

DESARROLLO DE UN PROTOTIPO PARA REFRIGERAR DOSIS DE SEMEN DE CAPRINO DURANTE EL TRANSPORTE ENTRE COMUNIDADES AUTÓNOMAS: EFECTOS SOBRE LA CALIDAD IN VITRO Y RESULTADOS DE FERTILIDAD IN VIVO

SALVADOR ÁNGEL LOZANO PALAZÓN Y EVA MOCÉ CERVERA

LEMA: Refrigeración in itinere

Trabajo presentado para optar al XX Premio de Investigación “Francisco Fernández López” convocado por el Colegio Oficial de Veterinarios de Almería, 2018

Nos gustaría dedicar este trabajo a nuestros padres (Antonio y M^a Teresa, y Salvador Ángel y Jerónima) por educarnos en la cultura del esfuerzo y por enseñarnos a amar esta profesión. También nos gustaría dedicar el trabajo a los ganaderos de caprino que se implican en el programa de mejora genética de la raza Murciano-Granadina, porque son una pieza fundamental para que este programa avance y funcione. Por último, queremos dedicar especialmente este trabajo a los técnicos que están a pie de granja porque son un nexo imprescindible entre los centros de inseminación y los ganaderos y por el esfuerzo que realizan en acercar la mejora genética a las ganaderías realizando muchos viajes y kilómetros e invirtiendo mucho de su tiempo libre en esta actividad. Si los resultados de este trabajo sirven para mejorar un poco sus condiciones laborales, el esfuerzo ha merecido la pena.

“El genio se hace con un 1% de talento y un 99% de trabajo”
Albert Einstein

A Rita y Misté, por regalarnos 8 y 12 años de amor incondicional. Sed felices allá donde estéis.

“... ”

-Eso es –agitó la cabeza sobre la almohada y por primera vez vi lágrimas en sus mejillas-. Dicen que los animales no tienen alma.

-¿Quién lo dice?

-Bueno, lo he leído, y sé que muchas personas religiosas así lo creen.

-Pues yo no lo creo – dí unos golpecitos en aquella mano que aún se aferraba a la mía-. Si tener alma significa ser capaz de sentir amor, lealtad y gratitud, entonces los animales son mejores que muchos seres humanos. No tiene por qué preocuparse.

-Espero que tenga razón. A veces no duermo por la noche pensando en ello.

-Sé que tengo razón, Señorita Stubbs, y no discuta conmigo. A los veterinarios nos enseñan todo lo referente a las almas de los animales.

...”

De “Todas las criaturas grandes y pequeñas”

James Herriot

RESUMEN:

La inseminación artificial (IA) es una herramienta imprescindible en los programas de mejora genética de caprino lechero para evaluar el potencial genético de los sementales en prueba y para difundir la mejora genética mediante la distribución de dosis de semen de machos élite. Así, el avance de un programa de mejora genética será más rápido cuanto mayor sea el uso de la IA y mayor la fertilidad obtenida porque las hijas necesarias para evaluar a los sementales se obtendrán en menor tiempo. No obstante, el uso de la IA es todavía muy bajo en caprino y, como consecuencia, el avance de los programas de mejora genética se ralentiza. La mayoría de las IAs en caprino se realizan con semen refrigerado a 4 °C que se utiliza el mismo día de la extracción de los eyaculados, debido a que la fertilidad de estas dosis disminuye de forma drástica a partir de las 12 h de conservación. Este tiempo de vida útil tan corto impide el envío de las dosis de semen mediante agencias de transporte. Por otra parte, el hecho de que las dosis de caprino se mantengan a 4 °C supone que el proceso de refrigeración tenga que realizarse lentamente (entre 60 y 90 minutos) para evitar dañar a los espermatozoides por choque térmico y, por este motivo, la entrega de las dosis se retrasa durante la mañana del día de extracción. La combinación entre la tardanza en la entrega de las dosis y la necesidad de usar las dosis el mismo día de la extracción del semen retrasa hasta la tarde la hora de inseminación en las ganaderías más alejadas de los centros de sementales e incluso desincentiva el uso de la IA. Por este motivo, el objetivo de este trabajo que se presenta fue desarrollar

un prototipo de refrigeración económico y sencillo compatible con las neveras que utilizan los técnicos que se encargan de realizar las IAs que permitiese realizar el proceso de refrigeración in itinere. Para ello, se planificaron tres experimentos. En el primer experimento se estudió la velocidad de refrigeración en distintas variantes del prototipo con el objetivo de obtener una velocidad lo más parecida posible a $-0,18\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, que es la velocidad teórica a la que se enfrían las pajuelas en caprino mediante un baño termostataado programable (en el que las dosis se enfrían de $20\text{ a }4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en 90 min). Se observó que la velocidad de refrigeración real en el baño programable era mayor que la velocidad teórica, alcanzando la temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en 67 min. De todas las variantes del prototipo estudiadas, una de ellas proporcionaba la mejor combinación entre velocidad de refrigeración y tiempo que se tarda en alcanzar los $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En el segundo experimento se comparó la calidad de las dosis refrigeradas en el baño programable y en el prototipo. Para ello se utilizaron 24 eyaculados de 12 machos de raza Murciano-Granadina siendo la mitad de las pajuelas de cada eyaculado refrigeradas con el baño programable y la otra mitad con el prototipo. Tras la refrigeración se evaluó la calidad del semen (movilidad e integridad de la membrana plasmática) nada más concluir el proceso de refrigeración (0 h) y 24 h después. Se observó un mayor porcentaje de espermatozoides vivos en las dosis refrigeradas en el prototipo (64,3%) que en el baño termostataado programable (48,7%) a las 0 h ($P < 0,05$), siendo el resto de parámetros similares entre los dos sistemas (móviles totales: 64,5% frente a 72,3%; móviles progresivos: 43,2% frente a 45,0%, para las dosis refrigeradas en el baño y en el prototipo, respectivamente). Por otra parte, la calidad a las 24 h de la refrigeración fue similar en ambos sistemas.

En el tercer experimento, se evaluó la capacidad fecundante de las dosis refrigeradas en el prototipo mediante la inseminación de 315 cabras de raza Murciano

Granadina en nueve ganaderías de ($n = 9$) de cuatro comunidades autónomas. La fertilidad media a parto obtenida con estas dosis fue del 56,9%, fertilidad similar a la obtenida en esta especie por otros autores.

En conclusión, las dosis de caprino refrigeradas en el prototipo de refrigeración presentan mayor calidad in vitro que las dosis refrigeradas en el baño programable. Además, la fertilidad de las dosis refrigeradas in itinere es similar a la obtenida por otros autores en caprino, con la ventaja de que permite realizar las inseminaciones en un horario más razonable.

INTRODUCCIÓN

Los programas de mejora genética en ganado caprino lechero descansan en tres pilares fundamentales: en el control oficial del rendimiento lechero, el control genealógico de los animales y el programa de inseminación artificial que cuenta con machos de referencia, candidatos, en prueba o testaje y mejorantes. Estos programas además se apoyan en laboratorios acreditados por ENAC donde se analiza la leche, laboratorios donde se realizan los análisis genéticos y se verifica la filiación de los animales y en los centros de sementales donde se alojan los machos del programa y que producen las dosis de semen utilizadas en la inseminación artificial (LozanoPalazón, 2010).

Por tanto, la inseminación artificial (IA) juega un papel fundamental en el avance de los programas de mejora genética debido a que permite conectar de una forma eficaz los rebaños para poder evaluar el potencial genético de los sementales que se encuentran en fase de prueba así como acceder a animales mejorados genéticamente y su difusión a un mayor número de hembras y explotaciones con garantías sanitarias (Leboeuf et al., 2008). El avance de un programa de selección será tanto más rápido cuanto mayor sea el número de cabras inseminadas y cuanto mayor sea la fertilidad conseguida porque el número de hijas necesarias para testar a los sementales se obtendrá en menor tiempo.

