Mascarenhas (2009), mencionan que en la congelación de semen el rango de glicerol más usado es entre el 6% a 8%, ya que niveles superiores causan daño a las células disminuyendo su supervivencia.

Glucosa: sirve como fuente de energía en los diluyentes para la conservación de semen caprino, Watson (como se cito en Ramónes, 2013) menciona que la glucosa se emplea como fuente de energía requerida para la movilidad y conservación de semen caprino, y que además protege sus reservas intracelulares.

En la investigación realizada por Cárdenas (2008) indica: “que la dosis preferible de glucosa para conservación de semen caprino debe ser del 0.9% de todo el diluyente”. Siendo así, si el diluyente tiene 100 ml en su composición total, la glucosa debe ocupar de 0.8 a 0.9 gramos en esta composición (total del diluyente).

Antibiótico: en todos los diluyentes para la conservación de semen, ya sea para cabros, toros, cerdos etc. se utilizan antibióticos para prevenir el desarrollo de un patógeno en el diluyente. En una investigación realizada por Rodrigues, Duque, & Restrepo (2016) “determinaron que el uso de los antibióticos basados en penicilina y estreptomicina, en la criopreservación de semen equino, reduce la proliferación de bacterias, pero que también reduce la movilidad espermática post-descongelación.

En el diluyente descrito por Gibbons, Cueto, & Wolff, (s.f) para la conservación de semen caprino, usan 1000 UI de penicilina y 1 mg de estreptomicina por ml de diluyente. En la investigación realizada por Vargas (2016) utiliza 100,000 UI de penicilina sódica y 100 mg de estreptomicina en un diluyente a base de yema de huevo y otro a base de leche descremada utilizando 100ml de agua destilada.

Agua destilada: para aumentar el volumen de los eyaculados de semen caprino se utiliza agua destilada, siendo esta una fuente pura, incolora, inodora, y con un pH neutro, indicada para cumplir esta función en los diluyentes para la crioconservación de semen caprino.

Dosis

La dosis está relacionada con la concentración espermática del semen, en las investigaciones antes citadas se han utilizado la relación 1:1, de diluyente y semen diluido respectivamente. Balcazar & Porras, (2013), consideran que el numero adecuado de espermatozoides después de descongelar y, para obtener una buena fertilización debe ser de 300×10^6 en un volumen de 0.5 a 0.25 ml. Colas, Zlaterev y Laghford (citados en Artiga, Vázquez, Martinez, Garde, & Perez, 1993), explican que existe diferencias cuando se insemina con 300, 400, y $500 \times 10^6 / 0.25$ ml; en concentraciones del 60 al 100×10^6 la fertilidad se mantiene de 64.5 a 65.4, en cambio si utilizamos 40×10^6 la fertilidad baja considerablemente. Es importante mencionar que para la fertilidad por vía vaginal es necesario aumentar la concentración del número de espermatozoides hasta un 250×10^6 en 0.25 ml, así mismo en dosis de 0.5 ml la concentración debe estar en un rango de 100 – 400×10^6 espermatozoides, debajo de esto la fertilidad disminuye.

El volumen del eyaculado va a estar influenciado por diversos factores (Ebrahim B. , 2011) que trabajo con 15 cabros con edades en promedio de 3,5 años menciona que el volumen del eyaculado va de 1,5 a 5 mililitros en promedio y con un máximo de 7 mililitros. Se destaca que la abstinencia sexual y el nivel de excitación previa son factores determinantes en cuanto al volumen del eyaculado, y tomando en cuenta el tiempo, siendo otro factor importante, en invierno la densidad por ml de espermatozoides fue de 35 millones y en verano con una densidad de 80 millones, esto nos demuestra que las condiciones varían en cuanto la densidad de espermatozoides y volumen del eyaculado.

4.4.1. Yema de huevo

La yema de huevo se ha utilizado ampliamente para diluir líquido seminal de diferentes especies ya que se le atribuyen factores de protección espermática o como buffer osmótico, debido a la presencia de lipoproteínas, lecitinas y glucosa, se adhiere a la membrana celular del espermatozoide formando una barrera protectora, además provee nutrientes, por tanto preserva la motilidad y viabilidad (Martinez, Duverger, Diaz, & Interian, 2011). La yema de huevo tiene alto peso molecular y baja densidad lipoproteica, brindando protección contra el choque térmico.

En una investigación realizada por Bispoa, y otros, (2011) mencionan que la yema de huevo es empleada de manera rutinaria en los diluyentes debido a su efecto protector contra el choque térmico, ya que cuenta con proteínas de baja densidad, las cuales se adhieren a la membrana celular durante el periodo de preservación previniendo el daño celular.

La yema de huevo bien puede utilizarse frescos o en polvo, Tabarez (2014) en una investigación donde compararon la yema de huevo en polvo y la yema de huevo fresca en la dilución para la conservación de semen caprino, indica que la yema de huevo en polvo puede sustituir a la yema de huevo clarificada (fresca) en la congelación de semen caprino, ya que, tomando en cuenta la edad del donante (cabros jóvenes y adultos) no se observó diferencia alguna en ningún tipo de yema de huevo analizada(...). La yema de huevo clarificada no impuso ninguna mejora, pero si desventajas a la hora de elaborar los diluyentes. Los huevos deben ser frescos, menos de 4 días, desde la puesta hasta el momento de su utilización (Muños, 2018).

La cáscara de huevo debe ser desinfectada, limpiando con alcohol, y se deja secar, posteriormente romperla para extraer la yema. Luego se separa la clara de la yema, se sitúa sobre un papel toalla, cuidando de que no se rompa su membrana. El resto de clara puede terminar de separarse haciendo rodar la yema suavemente sobre el papel, y luego se extrae la yema atravesando la membrana de esta última con una jeringa, se extrae la yema desde el interior y se enrasa la cantidad necesaria en la probeta (Rojas, 2017).

La preparación de un diluyente a base de yema de huevo descrita por Simón citado por Palomino, Camacho, Huanca, & Falcon (2001), se realiza de la siguiente forma: usando 2.9

gramos de citrato de sodio, 100 cc de agua destilada, 500,000 UI de penicilina y 2 gramos de estreptomicina, del 100% de esta mezcla se añade un 20% de yema de huevo.

4.4.2. Leche de vaca

La leche de vaca al igual que la yema de huevo es de uso común en la criopreservación de semen caprino. Almenar, (2007) menciona: "que, las micelas de las caseínas y la lactosa presente en la leche descremada son las principales responsables de disminuir los daños por enfriamiento y congelación ya que secuestran proteínas presentes en el plasma seminal que tras la eyaculación inducen la pérdida de colesterol y fosfolípidos de las membranas plasmáticas de los espermatozoides".

"La leche de vaca puede emplearse tanto entera, descremada, UHT o en polvo para reconstituir y servir como diluyente en la criopreservación de semen" (Vaca, 2017). La leche de vaca es un compuesto clásico en la preparación de diluyentes para semen, De la Vega (como se cito en Valdez, 2013) menciona que la leche de vaca posee una sustancia llamada lactenina que es toxica para los espermatozoides por lo tanto para ser empleada debe ser descremada y llevada hasta el punto de ebullición por 15 minutos con lo que se inhibe la lactenina presente en la leche, también indica que al calentarse la leche promueve el desdoblamiento de la lactosa a glucosa y galactosa, los espermatozoides pueden utilizar como fuente energética de mayor disponibilidad, Maxwell y Evans (como se cito en Cortes S. , s.f) indican que al utilizar leche descremada o entera, esta debe ser sometida a temperaturas de +92°C o +95°C sin llegar a hervir, para anular los efectos toxicos antes mencionados.

En la mayoría de los diluyentes, en los cuales utilizan leche descremada, usan dosis de un 10% de leche en todo el diluyente, siendo así, en un diluyente de 100 ml, se usan 10 ml de leche respectivamente. (Palomino, Camacho, Huanca, & Falcon, 2001) (Cueto M. , Gibbons, Macarena, & Fernandez, 2016) (Buitrago & Pérez, 2008). Para la elaboración de diluyente a base de leche, Buitrago y Pérez (2008) mencionan que la leche debe calentarse en baño maría solo diluida en agua destilada, y agregar los demás componentes de la dilución cuando está ya se encuentre a temperatura ambiente, especialmente los antibióticos.