No obstante, en el ganado caprino lechero sólo se insemina el 1% de la cabaña total a nivel nacional (López-Sebastián, 2014), llegando al 5% del censo de las asociaciones (Arrébola, 2013). Este uso tan limitado de la IA ralentiza y compromete el avance de los programas de mejora genética, debido a que se retrasa la obtención de la evaluación genética de los machos que se encuentran en prueba. Por este motivo, es necesario incrementar el uso de la IA en el caprino lechero ya que repercutirá positivamente en el avance de los programas de mejora genética, en la productividad de las explotaciones y en la calidad de los productos obtenidos, garantizando la sostenibilidad del sector.

En España, la mayoría de las IAs en ganado caprino (>85%) se realizan con semen refrigerado (Arrébola, 2013), debido a que su fertilidad (55-65%; Arrébola, 2013) es superior a la del semen congelado (35-38%; Arrébola, 2013) y próxima a la que se observa tras monta natural en cabras con celo sincronizado (74%; Balado, 2017, comunicación personal).

En general, las dosis refrigeradas de caprino se conservan a 4 °C (Leboeuf et al., 2003b). A esta temperatura de conservación, es necesario añadir a los diluyentes ingredientes tales como la yema de huevo o la leche desnatada que protegen a las

membranas de los espermatozoides de los daños provocados por el frío (Bergeron y Manjunath, 2006) y también es necesario refrigerar lentamente a los espermatozoides desde temperatura ambiente hasta 4 °C (generalmente entre 1,5 y 4 h; Purdy, 2006) para evitar dañarlos por choque térmico. No obstante, estos protocolos de refrigeración demoran la entrega de las dosis y, por tanto, la hora de la inseminación.

Por otra parte, los espermatozoides de caprino conservados en estado líquido sufren un rápido deterioro que compromete su fertilidad, disminuyendo ésta drásticamente a partir de las 12 h de conservación (Leboeuf et al., 2000). De hecho, la mayoría de las inseminaciones se realizan con semen conservado durante 5-8 h. Este reducido tiempo de conservación limita la distancia a la que pueden ser utilizadas las dosis, dificultando su comercio nacional. Además supone un problema en los programas de mejora genética nacionales de caprino, ya que entorpece el establecimiento de buenas conexiones entre rebaños alejados de los centros de sementales (Leboeuf et al., 2008).

Por último, la combinación entre la demora en la entrega de las dosis refrigeradas en el centro de sementales por esta fase de refrigeración lenta hasta 4 °C y la necesidad de realizar las inseminaciones con semen conservado con menos de 12 h supone un problema adicional, que incluso puede desincentivar el uso de esta tecnología reproductiva en ganado caprino. Sin embargo, parece lógico aprovechar la duración del trayecto desde el centro de sementales hasta las granjas para refrigerar las dosis (refrigeración *in itinere*). De esta forma, se podrían adelantar las entregas de las dosis y las inseminaciones no se retrasarían tanto en la jornada laboral. No obstante, no tenemos constancia de que existan estudios científicos en los que se hayan desarrollado protocolos o prototipos para refrigeración lenta de las dosis seminales durante el transporte (éstas son enviadas una vez ya han alcanzado la temperatura de refrigeración). Por otra parte, el formato de presentación de las dosis en caprino (pajuelas de semen de 0,25 mL) es muy sensible a los cambios de temperatura y, por tanto, es fundamental regular muy bien la velocidad de refrigeración utilizada para evitar dañar a los espermatozoides por choque térmico.

Por lo tanto, el objetivo del trabajo que se presenta fue desarrollar un prototipo de refrigeración económico y sencillo, compatible con las neveras que utilizan los técnicos que se encargan de realizar las IAs para mantener las dosis a 4 °C, que permitiese realizar el proceso de refrigeración *in itinere*. En una primera etapa, se determinó el posible efecto de este tipo de refrigeración sobre la calidad *in vitro* de las dosis. En una segunda etapa, se evaluó la fertilidad de estas dosis en campo en ganaderías localizadas a distinta distancia del centro de inseminación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales y preparación de diluyentes

Todos los productos químicos utilizados fueron de grado reactivo y procedentes de Sigma-Aldrich (Madrid, España), excepto el SYBR-14 y el yoduro de propidio (PI) que fueron adquiridos en Invitrogen (Barcelona, España).

Tabla 1. Composición de los diluyentes utilizados

Ingredientes	Peso Molecular	TRIS-CÍTRICO-GLUCOSA (TCG)		SM1
		Concentración	g/L	g/L
		TRIZMA base	121,1	250 mM
Ácido cítrico anhidro	192,12	83 mM	15,95	--
D (+) Glucosa	180,16	69 mM	12,43	2
Agua Milli-Q			Hasta 1 L	--
Leche desnatada UHT (Central Lechera Asturiana)			--	Hasta 1 L
mOsm			300	--
pH			6,8-7	--

TCG: Mocé y Graham (2006); SM1: Skimmed Milk 1.

Para la preparación de las dosis de semen se utilizó un diluyente de base leche desnatada (skimmed milk, SM1). Para la evaluación de la calidad del semen fresco y refrigerado, se utilizaron el diluyente TCG y el diluyente TCG suplementado con albúmina sérica bovina (3 mg/mL; TCG-BSA). La composición de todos los diluyentes utilizados se encuentra resumida en la Tabla 1.

Para la determinación de la concentración se utilizó una solución de cloruro sódico al 0,9% (peso: volumen; Konyali et al., 2013).

Animales

Para el estudio se usaron un total de 15 machos cabríos (2-10 años de edad) pertenecientes a la raza Murciano-Granadina (Figura 1.a). Los machos se alojaron en el Centro de Tecnología Animal, perteneciente al Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (CITA-IVIA, Segorbe, Castellón). Los sementales se alojaron en corrales comunes, disponiendo de agua y paja ad libitum y fueron alimentados con 1 kg de pienso concentrado por macho (17% proteína bruta, 4,5% aceites y grasas brutas y 11,6% fibra bruta). Tanto el alojamiento como los protocolos para la recuperación del semen e inseminación artificial cumplían la normativa europea para el cuidado y uso de los animales de experimentación (Directiva EC 2010/63/EU).

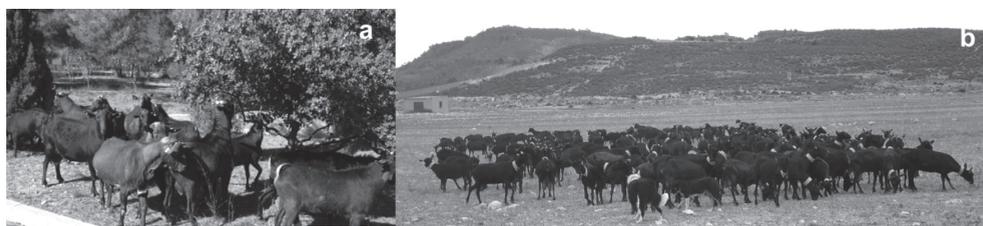


Figura 1. Sementales (a) y cabras (b) de raza Murciano-Granadina
(Fuente foto b: S.A. Lozano).

Para la prueba de fertilidad se utilizaron cabras ($n = 315$) de la raza Murciano-Granadina (Figura 1.b) mayores de 18 meses (entre 1,5 y 12 años) y de más de un parto (entre 1 y 9 partos) alojadas en 9 ganaderías pertenecientes a la Asociación Española de Criadores de la Cabra Murciano-Granadina (ACRIMUR) localizadas en las provincias de Murcia, Albacete, Barcelona y Teruel.

Recuperación del semen

Los eyaculados fueron recuperados a primera hora de la mañana mediante vagina artificial, según el protocolo descrito por Silvestre et al. (2004), con ligeras modificaciones (Figura 2).

Como máximo se extrajeron dos eyaculados por macho y semana, en días separados. Tras la extracción e identificación de los tubos los eyaculados se colocaron en un baño de agua atemperada a 25 °C hasta su procesamiento.



Figura 2. Extracción de semen de ganado caprino (Fuente fotos 5 y 6: C. Konyali).

El volumen de los eyaculados fue medido mediante pesaje en una balanza y la concentración fue determinada usando un espectrofotómetro calibrado para semen de caprino (Accucell, IMV, Humeco, Huesca, España) en una muestra diluida 1:400 (v:v) con la solución de cloruro sódico 0,9% (Figura 3).

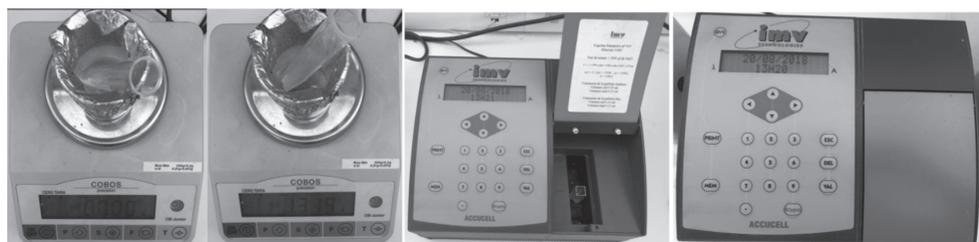


Figura 3. Detalle de la determinación del volumen y la concentración de los eyaculados de caprino.

Preparación de las dosis de semen refrigeradas

Para preparar las dosis de semen refrigeradas, los eyaculados fueron diluidos hasta una concentración de 560×10^6 espermatozoides/mL con SM1 atemperado a 25 °C. De cada uno de los eyaculados diluidos se tomaron alícuotas de 40 .L para analizar la calidad del semen fresco (antes de refrigerar).



Figura 4. Detalle del material necesario para el envasado del semen en pajuelas.

El resto del semen fue envasado en pajuelas de 0,25 mL (IMV, Humeco, Huesca, España) que fueron selladas con polivinil alcohol (PVA, Humeco, Huesca, España) (Figura 4).

En el protocolo de refrigeración estándar las pajuelas se colocaron en un baño de agua termostataado programable (Julabo GmbH, Seelbach, Alemania), donde fueron enfriadas lentamente desde 20 a 4 °C en 90 min (velocidad teórica de enfriamiento: 0,18 °C/min) siendo posteriormente conservadas a 4 °C hasta su uso (Figura 5). Después de la refrigeración se guardó una pajuela de cada uno de los eyaculados refrigerados para evaluar la calidad seminal.

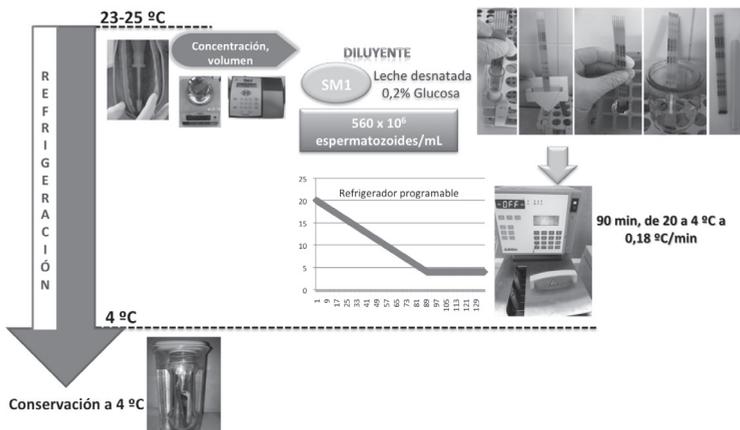


Figura 5. Protocolo de refrigeración estándar (Fuente: C. Tomás, con modificaciones).

Análisis de la calidad seminal

Para evaluar la calidad del semen, se realizaron análisis de movilidad y de integridad de membrana plasmática de los espermatozoides tanto en muestras de semen fresco (antes de refrigerar las muestras) como refrigerado. Se siguieron los protocolos descritos por Konyali et al. (2013), con ligeras modificaciones.

Todas las diluciones y la manipulación de las muestras se realizaron a temperatura ambiente (22-25 °C). Se realizó una primera dilución hasta una concentración de 30×10^6 espermatozoides/mL con TCG en las muestras de semen fresco y refrigerado (M-30). A partir de esta muestra M-30 se realizaron el resto de diluciones para la evaluación de la movilidad y de la integridad de la membrana plasmática.

Los análisis de movilidad se determinaron con ayuda de un sistema de análisis de motilidad computarizado (CASA; ISAS, versión 1.0.17, Proiser, Valencia, España) operando a 30 video frames por segundo (30 Hz), con ajustes de área de partícula desde 15 hasta 70 .m, y radio de búsqueda de 12 .m (Figura 6). Los espermatozoides se clasificaron como inmóviles si su velocidad media (average path velocity; VAP) era inferior a 10 .m/sec y se clasificaron como móviles progresivos si presentaban VAP > 75 .m/sec y un índice de rectitud (straightness index; STR) $\geq 80\%$. Los análisis de movilidad se realizaron a 37 °C usando un objetivo 10x con contraste de fases negativo en un microscopio Nikon Eclipse 90i (Nikon Corporation Instruments Company; IZASA, Barcelona, España) conectado al ordenador a través de una cámara de vídeo monocromática Basler A312f (Basler Vision Technologies, Proiser, Paterna, Valencia, España).

La concentración para el análisis de motilidad se ajustó en cada M-30 a 6×10^6 espermatozoides/mL con TCG-BSA. Estas muestras fueron incubadas a 37 °C durante 10 min antes de realizar los análisis de motilidad. A continuación se tomaron 5 .L de muestra y se depositaron en una cámara Makler (Counting Chamber Makler, Sefi

Medical Instruments, Haifa, Israel) atemperada a 37 °C en una placa calefactada y se tomaron los datos de un mínimo de 200 espermatozoides en tres campos distintos (Figura 6). Las trayectorias de los espermatozoides fueron posteriormente revisadas para eliminar posibles confusiones con partículas no espermáticas y trayectorias erróneamente analizadas.