4.4.3. Leche de cabra

Si bien es cierto que la leche de vaca es muy utilizada en la conservación de semen caprino, sin embargo, Leboeuf y Purdy (como se citó en Almenar, 2007) observaron que cuando en el medio de congelación se usa leche descremada de vaca, la lipasa BUSgp60 del plasma seminal, hidroliza los triglicéridos de la membrana plasmática y de la leche, dando lugar a ácidos grasos libres como el oleico, que resultan tóxicos para el espermatozoide, por tanto (Purdy P. , 2005) recomienda el uso de leche de otras especies diferentes al bovino, con una distribución de triacilgliceridos y ácidos grasos diferentes, inhibiendo la catalización por parte de la lipasa.

Una investigación realizada por Vega, et al, 2007, al realizar análisis bromatológicos a leche de cabra Alpina y Saanen encontraron intervalos en pH: 6.17-7.71 y 5.2-6.71 respectivamente, densidad: 1.035-1.039 y 1.021-1.053 g/ml, grasa: 3.96 y 3.5 %, proteína: 3.27 y 3 %. La leche de cabra, según Amiot y Alaiz (como se menciona en Pardo, 2015), explican que la caseína en esta especie es más pequeña (50nm) en comparación con la leche de vaca, además, explican que la principal causa de este menor tamaño está asociado a la ausencia de aglutinina, una proteína encargada de concentrar los glóbulos grasos, produciendo lípidos más complejos y de mayor tamaño, además representa el 83 % de las proteínas frente al 80% de la leche de vaca, mencionan que la leche de cabra no contiene caseína alfa 1. En relación al componente lípido, en la leche de cabra se encuentran lípidos simples como los diacilgliceroles, fosfolípidos, esteroides y el colesterol (Park, Juarez, Haenlein, & Ramos, 2007).

Pasteurización y Ultra pasteurización (UHT) de la leche

La UHT consiste en exponer la leche durante un corto periodo de tiempo, a una temperatura que oscila entre 130 – 150°C durante 2 a 8 segundos que asegura la destrucción de todos los microorganismos y la inactividad de todas sus formas de resistencia (esporas) seguido de un rápido enfriamiento. Esto se hace de una forma continua y en recinto cerrado (Osorio, s/f). En cambio, según la FAO (2011), la pasteurización se realiza al calentar la leche a 72° C por 15 segundos, luego cuando la leche baje a 38° C, se realiza un shock térmico con agua fría o hielo.

4.4.4. Triladyl

El Triladyl es un concentrado para la preparación de un diluyente de crioconservación de semen basado en TRIS. Los diluyentes que contienen TRIS (Hidroximetil Aminometano) se refieren a solución de citrato como buffers (sales hidrolíticamente activas) y glucosa como fuente de energía (Cueto M. , Gibbons, Macarena, & Fernandez, 2016).

Preparación

“El diluyente listo se compone de una parte de concentrado de Triladyl, tres partes de agua pura estéril y de una parte de yema de huevo, en relación 1:3:1” (Escudero, 2015).

Escudero (2015) explica el proceso de combinación donde indica que la solución madre se prepara vertiendo una parte de concentrado de Triladyl (20 %) en un matraz graduado (frasco de vidrio), y agregando en varios pasos 60 % de agua pura estéril. (...) Para completar el diluyente, deben agregarse a la solución madre 20 % de yema de huevo fresca, siempre y cuando se mantenga la proporción de Diluyente: Agua: Yema. Inmediatamente tras su llegada al laboratorio, el eyaculado debiera ser evaluado y entonces diluido en relación 1:1 (diluyente mezclado: semen).

4.5. Métodos de conservación

La conservación de espermatozoides, para uso de inseminación artificial, se ha practicado ampliamente mediante métodos de refrigeración y congelación.

4.5.1. Semen refrigerado

Cuando hablamos de refrigeración, se refiere a una conservación de semen de entre 4 a 5°C, para la refrigeración de semen (INIA, 2005) utilizaron un método de enfriamiento gradual, hasta llegar a los 5°C en un periodo de 1.5 horas, con el semen ya diluido en los diluyentes a base de yema de huevo y de leche descremada.

El proceso de enfriamiento es de gran importancia, ya que los espermatozoides tienden a sufrir lesiones en este proceso, Watson (como se cito en Garcia, 2014) explica que al utilizar crioprotectores al momento de congelar o refrigerar el semen hay una optimización del proceso con este (crioprotector), de manera que entre más concentraciones se añaden en los diluyentes, se requiere utilizar velocidades de enfriamiento más rápidas.

4.5.2. Semen congelado

La congelación de semen para su conservación se realiza a temperaturas de -154 a -196°C , Evans (como se cito en Buitrago & Pérez, 2008) describe dos pasos para preparar el semen a la congelacion, el primero indica que al tener el diluyente toltal (semen y diluyente) incluyendo el glicerol, este pasa a un proceso de enfriamiento de entre 1.5 a 2 horas hasta llegar a los 5°C , para luego someterlo a congelacion, el segundo paso consiste en someter a refrigeracion el semen diluido sin glicerol hasta llegar a los 5°C , cuando este a estas temperaturas, si adiciona el glicerol a temperatura de 5°C tambien, para luego pasar a congelar.

En diferentes investigaciones que usan metodos de conservacion de semen en congelacion, mencionan que se requiere bajar las temperaturas gradualmente, INTA (como se cito en Buitrago & Pérez, 2008) usan una caja de icopor con tapa, que les permite tener nitrogeno liquido(N), y ubicar las pajuelas a 20 cm de distancia del N, este tapado y por 2 minutos, luego lo taparon, pasados los 2 minutos, ubicaron las pajuelas a 9cm de distancia entre el N, por 3 minutos y final mente se sumerguieron en el N a -196°C en un termo. En una investigacion (Noel, 2017), utilizaron vapores de N para descender gradualmente la temperatura del semen a razon de 20°C por minuto, durante 7 minutos y preparalo para la congelacion, luego sumergieron las pajuelas en N en un termo.

Las formas de descongelación de semen para el usarlo en inseminación artificial son más simples, Evans (como se cito en Buitrago & Pérez, 2008), dice que se puede usar el metodo de inmercion directa, en agua a 37°C durante 10 a 30 segundos llegando la dosis a temperaturas de 18°C a 20°C que favorece la manipulacion a corto tiempo.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Ubicación geográfica

El estudio se realizó en el área caprina de la Universidad Católica del Trópico Seco, ubicada en el Km 166.5 de la Carretera Panamericana Norte en el departamento de Estelí, en las coordenadas 13°14'39''N y 86°22'29''W, a una altura de 865 msnm (Figura 1). En el área se manifiestan las condiciones climáticas del trópico seco. El suelo es arcilloso, los animales son manejados bajo un sistema de semi-estabulación (figura 1).

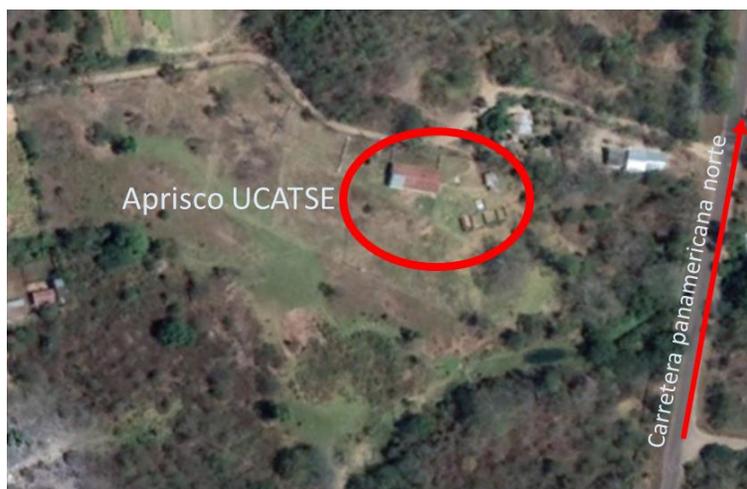


Figura 1. Ubicación geográfica del experimento, Fuente: Google Hearts

5.2. Población y muestra

El experimento estuvo compuesto por 160 pajuelas, de la siguiente manera, 4 tratamientos con 4 repeticiones, y cada repetición con 10 muestras.

Tipo de estudio

Es una investigación experimental de tipo explicativa, ya que se evaluó el efecto del diluyente sobre el semen.

5.3. Definición de variables con su operacionalización

En la tabla 1 se describen las variables que se evaluaron en el estudio, incluyendo su definición conceptual, indicador, unidad de medida.

Tabla 1. Matriz de conceptualización y operacionalización de variables del estudio

Variable	Definición conceptual	Indicadores	Unidad de medida	Fuente	Instrumento
Color de semen	Coloración de semen eyaculado	Color: Rosado=Sangre Verde=infección blanco a cremoso= Normal	Cualitativo	Muestra	Hoja de campo
Concentración espermática	Cantidad de espermatozoides por ml de semen	3.6 millones a 7 millones de espermatozoides por ml es normal	Millones/ml	Análisis de laboratorio	Hoja de campo
Motilidad	Estimación visual del porcentaje de espermatozoides móviles	Escala subjetiva 0-5	%	Análisis de laboratorio	Hoja de campo
Test de termorresistencia	Exposición de los espermatozoides a condiciones de temperatura similares al aparato reproductor femenino.	Motilidad: Valoración subjetiva de 0 a 5 para motilidad. Viabilidad: Porcentaje de vivos y muertos	%	Análisis de laboratorio	Hoja de campo
Relación Beneficio Costo	Relación existente entre el costo del uso de los diluyentes y el resultado obtenido	R B/C > 1 relación positiva R B/C < 1 relación negativa R B/C = 1 relación indiferente	%	Análisis de resultados IOR	Hoja de campo

5.4. Diseño experimental

Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) (Mismo utilizado en Muños (2018)) (Anexo: 1) , se extrajo una muestra de semen de un macho, posteriormente se evaluaron 3

tratamientos más 1 testigo y 4 repeticiones, en total 16 unidades experimentales (UE), cada UE estará contenida por 10 muestras de semen, totalizando 160 muestras seminales.

Tratamientos:

T1: semen + leche UHT

T2: semen + leche de cabra P

T3: semen + yema de huevo

T4 (testigo): semen + TRILADYL

Las muestras de semen procesadas con cada tratamiento fueron contenidas en pajuelas de 0.5 ml de capacidad, conservadas en un termo con nitrógeno líquido a temperaturas de -154 a -196 °C, como lo explica Evans (citado en Buitrago & Pérez, 2008), todas las muestras fueron evaluadas.

El modelo aditivo lineal (MAL) es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

- $i = t$ Tratamientos
- $j = n$ repeticiones
- Y_{ij} = La j -ésima observación del i -ésimo tratamiento
- μ = Es la media poblacional a estimar a partir de los datos del experimento
- τ_i = Efecto del i -ésimo tratamiento a estimar a partir de los datos del experimento
- ε_{ij} = Efecto aleatorio de variación

5.5. Manejo del experimento

Primeramente, se evaluó el estado sanitario del macho cabrío, evaluado el padrote, se extrajo el semen con la vagina artificial la cual se elaboró artesanalmente usando un tubo PVC de 2 pulgadas y 10 cm, un neumático de bicicleta número 20, una válvula de neumático y un tubo de recolección graduado.

Se procedió a la evaluación del semen antes de diluir; caracteres como el volumen, concentración y movilidad. Para evaluar la movilidad tomamos una muestra de semen puro y la colocamos en un portaobjetos, se observó en el microscopio con objetivo de 40X.

Mediante el uso de la cámara de Neubauer se calculó la cantidad de espermatozoides por milímetro de semen. Una vez evaluada las variables pre diluidas, se combinó el semen con los diluyentes, todos los dilutores fueron combinados con glicerol, glucosa, penicilina-estreptomicina, citrato de sodio y agua destilada, a excepción del Triladyl (tabla 2), la muestra de semen extraída se dividió entre todos los tratamientos, siendo el tratamiento 1 el diluyente de leche UTP comercial, el diluyente 2 leche de cabra, diluyente 3 yema de huevo y el diluyente 4 Triladyl, cada tratamiento estuvo compuesto por 40 pajillas en sus cuatro repeticiones; seguido el empajillado en pajuelas de 0.5 ml, estas pasaron por un proceso de enfriamiento progresivo hasta alcanzar el nivel de congelación. (Anexo 2)

Tabla 2. Proporción de cada ingrediente en cada medio diluyente con 100 ml de agua destilada.

Ingrediente	Yema de huevo	Leche UHT	Leche cabra P	Triladyl	Fuente
Diluyente natural	20 % (1)	10 % (1)	10 % (1)	20 % (2)	1. (palomino et al, 2001) 2. (Escudero, 2015)
Glicerol	6 %	6 %	6 %	Incluido	Barbas & Mascarenhas (2009)
Glucosa	0.9 %	0.9 %	0.9 %	Incluido	Cárdenas, 2008
Antibióticos	100,000 UI penicilina 100 mg estreptomicina.			Incluido	Vargas, 2016
Citrato de sodio	0.9 gr	0.9 gr	0.9 gr	Incluido	Dunner 1991

Preparación de cada diluyente

La cáscara de huevo se desinfectó con alcohol, y se dejó secar; posteriormente abre para extraer la yema. Luego se separó la clara de la yema se sitúa sobre un papel toalla, cuidando

de que no se rompa su membrana. El resto de clara puede terminar de separarse haciendo rodar la yema suavemente sobre el papel, y luego se extrae la yema atravesando la membrana de esta última con una jeringa, se extrae la yema desde el interior y se enrasa la cantidad necesaria en la probeta.

La preparación del diluyente a base de yema se realizó de la siguiente forma: usando 0.9 gramos de ácido cítrico, 100 cc de agua destilada, 500,000 UI de penicilina y 2 gramos de estreptomicina, del 100% de esta mezcla se añade un 20% de yema de huevo.

El glicerol que se combina a temperatura ambiente, en la congelación de semen el rango de glicerol más usado es entre el 6% a 8%, ya que niveles superiores causan daño a las células disminuyendo su supervivencia. Este se añade de último en todos los diluyentes naturales.

La dosis preferible de glucosa para conservación de semen caprino debe ser del 0.9% de todo el diluyente. Por ende, se ocupa 0.9 gramos de glucosa en la composición del diluyente.

Para la elaboración de diluyente a base de leche de vaca, debe calentarse en baño maría solo diluida en agua destilada, y agregar los demás componentes de la dilución cuando está ya se encuentre a temperatura ambiente, especialmente los antibióticos.

La leche de cabra pasa por el proceso de cocido y enfriado antes, y luego se lleva el mismo procedimiento que se hace para la leche de vaca. Todas las medidas de los componentes del diluyente se miden en matraz y tubos graduados.

Empajillado

El llenado de las pajillas se hace de forma manual, con una micropipeta se vierten 0.5 ml en cada pajilla, la manera de llenarlo es ubicar la punta de la pipeta acostada sobre la pared de la pajilla, para evitar crear burbujas de aire cuando esta se llene; luego, para sellarlo se calienta una pinza o tenaza y se prensa la punta de la pajilla.

Congelación

La congelación de semen para su conservación se realiza a temperaturas de -196°C . Para preparar el semen a la congelación, al tener el diluyente total (semen y diluyente) incluyendo el glicerol, este pasa a un proceso de enfriamiento de entre 1.5 a 2 horas hasta llegar a los 5°C , para luego someterlo a congelación. Se utilizan vapores de N para

descender gradualmente la temperatura del semen a razón de 20°C por minuto usando el tanque criogénico, durante 7 minutos y prepararlo para la congelación, luego se sumergen las pajuelas en N en un termo criogénico.

Para descongelar las muestras se usó el método de inmersión directa, en agua a 37°C durante 10 a 30 segundos llegando la dosis a temperaturas de 18°C a 20°C que favorece la manipulación a corto tiempo. Cada 24 horas se evaluó una muestra por repetición, por un transcurso de 4 días, las variables analizadas fueron termorresistencia y motilidad.

Selección y aplicación de técnicas o instrumentos para la recolección de datos

Para este experimento usamos la técnica de observación con el microscopio, por tanto, se diseñó una hoja de campo (Anexo 3), donde se establecieron las variables antes y después del congelamiento del semen. En motilidad, con el uso de un porta y cubre objetos, las cifras se definieron de manera subjetiva. Para la variable Test de termorresistencia, se diseñó una hoja de campo adicional. Los datos se recolectaron cada 24 horas durante 4 días y se midió una muestra diaria por repetición.