El porcentaje de espermatozoides vivos (con membrana plasmática intacta) en cada muestra fresca o refrigerada se determinó usando la tinción dual fluorescente SYBR-14/yoduro de propidio (PI) y citometría de flujo (Figura 7). Todas las diluciones

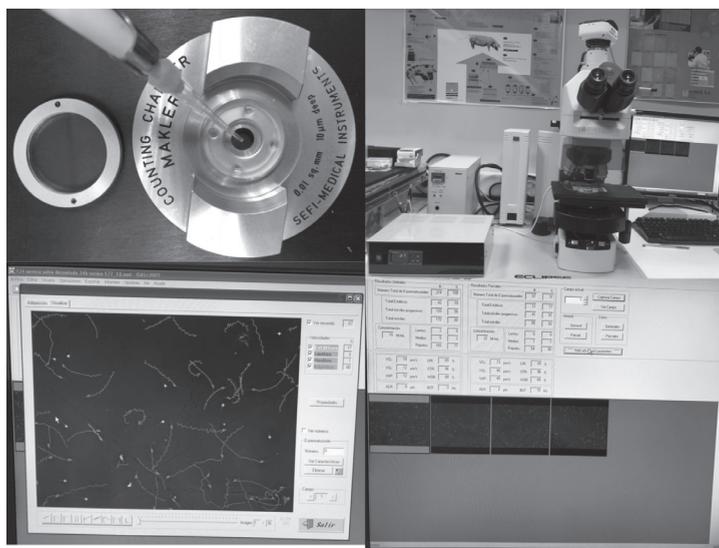


Figura 6. Cámara Makler, sistema computarizado para el análisis de motilidad de los espermatozoides e imágenes obtenidas con este sistema y semen de caprino.

se realizaron a temperatura ambiente. Para el análisis mediante citometría de flujo se transfirieron 0,1 mL de cada M-30 a tubos y a continuación se añadieron 30 .L de una solución de tinción que contenía 25 .L de diluyente TCG, 2,5 .L de SYBR-14 (solución 10 .M en dimetil sulfóxido-DMSO) y 2,5 .L de PI (solución 1,5 mM en agua Milli-Q) y se incubaron con las tinciones durante 10 min a temperatura ambiente. Las muestras se diluyeron tras la incubación con 425 .L de diluyente TCG y se analizaron en un citómetro de flujo Epics XL-MCL (Beckman Coulter, IZASA, Barcelona, España) equipado con sistema óptico estándar (láser de argón de 488 nm a 15-mW; Cyonics; Coherent, Santa Clara, CA, EE.UU.), y un software EXPO 2000 (Coulter Corporation, West Lafayette, EE.UU.). La fluorescencia verde emitida por el SYBR-14 se detectó utilizando un filtro de paso largo de banda (LP) de 550-nm en combinación con un filtro de paso de banda (BP) de 525-nm (ancho de banda 505–545) (FL1). La fluorescencia roja emitida por el PI se detectó usando un filtro LP de 645-nm combinado con un filtro BP de 620-nm (ancho de banda 605–635) (FL3). El valor del fotomultiplicador (PMT) del detector en FL1 se fijó a 650 V y en FL3 a 691 V. La compensación utilizada entre los filtros FL1–FL2 fue del 41,4%, y entre FL3–FL1 fue 5,5%. Se analizaron un mínimo de 10.000 eventos por muestra. Usando este protocolo, todas las células se tiñen con SYBR-14, lo que permite distinguir a las células de los eventos que no contienen ADN (SYBR-14 y PI negativas) pero que presentan un tamaño similar al de los espermatozoides, pero sólo las células no viables (es decir, con la membrana

plasmática dañada) se tiñen con PI (Figura 7). El porcentaje de partículas sin ADN no se consideró en los cálculos finales para no sobrestimar el porcentaje de espermatozoides vivos (PI negativos) (Petrunkina and Harrison, 2010; Petrunkina et al., 2010). En los resultados sólo se consideró el porcentaje de espermatozoides vivos (SYBR-14 positivos y PI negativos).

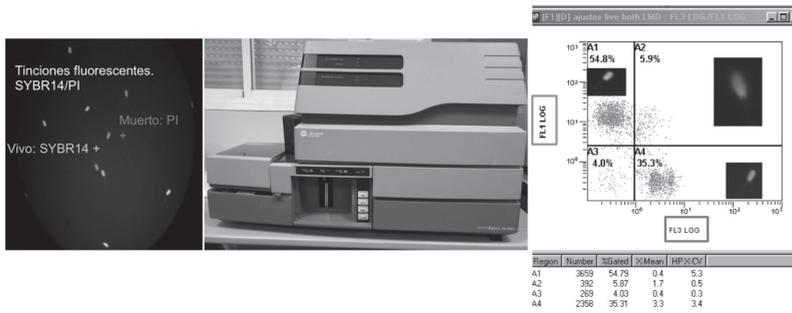
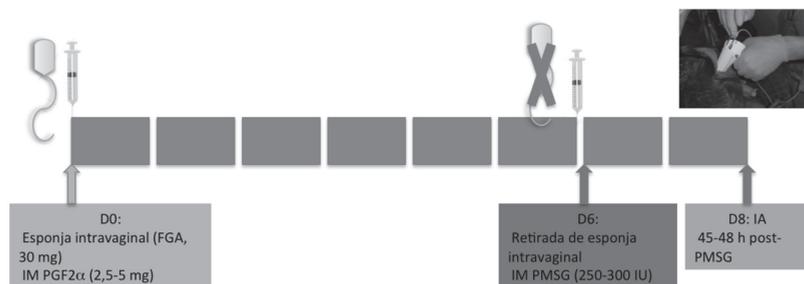


Figura 7. Espermatozoides con la membrana plasmática dañada (yoduro de propidio positivos) o intacta (SYBR14 positivos), citómetro de flujo y gráficos obtenidos tras el análisis de las muestras frescas o refrigeradas de semen de caprino.

Sincronización del estro e inseminación artificial

Para la sincronización del celo en las cabras se utilizó un protocolo corto basado en el descrito por Menchaca y Rubianes (2007) (Figura 8). Sólo se sincronizaron aquellas cabras que presentaban buena condición corporal, altos valores productivos e imagen ecográfica normal (sin signos de patología reproductiva ni de gestación).

El día 0 se colocaron esponjas intravaginales con 30 mg del progestágeno acetato de flugestona (FGA, SINCROPART® 30 MG, CEVA Salud Animal, Barcelona, España) mediante un aplicador de esponjas lubricado (lubricante BOVIVET Gel 1000 ml, Kruuse, Langeskov, Dinamarca). El aplicador fue desinfectado entre cada cabra con una solución de amonio cuaternario (CATIGENE PLUS, Quimicamp Higiene S.L., Valencia, España). Al mismo tiempo que se colocaron las esponjas, se inyectaron por vía intramuscular (IM) entre 2,5 y 5 mg de Prostaglandina F2. (Enzaprost® T, CEVA Salud Animal, Barcelona, España) para provocar la luteolisis. El día 6 se retiraron las esponjas y cada cabra recibió una inyección IM de 250 U.I. (para las inseminaciones realizadas en otoño-invierno) o 300 U.I. (para las inseminaciones realizadas en primavera-verano) de PMSG (SINCROPART® PMSG 6000 UI, CEVA Salud Animal, Barcelona, España) para inducir el crecimiento folicular.



Basado en Menchaca y Rubianes (2007), con modificaciones.

Figura 8. Protocolo corto para la sincronización del celo en las cabras. FGA: acetato de flugestona (progestágeno); IM: intramuscular; PGF2.: Prostaglandina F2. (actividad luteolítica); PMSG: gonadotropina sérica de la yegua gestante (actividad folículo estimulante); IA: inseminación artificial.

La IA se realizó el día 8, en un intervalo entre las 45 y las 48 h tras la inyección de PMSG. Durante la IA cada cabra fue inmovilizada con ayuda de un asistente que sujetó y levantó a las cabras por los miembros posteriores. A continuación, el técnico encargado de realizar la IA limpió la vulva, introdujo en la vagina un espéculo lubricado (8-10 cm; lubricante BOVIVET Gel 1000 ml, Kruuse, Langeskov, Dinamarca) y lo abrió para localizar la entrada del cérvix en la base de la vagina. En caso de encontrarse moco cervical, éste fue retirado cuidadosamente ya que acumula productos bacterianos e inflamatorios que pueden afectar a la viabilidad espermática (Manes y Ungerfeld, 2015). Posteriormente se colocó el inyector en la entrada del cérvix empujando suavemente para insertarlo lo más profundo posible en el cuello uterino (casi siempre a la entrada del cérvix) y se depositó lentamente el semen para evitar un reflujó excesivo (Figura 9). Cada cabra fue inseminada con el contenido de una pajuela de IA con un total de 140×10^6 espermatozoides. El espéculo fue desinfectado entre cada cabra con una solución de amonio cuaternario (CATIGENE PLUS, Quimicamp Higiene, S.L. Valencia, España).

Experimento 1

En el primer experimento se estudió la velocidad de refrigeración en distintas variantes de un prototipo de refrigeración compatible con el uso de las neveras que utilizan los técnicos que se encargan de realizar las IAs para mantener las dosis a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y que permitiese realizar el proceso de refrigeración in itinere. El objetivo fue



Figura 9. Proceso de inseminación artificial en caprino (Fuente: S.A. Lozano).

obtener una velocidad de refrigeración lo más parecida posible a $-0,18\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, que es la velocidad teórica a la que se enfrían las pajuelas en caprino mediante un baño termostático programable (en el que las dosis se enfrían de 20 a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en 90 min).

El prototipo consistió en un bote de vidrio en cuyo interior se colocaron las pajuelas separadas por machos en gobelets individuales y este bote fue cerrado y sumergido en un envase de plástico que contenía 750 mL de agua a temperatura ambiente de forma que el nivel de agua cubría la totalidad de las pajuelas (Figura 10).

Para conseguir distintas velocidades de enfriamiento, se colocaron distinto número de bloques refrigerantes de 200 g (desde 0 hasta 4 bloques, congelados previamente en un congelador a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$) cubriendo de ninguna a 4 paredes del bote de plástico (Figura 11). En el interior del bote de vidrio se colocó un registrador de temperatura (Temperature Data Logger RC-5; Elitech, Londres, Reino Unido) que fue almacenando los datos de temperatura minuto a minuto. Además, se determinó la curva real de enfriamiento obtenida en el baño programable. Los datos del registrador fueron descargados a una base de datos Excell mediante el programa URC-5 (Elitech, Londres, Reino Unido). Con los datos obtenidos se realizaron gráficos de la curva de enfriamiento y se calculó la velocidad de enfriamiento obtenida minuto a minuto.

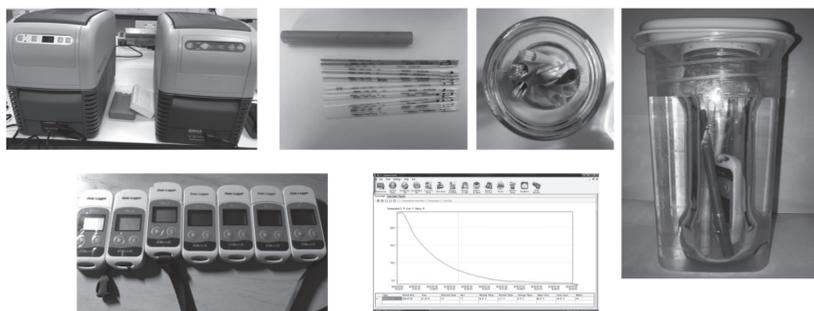


Figura 10. Detalle del sistema de refrigeración, registradores de temperatura y detalle del programa informático de descarga de datos del registrador de temperatura.



Figura 11. Bloque refrigerante utilizado y detalle de la colocación de los sistemas de refrigeración en el interior de la nevera de transporte (fila de arriba: 0 bloques en el centro y 1 bloque a la derecha; fila de abajo y de izquierda a derecha: 2 bloques, 3 bloques, 4 bloques).

De todas las variantes estudiadas, nos quedamos con la que proporcionaba la mejor combinación entre velocidad de refrigeración y tiempo en el que se alcanzaban los 4 °C (3 bloques refrigerantes).

Experimento 2

En el segundo experimento se comparó la calidad de las dosis refrigeradas en el baño programable con la de las dosis refrigeradas en el prototipo de 3 bloques refrigerantes (Figura 12). Para ello se utilizaron 24 eyaculados de 12 machos de raza

Murciano-Granadina siendo la mitad de las pajuelas de cada eyaculado refrigeradas con el baño programable y la otra mitad con el prototipo. Tras la refrigeración se evaluó la calidad del semen (movilidad e integridad de la membrana plasmática) nada más concluir el proceso de refrigeración (0 h) y 24 h después.



Figura 12. Detalle de la colocación del prototipo en el interior de la nevera de transporte.

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SAS. Para el análisis de la calidad del semen fresco se realizó un análisis descriptivo. Los datos de calidad *in vitro* (movilidad e integridad de la membrana plasmática) de las muestras refrigeradas a las 0 h y 24 h se analizaron mediante un modelo mixto donde se incluyó el macho como efecto aleatorio. El sistema de refrigeración fue incluido como efecto fijo, con 2 niveles (baño programable y prototipo). El ajuste de Tukey-Kramer se utilizó para evaluar las diferencias de las medias mínimo cuadráticas a un error fijado al 5% y los resultados se presentan como medias mínimo cuadráticas (LSM) \pm error estándar (SE).

Experimento 3

En el tercer experimento, se evaluó la capacidad fecundante de las dosis refrigeradas en el prototipo mediante una prueba de inseminación en campo.

Para la producción de las dosis seminales se utilizaron 13 machos, variando el número de inseminaciones por macho (desde 6 hasta 71) y el número de ganaderías en las que se usó cada macho en función de las necesidades del programa de mejora genética. Las dosis se prepararon siguiendo el protocolo descrito previamente, y éstas fueron refrigeradas durante su transporte a la granja utilizando el prototipo con 3 bloques refrigerantes, que fueron retirados a las 3 h 45 min (tiempo en el que las dosis han alcanzado la temperatura de conservación con este prototipo).

Para la inseminación se utilizaron 315 cabras de raza Murciano-Granadina alojadas en 9 ganaderías localizadas en las comunidades autónomas de Murcia, Aragón, Cataluña y Castilla la Mancha. La distancia de las ganaderías al centro de inseminación varió desde 87 km (50 min de viaje) hasta 384 km (3 h 47 min de viaje). Tanto la sincronización de los celos como la inseminación artificial se realizaron según el protocolo previamente descrito. En el momento del parto se anotaron las cabras que parieron y el número de chotos nacidos por parto.

En los resultados se muestran las medias de calidad del semen fresco y refrigerado, así como las medias de fertilidad obtenidas por macho y por granja.

RESULTADOS

Las curvas de descenso de temperatura se muestran en la Figura 13. Se observó que la velocidad de refrigeración real en el baño programable es mayor que la velocidad teórica, alcanzando la temperatura de 4 °C en 67 min. De hecho, en 27 de los minutos registrados las velocidades de refrigeración superan $-0,4$ °C/min, llegando a alcanzarse velocidades de hasta $-0,7$ °C/min. Como es esperable, en el prototipo la velocidad de refrigeración es más lenta cuantos menos bloques refrigerantes se utilizan, aunque las curvas de 3 y 4 bloques refrigerantes son bastante similares entre sí.

Con respecto al tiempo necesario para alcanzar la temperatura de conservación de 4 °C con este sistema, se requieren 3 h 24 min para el sistema con 4 bloques, 3 h 45 min para el sistema con 3 bloques, 6 h 33 min para el sistema con 2 bloques, 8 h 42 min para el sistema con 1 bloque y 12 h 10 min para el sistema sin bloques refrigerantes. De todas las variantes estudiadas, la de 3 bloques refrigerantes proporciona una adecuada combinación entre velocidad de refrigeración y tiempo en el que se alcanzan los 4 °C en las muestras siendo ésta la variante utilizada en el resto de experimentos. En las variantes con menos bloques, si bien se suaviza la pendiente en la primera parte de la curva, las dosis tardan mucho tiempo en alcanzar la temperatura de conservación debido a que en la segunda parte de la curva la velocidad de enfriamiento es muy lenta.