Procedimiento para el análisis de resultados

Dado que es un DCA con un arreglo factorial de 4 x 4 con 10 muestras por repetición, se insertaron los datos en una base de datos en Excel, luego se realizaron una serie de análisis en orden, iniciando con la prueba de normalidad de Shapiro- Wilk, un análisis de varianza (ANDEVA), y separación de medias con Tukey (5%), apoyándonos con el paquete estadístico de INFOSTAT versión estudiantil. Dado que no hubo normalidad se usó un análisis de varianza no paramétrico con Kruskal Wallis.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Características macroscópicas

Previo a la dilución del semen se analizan sus características físicas: volumen, color y concentración espermática.

Volumen: se realizaron 4 recolecciones de semen antes del empajillado, las primeras dos fueron realizadas por la tarde y se obtuvieron 0.5 y 0.75 ml de semen, posterior siguiendo las recomendaciones de Cueto et al, (2016), de hacer extracciones matutinas; las otras 2 extracciones se realizaron por la mañana, obteniendo el primer día 4 ml y 2 ml el segundo día, superando los datos obtenidos de Gallego (2006), que promedia el volumen de extracción entre 1 y 1.2 ml, y siendo similares a las extracciones de Ebrahim (2011) que, en cabros de 3.5 años obtuvo de 1.5 a 5 ml de semen, y comprobando lo dicho por Cueto, que el volumen de extracción va en dependencia de la hora del día.

Color: el semen extraído fue de color amarillento con apariencia cremosa, similar a lo obtenido por Cueto, et al (2011); no se presentaron anomalías en el color como las mencionadas por Hafez (2003), que el color rojo indica la presencia de sangre, grises indican la presencia de alguna infección o anormalidades y amarillo que significa presencia de orina.

Concentración espermática: El conteo espermático realizado en el padrote del aprisco de UCATSE, realizado en la cámara de Neubauer, resultó en 6.5 mil millones de espermatozoides por ml de semen, datos que fueron similares a los parámetros propuestos por Gibbons & Cueto., (2007) que determinaron que el rango de conteo debe oscilar entre 3 y 6 mil millones de esp/ml, los mismos rangos se usaron en análisis realizado por Arrebola, Perez, & Moreno (2010).

6.2. Motilidad post descongelación

La motilidad inmediata post descongelación para cada tratamiento se muestra en la Figura 2, el análisis de varianza según Kruskal Wallis mostró diferencias significativas a partir del día 2. Las primeras 24 horas de congelado el semen los tratamientos se comportaron igual ($p > 5\%$), a las 48 horas el T1 y T2 resultaron ser menores en relación al T3 y T4 ($P < 5\%$).

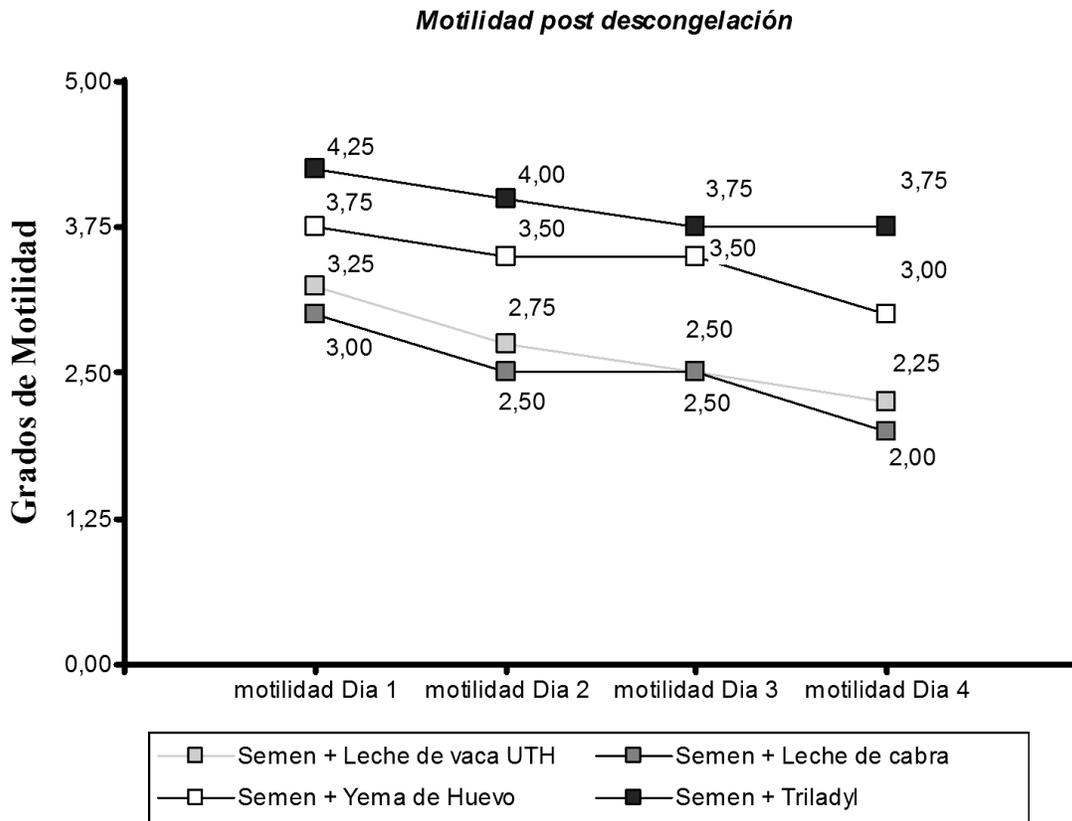


Figura 2. Motilidad post descongelación cada 24 horas durante cuatro días.

En una investigación realizada por Palomino, Camacho & Falcon (2014) obtuvieron resultados similares comparando citrato-yema (A) y leche descremada (B), como dilutores de semen caprino, conservados en refrigeración (4°C) ambas diluciones hasta las 96 horas; al analizar la motilidad, determinaron que la dilución B conservó la motilidad espermática hasta las 48 horas y A hasta las 96 horas (4 días) después de diluido. Vargas (2016), encontró los mismos resultados usando los diluyentes antes citados (B (3.0) vs A (4.25), respectivamente; $P=0.06$). En relación al triladyl, Cortes (2005), comparando la motilidad contra la leche de vaca descremada, el primero resultó ser mejor en comparación al segundo. El ensayo de esta investigación se comportó de manera similar a los autores antes citados; la leche de cabra a pesar de seguir las recomendaciones de Purdy (2005), de usar otro diluyente diferente a la leche de vaca con una distribución de triacilglicéridos y ácidos grasos diferentes, no mostró ser mejor a los demás tratamientos, sin embargo su comportamiento fue similar a la misma (ver tabla 3).

Tabla 3. Comparación de medias en cuanto a la motilidad de los tratamientos cada 24 horas.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
p-valor	0.067	0.014	0.032	0.033
Leche de vaca	3.25	2.75	2.50	2.25
Leche de cabra	3	2.50	2.50	2
Yema de huevo	3.75	3.5	3.50	3
Tryladil	4.25	4 B	3.75 B	3.75 B

B: tratamiento superior o diferente al resto

6.3. Prueba de termo resistencia

La motilidad luego de la prueba de termo resistencia para cada tratamiento se muestra en la figura 3, el análisis de varianza según Kruskal Wallis mostró diferencias significativas a partir del día 3. La termo resistencia en las primeras 48 horas de congelado el semen los tratamientos se comportaron igual ($p > 5\%$), a las 48 horas el T1 y T2 resultaron ser menores en relación al T3 y T4 ($P < 5\%$).