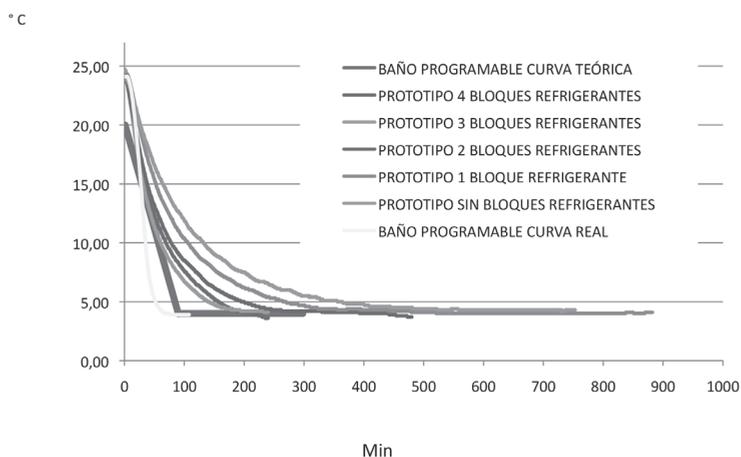


Figura 13. Curvas de descenso de temperatura en el baño termostatado programable (teórica y real) y en el prototipo con distinto número de bloques refrigerantes.

En el caso del prototipo, la velocidad de refrigeración no suele superar los $-0,4$ $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para ninguna de las variantes. Sólo en las variantes de 4, 3 y 2 bloques se alcanzan velocidades de $-0,4$ a $-0,5$ $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ únicamente en 6, 10 y 2 del total de minutos registrados. Cuando se utilizan 1 o ningún bloque refrigerante, la velocidad de refrigeración nunca excede $-0,3$ $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

En este segundo experimento los eyaculados frescos presentaron de media 72,0% de espermatozoides móviles totales, 45,1% de móviles progresivos y 67,2% de espermatozoides con membrana plasmática intacta (datos no mostrados en tablas).

Tabla 2. Calidad de las dosis refrigeradas en el baño termostatado programable y en el prototipo al terminar la refrigeración (0 h) y al día siguiente (24 h).

Espermatozoides (%)	Refrigerado 0 h		Refrigerado 24 h	
	Baño	Prototipo	Baño	Prototipo
Móviles totales	64,5 \pm 4,8	72,3 \pm 4,8	53,8 \pm 6,3	60,1 \pm 6,3
Móviles progresivos	43,2 \pm 4,8	45,0 \pm 4,8	25,6 \pm 4,8	28,0 \pm 4,8
Con membrana plasmática intacta	48,7 ^a \pm 4,3	64,3 ^b \pm 4,3	46,8 \pm 4,6	56,7 \pm 4,6

Los resultados se presentan como medias mínimo cuadráticas \pm error estándar (LSM \pm SE). a,b: dentro de cada tiempo de refrigeración (0 ó 24 h), medias en la misma fila con letras no comunes en el superíndice son diferentes ($P < 0.05$).

Se observó un mayor porcentaje de espermatozoides vivos en las dosis refrigeradas en el prototipo que en el baño termostático programable a las 0 h de la refrigeración ($P < 0,05$), siendo el resto de parámetros similares entre los dos sistemas (Tabla 2). Por otra parte, la calidad a las 24 h de la refrigeración fue similar para ambos sistemas.

Para el tercer experimento, los eyaculados frescos usados presentaron un volumen medio de 1,24 mL, una concentración media de 2.679×10^6 espermatozoides/mL, un 77,2% de espermatozoides móviles totales, un 63% de espermatozoides móviles progresivos y un 65,8% de espermatozoides con membrana plasmática intacta (datos no mostrados en tablas).

Tabla 3. Fertilidades medias a parto por machos y ganaderías.

Macho	N° hembras	Fertilidad a	Ganadería	N° hembras	Fertilidad a
	inseminadas	parto (n)		inseminadas	parto (n)
1	13	38,5% (5)	A	20	80% (16)
2	25	64% (16)	B	43	46,5% (20)
3	21	57,1% (12)	C	40	42,5% (17)
4	14	50% (7)	D	22	63,3% (14)
5	70	54,3% (38)	E	18	44,4% (8)
6	16	87,5% (14)	F	39	38,5% (15)
7	11	63,6% (7)	G	40	75% (30)
8	20	55% (11)	H	56	60,7% (34)
9	6	66,7% (4)	I	33	69,7% (23)
10	30	46,7% (14)			
11	53	50,9% (27)			
12	24	66,7% (16)			
13	8	75% (6)			
Total	311	56,9% (177)	Total	311	56,9% (177)

(n): número de cabras que paren.

La calidad media de las dosis refrigeradas utilizadas fue de 75,9% espermatozoides móviles totales, 60,3% espermatozoides móviles progresivos y 57,3% espermatozoides con membrana plasmática intacta. Por tanto, tras la refrigeración las muestras retuvieron el 98% de los espermatozoides móviles totales, 96% de los progresivos y 87% de los espermatozoides con membrana plasmática intacta que presentaban los eyaculados frescos (datos no mostrados en tablas).

Teniendo en cuenta el porcentaje de espermatozoides móviles de las dosis refrigeradas, cada hembra fue inseminada con 106 x 106 espermatozoides móviles totales en promedio, aunque este número varió entre 71 y 132 x 106 espermatozoides móviles totales dependiendo del eyaculado.

Del total de 315 hembras inseminadas, 4 fallecieron antes del parto y no fueron contabilizadas para los cálculos de fertilidad. La fertilidad media a parto obtenida con estas dosis fue del 56,9%, aunque hubo variaciones entre machos y entre ganaderías (Tabla 3).

DISCUSIÓN

Los diluyentes a base de leche desnatada son ampliamente utilizados para la preparación de dosis refrigeradas en ganado caprino (Leboeuf et al., 2003b). Aunque el semen refrigerado de caprino se puede conservar a temperaturas que oscilan entre los 2 y los 15 °C, se recomienda una temperatura de conservación de 4 °C cuando se utilizan los diluyentes con base leche desnatada (Leboeuf et al., 2003a).

No obstante, la refrigeración desde temperatura corporal hasta 5 °C provoca cambios estructurales en las membranas de los espermatozoides que finalmente alteran su funcionalidad (Amann, 1999). Estos cambios estructurales son debidos al cambio de fase que experimentan las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos desde la fase líquida, que mantiene a la membrana plasmática en un estado fluído, a la fase de gel donde hay restricción de movimiento de los componentes de la membrana plasmática y se producen reorganizaciones de los componentes lipídicos y proteicos (revisado por Mocé et al., 2010). Los daños provocados por el descenso de temperatura pueden agruparse en daños directos o indirectos (o latentes) en función de cuánto tardan en manifestarse estos daños así como su dependencia o no de la velocidad de enfriamiento (Aman y Pickett, 1987). Así, los daños directos son evidentes casi inmediatamente tras el descenso de temperatura y son dependientes de la velocidad de enfriamiento, mientras que los daños indirectos se evidencian cuando ha pasado

algún tiempo tras el descenso de temperatura y son independientes de la velocidad de enfriamiento.