Tabla 4: comparación de medias en la variable motilidad después de termo resistencia

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
p-valor	0.5106	0.0536	0.0231	0.0441
Leche de vaca	1.50	1.00	0.50	0.25
Leche de cabra	1.75	0.75	0.25	0.25
Yema de huevo	1.75	1.50	1.25	0.75
Tryladil	2.25	1.75	1.75 B	1.50 B

B: tratamiento superior o diferente al resto

En la figura 3, la termorresistencia fue disminuyendo, según Cavestany (1994) (como se cita en Cubelo & Rodriguez, 2013), mencionan que la motilidad en esta prueba debe disminuir hasta un mínimo de 15% (1 punto en la escala subjetiva), Catena & Cabodevila (1999) confirman este dato donde mencionan ser un semen de calidad; observamos entonces (Tabla 4), que el único tratamiento que mantuvo su motilidad en la termorresistencia arriba de 1 punto después de las 96 horas fue el triladyl, la leche de cabra y la yema de huevo iniciaron igual, sin embargo bajo hasta igualar a la leche de vaca a las

96 horas, por tanto el tipo de triglicéridos (Purdy P. , 2005) que son diferentes al de vaca, no influyó en la resistencia espermática.

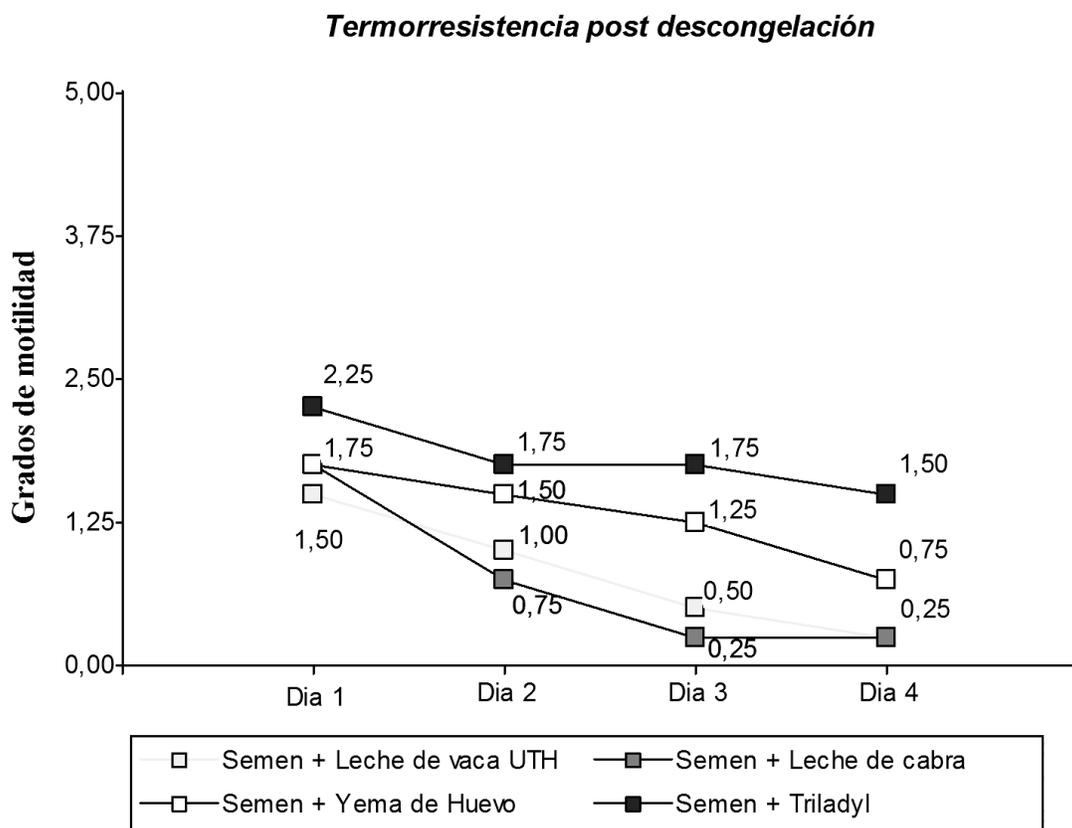


Figura 3. Termo resistencia aplicada a los diluyentes durante cuatro días

6.4. Relación Beneficio Costo

La tabla siguiente muestra la relación beneficio costo de los diluyentes utilizando la metodología IOR:

Tabla 5. Relación beneficio costo

Tratamiento	pajillas	costo total	precio unitario	ingresos	IOR
costos diluyente leche de vaca	200	4332.8395	43.328395	8665.679	2
costos diluyente leche de cabra	200	4333.0795	43.330795	8666.159	2
costos diluyente yema de huevo	200	4342.4795	43.424795	8684.959	2
costos diluyente Triladyl	200	4580.4795	45.804795	9160.959	2

En la tabla podemos verificar el comportamiento de cada uno de los tratamientos en relación a los ingresos, todos los tratamientos tienen resultados iguales, por tanto indica que todos son rentables, ya que existen utilidades positivas (basándonos en el índice IOR: si el resultado es mayor a 1 existe utilidad económica, 1 existe punto de equilibrio y si es menor a 1 perdió dinero; sin embargo si comparamos este resultados con los análisis de motilidad, verificamos que el diluyente triladyl expresa mejor confiabilidad dado sus efectos para conservar el semen por mas tiempo.

VII. CONCLUSIONES

Los espermatozoides son células que requieren de manipulación rápida al momento de unirlos con los diluyentes, a la vez, es necesario acondicionar el área donde se manipula el semen, que exista poca luz, no hayan cambios bruscos de temperatura y no combinarlo con sustancias tóxicas. Las evaluaciones de los diluyentes se realizaron entre el 27 de abril y 17 de mayo, se realizaron 4 evaluaciones, determinando así las características macroscópicas (color y volumen).

Entre las cuatro evaluaciones se obtuvieron volúmenes diferentes, 0.5, 0.7, 4 y 2 ml, estando en los rangos óptimos, la concentración espermática fue de 6.5 mil millones de espermatozoide por ml de semen encontrándose en los rangos óptimos. El color del semen fue amarillento con apariencia cremosa, sin ningún tipo de anomalías.

La motilidad progresiva fue similar en todos los tratamientos en las primeras 24 horas con rangos de 3 a 4 en las repeticiones. De las 48 horas a las 96 los tratamientos con leche de vaca y leche de cabra fueron inferiores a los tratamientos yema de huevo y Triladyl con rangos de 2 a 3 y de 3 a 4 respectivamente. La termorresistencia fue similar para todos los tratamientos hasta las 72 horas, el tratamiento a base de Triladyl mostro superioridad sobre los demás tratamientos en las últimas horas (72 y 96).

La relación benefició cotos fue igual para todos los tratamientos con índice IOR de 2 lo que indica que existe utilidad económica para todos los diluyentes, sin embargo, si nos basamos en la resistencia y durabilidad del diluyente, el triladyl presenta los mejores resultados.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se acepta la hipótesis planteada, siendo el diluyente a base de yema, quien dio mejores resultados en cuanto a la motilidad espermática, diferenciándose de los demás diluyentes naturales en los últimos dos días.

VIII. RECOMENDACIONES

En investigaciones posteriores analizar la variable de viabilidad usando tinciones especiales para tal análisis.

Probar con leche de otras especies diferentes a la bovina.

Alargar el periodo de evaluación para determinar cuánto tiempo duran los espermatozoides hasta dar cero como resultado.

Realizar estudios de estos diluyentes en otras especies domesticas de interés productivo como bovinos, cerdos y ovinos.