Para minimizar estas alteraciones provocadas por el descenso de temperatura se añaden productos que actúan como estabilizadores de las membranas a bajas temperaturas (como la yema de huevo o la leche desnatada) y se realiza un enfriamiento lento desde temperatura ambiente hasta 4-5 °C (Parrish y Foote, 1986). Así, en ganado caprino este enfriamiento se realiza habitualmente en 90 minutos (Leboeuf et al., 2003a) aunque se han descrito protocolos más cortos (1 h, revisado por Leboeuf et al., 2000) y más largos (hasta 4 h, revisado por Purdy, 2006). Con estos protocolos se consiguen velocidades de enfriamiento lentas ($< 0,3$ °C/min; Fiser y Fairfull, 1989; Memon et al., 2013) con las que se consiguen mejores calidades que si se utilizan velocidades de enfriamiento rápidas (por encima de $0,55$ °C/min; Memon et al., 2013; Jiménez-Rabadán et al., 2013).

Como ya se ha comentado en la introducción, una de las consecuencias de este proceso de enfriamiento lento es la demora que se produce en la entrega de las dosis de inseminación desde el centro de sementales a los técnicos inseminadores. Por este motivo, en el primer experimento estudiamos la posibilidad de realizar este enfriamiento directamente en la nevera de transporte de las dosis, en lugar de en el baño programable del centro de inseminación. Para ello, desarrollamos un prototipo muy sencillo y económico con el que obtuviésemos una curva de enfriamiento lo más similar posible a la curva teórica del baño programable (velocidad de enfriamiento teórica de $-0,18$ °C/min). Tal y como es esperable, la velocidad de enfriamiento en el prototipo aumenta a medida que se añade un mayor número de bloques refrigerantes, excepto en el caso de las curvas obtenidas para 3 y 4 bloques, que son muy similares entre sí. Este fenómeno se debe posiblemente a una falta de contacto entre los bloques y las paredes del recipiente de plástico cuando las cuatro paredes son rodeadas, ya que los bloques tienen una anchura ligeramente mayor a la de las paredes del recipiente de plástico.

En todas las variantes del prototipo la velocidad de refrigeración más habitual es $\leq 0,2$ °C/min, alcanzándose velocidades algo más elevadas (no suelen sobrepasar $0,4$ °C/min) en la primera parte de la curva (hasta que se alcanzan los 15 °C, aproximadamente). Existen muy pocos trabajos donde se haya estudiado el efecto de diferentes temperaturas de refrigeración sobre la calidad de los espermatozoides, y el ganado caprino tampoco es una excepción. Los dos trabajos donde se ha estudiado el efecto de la velocidad de refrigeración sobre la calidad del semen en caprino se centraron en comparar velocidades lentas (donde las muestras son refrigeradas desde

30 ó 37 °C hasta 4-5 °C en 90 o 150 min) con velocidades muy rápidas en las que la temperatura de 4-5 °C se alcanza en 10 ó 60 min (alcanzándose velocidades medias de refrigeración superiores a -0,55 °C/min; Jiménez-Rabadán et al., 2013; Memon et al., 2013). En ambos trabajos se observó que la calidad de las muestras refrigeradas lentamente era superior a la obtenida con las velocidades más elevadas. No obstante, se desconoce cómo pueden afectar velocidades de refrigeración intermedias sobre la calidad del semen en esta especie.

Por otra parte, no todas las especies son igual de sensibles a los daños provocados por la refrigeración, ya que la resistencia a los choques térmicos depende de la composición de la membrana plasmática en colesterol y fosfolípidos y del nivel de saturación de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos (Watson, 1981). Por la ratio colesterol:fosfolípidos de su membrana plasmática (0,59; Rana et al., 1991), los espermatozoides de caprino no se encuentran ni entre los más sensibles (ratio <0,5) ni entre los más resistentes (ratio \approx 1) a los choques térmicos (Watson, 1981). Aunque no son directamente extrapolables los resultados entre especies, algunos autores observaron que el enfriamiento rápido desde 30 hasta 15 °C o no tenía o tenía un efecto mínimo sobre la calidad del semen en ovino mientras que el enfriamiento rápido desde 30 hasta 10, 5 ó 0 °C era perjudicial para esta especie (Fiser y Fairfull, 1986). Por tanto, es poco probable que estas velocidades algo más rápidas que se alcanzan en la primera parte de la curva cuando se usan 3 y 4 bloques refrigerantes puedan tener algún efecto perjudicial sobre la calidad posterior de las dosis de caprino, si se considera además que los espermatozoides de caprino son más resistentes a los choques térmicos que los de ovino atendiendo a la composición de su membrana plasmática (Watson, 1981).

El prototipo con 3 bloques refrigerantes presentó una combinación adecuada entre la velocidad de refrigeración y el tiempo que se tarda en alcanzar los 4 °C y, por este motivo, decidimos utilizar este sistema para los siguientes experimentos. No existen tampoco trabajos donde se comparen velocidades de refrigeración más lentas y por ello desconocemos el efecto sobre la posterior calidad del semen. Sí se ha demostrado que la temperatura más adecuada de conservación para las dosis de caprino producidas con diluyentes a base de leche desnatada es 4 °C y no 15 °C (Leboeuf et al., 2003a). Además, al no añadir antibióticos a las dosis de refrigeración se corre el riesgo de que se produzca un crecimiento bacteriano excesivo en esas dosis refrigeradas muy lentamente ya que tardan más de 6 h 30 min en alcanzar la temperatura de conservación de 4 °C. Se ha demostrado, de forma experimental, que la temperatura de conservación utilizada (4 °C) ya inhibe el crecimiento bacteriano

al menos durante 24 h en semen de caprino diluido contaminado (Gómez-Martín et al., 2014). Por tanto, no parece adecuado que se retrase en exceso el alcance de la temperatura de conservación de 4 °C ni bajo el punto de vista de calidad in vitro ni de calidad microbiológica.

Sorprendentemente, la curva real del baño programable es muy diferente de la curva teórica, superando la velocidad de -0,4 °C/min hasta que se alcanzan los 7,5 °C. Como consecuencia, las dosis alcanzan la temperatura de 4 °C a los 67 min en lugar de a los 90 min, con un protocolo de refrigeración que podría considerarse rápido según Memon et al. (2013).

Al comparar la calidad de las dosis de caprino refrigeradas en el baño termotatado programable o en el prototipo con 3 bloques refrigerantes, observamos mayor calidad en las dosis refrigeradas en el prototipo aunque sólo se observaron diferencias significativas entre ambos sistemas para el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta nada más terminar el proceso de refrigeración (0 h). Estos resultados corroboran los obtenidos por otros autores en caprino (Jiménez Rabadán et al., 2013; Memon et al., 2013), aunque en esos estudios previos se observaron diferencias más marcadas para todos los parámetros de calidad seminal evaluados. Las diferencias entre los resultados obtenidos en los distintos trabajos pueden ser debidas o a la raza utilizada (Boer, Blanca Celtibérica o MurcianoGranadina), al tipo de diluyente (leche o yema de huevo) o a la velocidad de refrigeración alcanzada en los protocolos considerados rápidos (mayores en los otros estudios que en nuestro trabajo). Sí es posible que cuanto mayor sea la velocidad de refrigeración haya más machos o eyaculados en los que no se alcancen los valores de calidad umbrales establecidos para enviar las dosis a campo ya que, además de las diferencias que existen entre especies, se observa una gran variabilidad inter- e intramacho en la resistencia de los espermatozoides a los procesos de enfriamiento y congelación (revisado por Holt, 2000). Es decir, que a estas velocidades de refrigeración subóptimas posiblemente se descartan más eyaculados y, por tanto, se desperdician más dosis de inseminación.