En la elaboración del diluyente de yema de huevo, experimentar con yema de huevo en polvo.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Almenar, C. (2007). *Nuevos protocolos para la crioconservación de espermatozoides de macho cabrío*. Tesis magistral, Universitat Politècnica de València, Valencia .
Obtenido de <http://hdl.handle.net/10251/12583>
- Amiridis, G. S. (2012). Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130, 187-192. doi:10.1016 / j.anireprosci.2012.01.014
- Arrebola, F., Perez, C., & Moreno, J. (2010). Limitation of seasonality in reproductive parameters of Mediterranean bucks, using photoperiod treatment. *Small Ruminant Research - SMALL RUMINANT RES*, 31-35. doi:10.1016/j.smallrumres.2009.11.016
- Artiga, C. G., Vázquez, E., Martínez, E., Garde, J., & Perez, J. (1993). inseminacion artificial en pequeños rumiantes. *Revista Mundo Ganadero*, 40-44. Obtenido de https://www.miteco.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_MG%2FMG_1993_6_93_40_44.pdf
- Ávalo, A., González, J., Vargas, A., & Herrera, J. (2018). *Recoleccion y manipulacion seminal in vitro* (primera ed.). Mexico: universidad autonoma metropolitana. Obtenido de: http://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/recoleccion_manipulacion.pdf
- Avalos, Ortiz, Ortega, Vergara, Rosado, & Rosales. (2004). Fluorometric study of rabbit sperm head membrane phospholipid asymmetry during capacitation and acrosome reaction using Annexin-V. *Arch Androl.*(4), 273-285. doi:10.1080 / 01485010490448741
- Balcazar, J. A., & Porras, A. (2013). *Manual de practicas en manejo reproductivo de ovino y caprinos*. Mexico: Universidad Nacional Autonoma de Mexico. Obtenido de http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales_2013/Manual%20de%20Practicas%20de%20Profundizacion%20en%20Reproduccion%20Animal%20Ovinos%20y%20Caprinos.pdf

- Barbas, J. P., & Mascarenhas, R. D. (2009). *Cryopreservation of domestic animal sperm cells*. Springer Science+Business Media B.V. doi:10.1007/s10561-008-9081-4
- Bispoa, C., Pugliesi, G., Galvão, P., Rodrigues, M., Ker, P., & Filgueiras, B. (2011). *Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen Cryopreservation*. *Small Ruminant Research*, 54-58. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/251605993_Effect_of_low_and_high_egg_yolk_concentrations_in_the_semen_extender_for_goat_semen_cryopreservation
- Björndahl, L., Söderlund, I., & Kvist, U. (2003). Evaluation of the one- step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human Reproduction*, 18(4), 813-816. Obtenido de <https://doi.org/10.1093/humrep/deg199>
- Boeta, M., & Zarco, L. (1999). utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen de burro, destinado a la inseminación de yeguas. *Ejournal*. Obtenido de <http://www.ejournal.unam.mx/rvm/vol31-01/RVM31110.pdf>
- Buitrago, J., & Pérez, L. (2008). Comparación de dos diluyentes para la criopreservación de semen ovino. Bogota: universidad de la salle. Obtenido de <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/5987/T14.08%20B868c.pdf?sequence=1>
- Cárdenas, R. (2008). *desarrollo de un centro de procesamiento y conservación de semen caprino en la Estación Experimental "Alfredo Volio Mata" de la Universidad de Costa Rica*. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio.
- Catena, M., & Cabodevila, J. (1999). Evaluación de semen Bovino congelado. *Sitio Argentino de producción animal*, 1-9. Obtenido de http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/05-evaluacion_de_semen_bovino_congelado.pdf
- CORREDOR, L. H. (2014). *Evaluación de la motilidad espermática de semen caprino*. repositorio institucional UNAD, 09.

- Cortes, H. (2005). *comparacion de tres diluyentes (Triladyl, Andromed y leche descremada) en la motilidad progresiva post-descongelamiento de semen caprino*. Academia.edu. Obtenido de https://www.academia.edu/30936045/Comparaci3n_de_Tres_Diluyentes_Triladyl_Andromed_y_Leche_Descremada_en_la_Motilidad_Progresiva_Post-descongelaci3n_de_Semen_de_Macho_Caprino
- Cortes, S. (2000). *Efecto de la conservaci3n sobre la fisiolog3a esperm3tica de semen caprino*. Tesis. Obtenido de <http://webs.ucm.es/BUCM/tesis//19972000/X/3/X3050301.pdf>
- Cubelo, M., & Rodriguez, Z. (2013). *Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en uruguay*. Montevideo: UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA. Obtenido de <https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/2167/FV-29987.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cueto, M., Gibbons, A., Garcia, J., Arrigo, J., & Wolff, M. (2011). *Manual de obtenci3n, procesamiento y conservaci3n del semen ovino*. Argentina: INTA. Obtenido de <http://inta.gob.ar/documentos/manual-deobtencion-procesamiento-y-conservacion-del-semen-ovino/>
- Cueto, M., Gibbons, A., Macarena, M., & Fernandez, J. (2016). Manual de Obtencion Procesamiento y conservacion de semen ovino. *INTA ediciones, II*, 11-12. Obtenido de: https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_manual_de_semen_ovino_2da_edicion.pdf
- Duran, M., Castagna, S., & Texeira, D. (2015). *evaluacion de diferentes diluyentes para semen ovino, fresco y refrigerado*. Montevideo, Uruguay: Universidad de la Republica. Obtenido de <https://studylib.es/doc/3118572/evaluaci3n-de-diferentes-diluyentes-para-semen-ovino--fre...>
- Ebrahim, B. (2011). *Patologia de los espermatozoides en macho cabrio*. Universidad de Ilam. Escuela de Medicina Veterinaria. Ir3n. Obtenido de <http://www.produccion->

animal.com.ar/produccion_caprina/inseminacion_transferencia_caprino/36-Patologia_Espermatozoides.pdf

Ebrahim, B. A. (2011). *patologia de los espermatozoides en machos cabrio . produccion Animal*, 2-3.

Escudero, J. (2015). "*Preservación de semen ovino mediante vitrificación y congelamiento lento utilizando diferentes diluyentes comerciales*". Riobamba-Ecuador: Escuela Superior Politécnica De Chimborazo. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/5256/1/Trabajo%20de%20Titulaci3n.pdf>

FAO. (2011). *Procesos para la elaboracion de productos lácteos*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-bo954s.pdf>

Ferreira, J. (1993). *el agua de coco como dilutor del semen caprino*. FCV-LUZ, 270. Obtenido de http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/23723/articulo_7.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Fierro, S. (2005). *Comportamiento de diferentes diluyentes en base a leche con adición de yema de huevo y glicerol para la preservación de semen de carnero refrigerado (5° C)*:. Montevideo, Uruguay: Universidad de la republica. Obtenido de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/19310/1/FV-26482.pdf>

Gallego, S. C. (2006). *Efectos de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Obtenido de https://books.google.com.ni/books/about/Efecto_de_la_conservaci%C3%B3n_sobre_la_fisi.html?id=ZP2BAQAACAAJ&redir_esc=y

Garcia, W. (2014). *Optimizacion de los protocolos de crioconservacion de semen ovino de las razas autoctonas en peligro de exticion XIsqueta y Arenasa*. Barcelona: Universidad Autonoma de Barcelona. Obtenido de <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/284242/wcgv1de1.pdf?sequence=1>

- Garza, T. V. (s.f.). *Reproduccion de Gnado Caprina. Reproduccion de Ganado Caprino*, 7-8.
- Gibbons, A., & Cueto, M. (2007). *Inseminación artificial con semen fresco en ovinos*. INTA EEA BARILOCHE, 8-12. Obtenido de <https://inta.gob.ar/sites/default/files/imagenes/inseminacion.pdf>
- Gibbons, A., Cueto, M., & Wolff, M. (s.f.). *inseminacion artificial en la especie caprina. reproduccion y genetica*, 2.
- Gomez, C. (2013). *Evaluación de la efectividad de un electroeyaculador*. Quito: UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/4292/1/T-UCE-0014-49.pdf>
- Hafez, B. (2003). *Reproduction in farm animals*. Baltimore/USA. Obtenido de <https://books.google.com.ni/books?id=baz2TC1y2esC>
- INIA. (2005). *Proyecto merino fino del uruguay - FASE I*. Obtenido de <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/9979/1/SAD-439.pdf>
- Jian-Hua Qiu, E. a. (2016). Effects of glucose metabolism pathways on sperm motility. *Theriogenology*. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.03.005
- Leboeuf, B. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal reproduction science*, 62, 113-141. doi:10.1016 / S0378-4320 (00) 00156-1
- López, J. (s.f.). *Colecta de semen*. Obtenido de Colecta de semen: R.Vet - www.reproduccionveterinaria.com
- Macedo, G., A, R., O, H., M, C., A, R., & A, R. (2001). Effect of bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar (V-type) proton ATPases, on the capacitation of rabbit spermatozoa. *Andrologia*(2), 113-121. doi:10.1046 / j.0303-4569.2000.00418.x
- Maeder, B., Arlt, S., Burfeind, O., & Heuwieser, W. (2012). Application of vaginal temperature measurement in bitches. (47), 359-361. doi:10.1111/rda.12100

- Manes, J., & Ungerfeld, R. (2015). Sincronización de celos en ovejas y cabras con dispositivos intravaginales liberadores de. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 1.
- Martinez, J., Duverger, O., Diaz, M., & Interian, L. G. (2011). Efecto de diferentes niveles de yema de huevo en la congelacion del semen caprino en un medio liofilizado a base de tris. *Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical*, 5, 33-38.
- Mejia, V. O., Ramos, C. D., Rivera, R. J., Ordez, L. R., & Palma, I. M. (2008). Congelación de semen de borregos Cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*) obtenido mediante electroeyaculación o post.morten. *Fondo Editorial ujat*, 205-215. doi:978-968-9024-42-2
- Muñoz, A. (2018). *Estudio comparativo de tres diluyentes (Andromed, Triladyl y citrato de sodio con yema de huevo) en la preservacion de semen caprino*. Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro. Obtenido de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/45220/K%2065485%20Mu%C3%B1oz%20Cuevas%20Aldo%20Kevin.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Muñoz, A. (2018). *estudio comparativo de tres diluyentes (Andromed, Triladyl y citrato de sodio con yema de huevo) en la preservacion de semen caprino*. Coahuila, Mexico: Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro. Obtenido de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/45220>
- Noel, A. (2017). *"Dilucion y congelacion de semen de macho cabrio con el uso de dos dilutores Tris y Triladyl"*. Tesis de grado, Lima. Obtenido de <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3370/noel-rojas-ana-maria-cecilia.pdf%3Fsequence%3D1%26isAllowed%3Dy&ved=2ahUKEwj5rsrT28fkAhUio1kKHxQ1AcMQFjAIegQIARAB&usg=AOvVaw3k39nEies4QP7nd>
- OEIDRUS. (s.f). *Mejoramiento Genetico*. OEIDRUS. Obtenido de http://www.agronuevoleon.gob.mx/oeidrus/ESTUDIOS_E_INVESTIGACIONES/GANADERIA/manules%20caprino/manual6.PDF

- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de ciencias pecuarias*, 19(4), 426-436. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v19n4/v19n4a08.pdf>
- Osorio, M. (s/f). *Leches de consumo pasteurizacion (HTST) homogenizacion ultrapasteurizacion (UHT)*. Obtenido de ACADEMIA.EDU: https://www.academia.edu/29138340/LECHES_DE_CONSUMO_PASTEURIZACION_HTST_HOMOGENIZACION_ULTRAPASTEURIZACION_UHT
- Palomino T., L., Camacho S., J., & Falcon, N. (2014). *Conservación de semen caprino en los dilutores citrato-yema y leche-descremada yema* (Vol. 12). Peru: Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. doi:10.15381/rivep.v12i1.7417
- Palomino, L., Camacho, J., Huanca, W., & Falcon, N. (2001). *Conservacion de semen Caprino en los dilutores citrato-yema y leche-descremada yema*. Obtenido de <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/download/7417/12609/>
- Pardo, C. (2015). *Calidad de leche y queso de cabra*. RIDAA UNICEN. Obtenido de <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/handle/123456789/545>
- Park, Y., Juarez, M., Haenlein, G., & Ramos, M. (2007). Phisico-chemical Characteristics of Goat and Sheep Milk. *Small Ruminant Research*(68), 88-113. doi:10.1016 / j.smallrumres.2006.09.013
- Peña, A., & Linde, C. (2000). Effects of spermatozoal concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 703-718.
- Phillips, N., Evans, G., & MCGOWAN, M. (2004). Measures used to assess frozenthawed semen in Australian livestock semen processing centres.
- Purdy, P. (2005). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63, 215-225. doi:10.1016/j.smallrumres.2005.02.015
- Purdy, P., moce, E., Estobar, R., Murdoch, W., Moss, G., Larson, B., Blackburn, H. (2010). *the Fertility of ram sperm held for 24 h at 5°C Prior to cryopreservation*. Animal

- reproduction science. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432009001730>
- Ramónes, J. (2013). *“Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (triladyl) en la congelación de semen bovino”*. Cuenca: UNIVERSIDAD DE CUENCA. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/4535/1/Tesis.pdf>
- Rimbaud, E. (2004). *Situación de la producción y comercialización de pequeños rumiantes en Nicaragua*. UCC. Nicaragua.: Facultad de Ciencias Agrarias. Obtenido de <http://www.bio-nica.info/biblioteca/Rimbaud2004.pdf>
- Rodriguez, A., Gonzales, J., Vargas, A., & Herrera, J. (2018). Recoleccion y Manipulacion Seminal in vitro. *Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, I*, 16. Obtenido de: http://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/recoleccion_manipulacion.pdf
- Rodriguez, L., Duque, J., & Restrepo, G. (2016). *Evaluacion de dos preparaciones antibióticas en la criopreservación de semen equino*. Medellín: Politecnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S160991172016000200014
- Rojas, A. (2017). *“Dilucion y congelacion de semen de macho”*. Lima: UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA. Obtenido de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3370/noel-rojas-ana-maria-cecilia.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sáenz, A. (2007). *Ovinos y Caprinos*. Managua, Nicaragua: Universidad Nacional Agraria. Obtenido de <http://repositorio.una.edu.ni/2442/1/nl01s127o.pdf>
- Tabarez, A. (2014). *Optimizacion del protocolo de crioconservacion de semen caprino de la raza autoctona en peligro de extincion Blanca de Rasquera*. Barcelona: Universidad Autonoma de Barcelona. Obtenido de <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/285040/atr1de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Vaca, J. (2017). *“Evaluación de tres diluyentes naturales para semen fresco de conejo (*oryctolagus cuniculus*) en la inseminación artificial”*. Cevallos: UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO. Obtenido de <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26207/1/Tesis%2088%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20498.pdf>
- Valdez, D. (2013). *“Efecto del dodecil sulfato ionico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad del semen ovino congelado”*. Ecuador: UNIVERSIDAD DE CUENCA. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/500>
- Valencia, C. E. (2006). *Elaboración de diluyente de semen porcino*. Quito: Escuela politecnica Nacional . Obtenido de <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/2640>
- Vargas, J. (2016). *efecto del diluyente y duracion de almacenamiento a 4 °C sobre la motilidad del semen caprino*. Tesis de licenciatura, Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro, Torreon, Coahuila. Obtenido de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/8268/JOSE%20VICTOR%20VARGAS%20CARRILLO.pdf?sequence=1>
- Vega, S., Gutierrez, R., Ramirez, A., Gonzalez, M., Diaz, G., Salas, J., . . . Alberti, A. (2007). *Características físicas y químicas de leche de cabra de razas alpino francesa y saanen en épocas de lluvia y seca*. *Rev. Salud Anim.*, 29(3), 160-166. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2007000300006&lng=es&tlng=es.

X. ANEXOS

Anexo 1: Esquema del diseño del experimento

TRATAMIENTO	REPETICIONES			
	I	II	III	IV
1- LECHE DE VACA UHT	T1R1	T1R2	T1R3	T1R4
2- LECHE DE CABRA P	T2R1	T2R2	T2R3	T2R4
3 YEMA DE HUEVO	T3R1	T3R2	T3R3	T3R4
4- TRILADYL	T4R1	T4R2	T4R3	T4R4

Anexo 2: Hoja de campo

Universidad Católica del Trópico Seco

Faculta de Ciencias Agropecuarias

Hoja de campo

Protocolo de investigación para optar al título de ingeniero agropecuario

Nombre del ensayo: Evaluación de medios diluyentes para la conservación de semen caprino

Autores: Juan Carlos Chavarría Ramírez, José Leonidas Guevara Acevedo

N.º muestreo _____ **Fecha:** _____

Variable:

Tratamiento	Repetición	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Semen + Leche UHT	1				
	2				
	3				
	4				
Semen + Leche de Cabra	1				
	2				
	3				
	4				
Semen + Yema de Huevo	1				
	2				
	3				
	4				
semen + Triladyl	1				
	2				
	3				
	4				

Observaciones:

Anexo 3. Presupuesto

Rubro	presentación	Cantidad	Costo unitario C\$	Total C\$	total \$
Glucosa	1 litro	1	55	55	1.63
Glicerol	100 ml	1	29	29	0.86
Citrato de sodio	50gr	2	196.61	393.22	11.69
Estreptomicina + Penicilina	6000,000UI x 1.25 gr	3	240	720	21.40
Agua destilada	10ml	60	5	300	8.92
Yema de Huevo	Huevo	1	5	5	0.15
Leche de vaca UHT	litro	1	28	28	0.83
Triladyl	250gr	1	377.78	377.78	11.23
Leche de cabra	litro	1	60	60	1.78
Tinsion eosina-negrosina	30 ml	1	4200	4200	124.81
Matraz graduada	unidad	2	222	444	13.19
Tubo de recoleccion graduada	unidad	1	42.82	42.82	1.27
Vagina Artificial	unidad	1	120	120	3.57
Pajuelas	2500 unid	1	5125.15	5125.15	152.31
Porta objetos	paq 100 unid	1	168.5	168.5	5.01
Cubre Objetos	paq 100 unid	1	168.5	168.5	5.01
Termo criogenico	unidad	1	13479.81	13479.81	400.59
Algodón polivinilico	100 gr	1	289.82	289.82	8.61
Baño Maria	unidad	1	5202.6	5202.6	154.61
Camara de Neubauer	unidad	1	3000	3000	89.15
Hojas de campo	unidad hoja	10	2	20	0.59

Rubro	presentación	Cantidad	Costo unitario C\$	Total C\$	total \$
Impresiones	unidad hoja	60	5	300	8.92
Transporte	días	18	60	1080	32.10
Nitrógeno liquido	litro	20	134.4	2688	79.88
Total				C\$ 38,297.2	\$1,138.10
Tipos de cambio en dólar: C\$ 33.65					

Anexo 4. Imágenes sobre las actividades desarrolladas en el ensayo



Imagen 1: limpieza y desinfección del área púbica del cabro



Imagen 2. introducción de DIV para sincronización de celo



Imagen 3. Dispositivo intra-vaginal con progesterona



Imagen 4. Volumen de semen extraído



Imagen 5. análisis del semen previo al mezclado con el diluyente

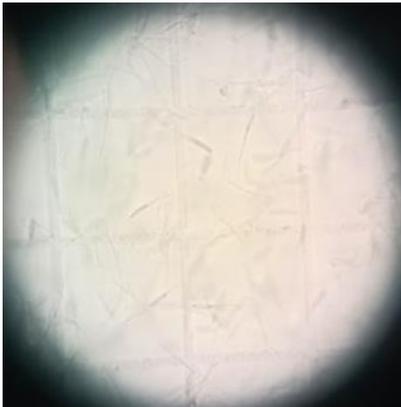


Imagen 6. conteo de espermatozoides en cámara de neubauer



Imagen 8. .diluyentes con sus respectivas etiquetas



Imagen 9.. pajillas etiquetadas



Imagen 10. pajillas llenas puestas en refrigeración con hielo para prepararlas para la congelación en termo criogénico



Imagen 11.. congelación progresiva en termo criogénico



Imagen 12.. observación de la motilidad espermática post descongelación

Anexo 5. Análisis estadísticos

Shapiro Wilk

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
motilidad Dia 1	16	3,56	0,73	0,86	0,0400
motilidad Dia 2	16	3,19	0,75	0,77	0,0003
motilidad Dia 3	16	3,06	0,77	0,78	0,0005
motilidad Dia 4	16	2,75	0,93	0,85	0,0231
termorresistencia Dia 1	16	1,81	0,66	0,77	0,0003
termorresistencia Dia 2	16	1,25	0,58	0,74	<0,0001
termorresistencia Dia 3	16	0,94	0,77	0,78	0,0005
termorresistencia Dia 4	16	0,69	0,70	0,76	<0,0001

ANDEVA no paramétrico con Kruskal Wallis para la variable motilidad post descongelación

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
motilidad Dia 1	Semen + Leche de cabra	4	3,00	0,82	3,00	5,38	5,90	0,0674
motilidad Dia 1	Semen + Leche de vaca UTH	4	3,25	0,50	3,00	6,25		
motilidad Dia 1	Semen + Triladyl	4	4,25	0,50	4,00	12,63		
motilidad Dia 1	Semen + Yema de Huevo	4	3,75	0,50	4,00	9,75		

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
motilidad Dia 2	Semen + Leche de cabra	4	2,50	0,58	2,50	4,50	9,11	0,0142
motilidad Dia 2	Semen + Leche de vaca UTH	4	2,75	0,50	3,00	5,75		
motilidad Dia 2	Semen + Triladyl	4	4,00	0,00	4,00	13,50		
motilidad Dia 2	Semen + Yema de Huevo	4	3,50	0,58	3,50	10,25		

Trat.	Medias	Ranks
Semen + Leche de cabra	2,50	4,50 A
Semen + Leche de vaca UTH	2,75	5,75 A
Semen + Yema de Huevo	3,50	10,25 A B
Semen + Triladyl	4,00	13,50 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
motilidad Dia 3	Semen + Leche de cabra	4	2,50	0,58	2,50	5,25	7,65	0,0326
motilidad Dia 3	Semen + Leche de vaca UTH	4	2,50	0,58	2,50	5,25		
motilidad Dia 3	Semen + Triladyl	4	3,75	0,50	4,00	12,50		
motilidad Dia 3	Semen + Yema de Huevo	4	3,50	0,58	3,50	11,00		

Trat.	Medias	Ranks
Semen + Leche de vaca UTH	2,50	5,25 A
Semen + Leche de cabra	2,50	5,25 A
Semen + Yema de Huevo	3,50	11,00 A B
Semen + Triladyl	3,75	12,50 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
motilidad Dia 4	Semen + Leche de cabra	4	2,00	0,82	2,00	5,00	7,85	0,0339
motilidad Dia 4	Semen + Leche de vaca UTH	4	2,25	0,50	2,00	5,88		
motilidad Dia 4	Semen + Triladyl	4	3,75	0,50	4,00	13,38		
motilidad Dia 4	Semen + Yema de Huevo	4	3,00	0,82	3,00	9,75		

Trat.	Medias	Ranks
Semen + Leche de cabra	2,00	5,00 A
Semen + Leche de vaca UTH	2,25	5,88 A
Semen + Yema de Huevo	3,00	9,75 A B
Semen + Triladyl	3,75	13,38 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ANDEVA no paramétrico con Kruskal Wallis para la variable motilidad post descongelación

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
termorresistencia Dia 1	Semen + Leche de cabra	4	1,75	0,50	2,00	1,83	0,5106
termorresistencia Dia 1	Semen + Leche de vaca UTH	4	1,50	0,58	1,50		
termorresistencia Dia 1	Semen + Triladyl	4	2,25	0,96	2,50		
termorresistencia Dia 1	Semen + Yema de Huevo	4	1,75	0,50	2,00		

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
termorresistencia Dia 2	Semen + Leche de cabra	4	0,75	0,50	1,00	5,58	0,0536
termorresistencia Dia 2	Semen + Leche de vaca UTH	4	1,00	0,00	1,00		
termorresistencia Dia 2	Semen + Triladyl	4	1,75	0,50	2,00		
termorresistencia Dia 2	Semen + Yema de Huevo	4	1,50	0,58	1,50		

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
termorresistencia Dia 3	Semen + Leche de cabra	4	0,25	0,50	0,00	8,32	0,0231
termorresistencia Dia 3	Semen + Leche de vaca UTH	4	0,50	0,58	0,50		
termorresistencia Dia 3	Semen + Triladyl	4	1,75	0,50	2,00		
termorresistencia Dia 3	Semen + Yema de Huevo	4	1,25	0,50	1,00		

Trat.	Medias	Ranks
Semen + Leche de cabra	0,25	4,50 A
Semen + Leche de vaca UTH	0,50	6,00 A
Semen + Yema de Huevo	1,25	10,38 A B
Semen + Triladyl	1,75	13,13 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
termorresistencia Dia 4	Semen + Leche de cabra	4	0,25	0,50	0,00	6,75	0,0441
termorresistencia Dia 4	Semen + Leche de vaca UTH	4	0,25	0,50	0,00		
termorresistencia Dia 4	Semen + Triladyl	4	1,50	0,58	1,50		
termorresistencia Dia 4	Semen + Yema de Huevo	4	0,75	0,50	1,00		

Trat.	Medias	Ranks
Semen + Leche de vaca UTH	0,25	5,75 A
Semen + Leche de cabra	0,25	5,75 A
Semen + Yema de Huevo	0,75	9,25 A B
Semen + Triladyl	1,50	13,25 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)