A pesar de los efectos negativos que tienen los protocolos de refrigeración rápidos sobre la calidad in vitro de las dosis de caprino, la fertilidad media a parto obtenida con dosis refrigeradas mediante este protocolo fue de 59,3% y 2,2 chotos nacidos/parto (de un total de 241 inseminaciones de cabras de raza MurcianoGranadina alojadas en 5 ganaderías). Esta fertilidad es similar a la que se obtiene para esta raza según otros autores (55-65%; Arrébola, 2013) y a la obtenida para otras razas (entre 54,3 y 64,8%; revisado por Leboeuf et al., 2003b). Por tanto, no parece que esta velocidad de refrigeración afecte negativamente a la fertilidad, aunque habría que determinar

cuál es la fertilidad obtenida en dosis refrigeradas con la velocidad de refrigeración teórica (- 0,18 °C/ min).

En el último experimento de este trabajo estudiamos cómo afecta la refrigeración in itinere (en el prototipo con tres bloques refrigerantes) sobre la fertilidad obtenida. La fertilidad media a parto de las dosis refrigeradas mediante este sistema es del 56,9%, fertilidad muy similar a la obtenida por otros autores para esta especie tal y como se ha comentado previamente. Este resultado era esperable, ya que la calidad seminal de las dosis refrigeradas mediante ambos sistemas era muy similar. Por tanto, es posible aprovechar el tiempo de transporte para refrigerar las dosis de caprino sin que se produzca una disminución de la fertilidad de las dosis.

En conclusión, las dosis de caprino refrigeradas en el prototipo de refrigeración con 3 bloques refrigerantes presentan mayor calidad in vitro que las dosis refrigeradas en el baño termostataado programable. Además, la fertilidad de las dosis refrigeradas in itinere es similar a la que se obtiene con las dosis refrigeradas en el baño termostataado programable y a la obtenida por otros autores en caprino. Por tanto, este prototipo permite aprovechar el tiempo de transporte para realizar la refrigeración lenta, con la gran ventaja de que permite adelantar la hora de entrega de las dosis al menos en 90 min (más si se considera el tiempo necesario para verificar la calidad de las dosis de semen al concluir el proceso de refrigeración) y los técnicos pueden realizar las inseminaciones en un horario más razonable. Además, este prototipo es fácilmente transferible para la refrigeración de semen de otras especies. AGRADECIMIENTOS: Los autores agradecen a los ganaderos de las asociaciones AMURVAL y ACRIMUR por suministrar los animales de la raza Murciano-Granadina, la ayuda de EG en el análisis estadístico de los datos, de JB, AE, AE, MMG, IV, IL y SC en las extracciones de semen, la preparación de las dosis seminales y la evaluación de la calidad seminal de las dosis y la financiación recibida por el INIA co-financiado con fondos FEDER (RTA2013-0107-C03-01 y RTA2017-00049-C02-01, Madrid, España).

Además, queremos agradecer la confianza que siempre han depositado los técnicos encargados de realizar las inseminaciones en los trabajos desarrollados en el centro de inseminación artificial de caprino porque esta confianza nos alienta a continuar con los esfuerzos para mejorar poco a poco la calidad y fertilidad de las dosis producidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amann RP. 1999. Cryopreservation of sperm. En: Knobil E, Neild JD (eds), *Encyclopaedia of Reproduction*, Vol. 1. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 773-783.
- Amann RP, Pickett BW. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet Sci* 7: 145-173.
- Arrébola FA. 2013. Reproducción asistida en ganado caprino. En: Foro INIA "Manejo de caprino rentable". <http://wwwsp.inia.es/Investigacion/OtrasUni/TransferenciaTecnologia/ForosINIA/Mcaprino/Lists/Ponencias/Attachments/4/04%20Francisco%20A%20Arrebola.pdf>
- Bergeron A, Manjunath P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* 73: 1338-1344.
- Fiser PS, Fairfull RW. 1986. The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology* 23: 518-524.
- Fiser PS, Fairfull RW. 1989. The effect of glycerol-related osmotic changes on postthaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 26: 64-69.
- Gómez-Martín A, Ceballos D, Cadenas J, Paterna A, et al. 2014. Viabilité de *Mycoplasma agalactiae* dans les doses séminales caprines traitées à la marbofloxacin. 6ème Colloque International Francophone de Microbiologie Animale (CIFMA).
- Holt WV. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53: 47-58.
- Jiménez-Rabadán P, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Álvaro-García PJ, del Olmo E, Pérez-Guzmán MD, Fernández-Santos MR, Garde JJ, Solver AJ. 2013. Improved cryopreservation protocol for Blanca-Celtibérica buck semen collected by electroejaculation. *Cryobiology* 67: 251-257.
- Konyali C, Tomás C, Blanch E, Gómez EA, Graham JK, Mocé E. 2013. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology* 67: 124-131.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 62: 113-141.
- Leboeuf B, Guillouet P, Batellier F, Bernelas D, Bonné JL, Forgerit Y, Renaud G, Magistrini M. 2003a. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. *Theriogenology* 60: 867-877.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2003b. Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle. *INRA Prod Anim* 16: 91-99.
- Leboeuf B, Delgadillo JA, Manfredi E, Piacère A, Clement V, Martin P, Pellicer-Rubio MT, Boué P, de Cremoux R. 2008. Place de la maîtrise de la reproduction dans les schémas de sélection en chèvres laitières. *INRA Prod Anim* 21: 391-402.
- Lopez-Sebastián A, Coloma MA, Toledano A, Santiago-Moreno J. 2014. Hormone-free protocols for the control of reproduction and artificial insemination in goats. *Reprod Domest Anim* 49: 22-29.
- Lozano-Palazón SA. 2010. Situación actual del esquema de selección de ACRIMUR. Análisis del trabajo realizado y perspectivas de futuro. *Revista ACRIMUR* 20: 7-18.
- Manes J, Ungerfeld R. 2015. Estrous synchronization with intravaginal devices in sheep and goats: alterations in vaginal environment and its relation with fertility. *Rev Bras Reprod Anim* 39: 104-108.
- Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia FM. 2013. Effect of ascorbic acid concentrations, methods of cooling and freezing on Boer goat sperm cryopreservation. *Reprod Domest Anim* 48: 325-330.

- Menchaca A, Rubianes E. 2007. Pregnancy rate obtained with short-term protocol for timed artificial insemination in goats. *Reprod Domest Anim* 42: 590-593.
- Mocé E, Graham JK. 2006. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *J Anim Sci* 84: 826-833.
- Mocé E, Blanch E, Tomás C, Graham JK. 2010. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reprod Domest Anim* 45: 57-66.
- Parrish JJ, Foote RH. 1986. Fertility of cooled and frozen rabbit sperm measured by competitive fertilization. *Biol Reprod* 35: 253-257.
- Petrunkina AM, Harrison RAP. 2010. Systematic misestimation of cell populations by flow cytometry: a mathematical analysis. *Theriogenology* 73: 839-847.
- Petrunkina AM, Waberski D, Bollwein H, Sieme H. 2010. Identifying non-sperm particles during flow cytometric physiological assessment: a simple approach. *Theriogenology* 73: 995-1000.
- Purdy PH. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res* 63: 215-225.
- Rana APS, Majumder GC, Misra S, Ghosh A. 1991. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta* 1061: 185-196.
- Silvestre MA, Salvador I, Sánchez JP, Gómez EA. 2004. Effect of changing female stimulus on intensive semen collection in young Murciano-Granadina male goats. *J Anim Sci* 82: 1641-1645.
- Watson PF. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. En: Morris GJ, Clark A (eds), *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. Academic Press, Londres, Reino Unido, pp. 189-218.