

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

CONGELACION DE SEMEN CAPRINO EN NITROGENO LIQUIDO CON CINCO
DILUYENTES PARA USO EN INSEMINACION ARTIFICIAL

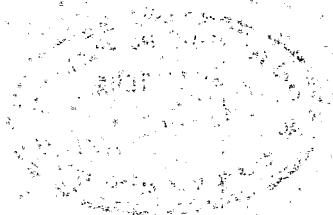
POR :

CARLOS ARMANDO BORJA MELARA

AURA JASMIN MORALES HERRERA

REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE :

INGENIERO AGRONOMO



SAN SALVADOR, OCTUBRE DE 1992



001088

Ej 1

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR : DR. FABIO CASTILLO FIGUEROA

SECRETARIO GENERAL : LIC. MIRNA ANTONIETA PERLA DE ANAYA

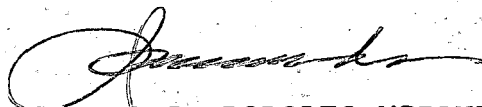
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS

DECANO : ING. AGR. GALINDO ELEAZAR JIMENEZ MORAN

SECRETARIO : ING. AGR. MORENA ARGELIA RODRIGUEZ DE SOTO

d) por Cu. Libros de la Fac. de C. A. A. A. Enero / 1993

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

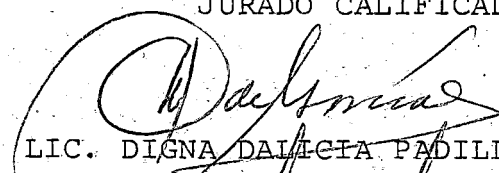


ING. AGR. JORGE RODOLFO MIRANDA GAMEZ

ASESOR :

ING. AGR. HORACIO GIL ZAMBRANA RIVERA

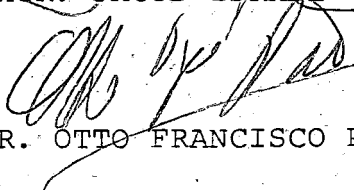
JURADO CALIFICADOR :



LIC. DIGNA DALICIA PADILLA DE GARCIA



ING. AGR. JACOB ISRAEL PALACIOS BRUNO



ING. AGR. OTTO FRANCISCO PAREDES ROSALES

RESUMEN

El presente estudio se realizó en la División de Reproducción Animal, Departamento de Inseminación Artificial del Centro de Desarrollo Ganadero (C.D.G.), dependencia del Ministerio de Agricultura y Ganadería, localizado en el Cantón El Matazano, Municipio de Soyapango, Departamento de San Salvador, el cual se encuentra a 650 msnm, con una temperatura promedio de 26 °C, humedad relativa promedio anual de 76% y precipitación promedio de 1959 mm.

La investigación se orientó a buscar un diluyente que permitiera mantener una viabilidad post-descongelamiento del semen caprino para poder utilizar este material en Inseminación Artificial; además se evaluó la edad de los animales, para poder determinar la edad más conveniente para utilizar los cabros como sementales.

Los diluyentes desempeñan un papel importante en la sobrevivencia del material espermático. Por ello se evaluaron cinco diluyentes, que variaron del testigo en los siguientes componentes: T_0 = Tratamiento testigo; T_1 = testigo modificado (23,2 gr de Citrato); T_2 = testigo modificado (80 ml de glicerina y 200 ml de yema de huevo); T_3 = testigo modificado (80 ml de glicerina, 100 ml de yema de huevo y 10 gr de glucosa); y T_4 = testigo modificado (80 ml de glicerina, 200 ml de yema de huevo y 10 gr de glucosa).

Se utilizó el diseño experimental de parcelas divididas completamente al azar, con cinco tratamientos (parcela principal), tres cabros (sub-parcela) y 12 repeticiones por cabro, a los resultados se les aplicó la prueba de Duncan, para determinar la superioridad del mejor tratamiento y de la mejor edad de los sementales.

Los parámetros evaluados fueron la viabilidad post-descongelamiento a temperatura de 38 °C y la viabilidad post-descongelamiento con la prueba ácida, se encontró diferencia significativa entre tratamientos, resultando mejor los tratamientos T_2 y T_4 en comparación con el testigo, no así los tratamientos T_3 y T_1 , que presentaron promedios menores de viabilidad en comparación con el tratamiento testigo.

El análisis económico mostró que al comparar el tratamiento T_0 con T_1 , este último resultó ser más económico pero sin tener niveles adecuados de viabilidad, en cambio los tratamientos T_2 y T_4 , resultaron con un costo superior a los demás tratamientos, el cual se compensó con los altos porcentajes de viabilidad obtenidos. El tratamiento T_3 presentó un costo similar al tratamiento T_2 , pero no dió resultados aceptables de viabilidad.

AGRADECIMIENTOS

- A DIOS TODOPODEROSO :
Por permitirnos llegar a la culminación de nuestra carrera.
- A LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR :
Especialmente a la Facultad de Ciencias Agronómicas, por habernos dado la oportunidad de forjarnos como profesionales.
- ANUESTRO ASESOR :
Ing. Agr. Horacio Gil Zambrana Rivera, por su apoyo incondicional en la asesoría de la presente investigación.
- AL CENTRO DE DESARROLLO GANADERO, SOYAPANGO :
Especialmente al personal de Reproducción Animal, Señores : Dr. Ernesto Sánchez, al señor Mariano Beltrán y al señor Ascensión Oviedo.
- A TODAS LAS PERSONAS QUE LABORAN EN LA GRANJA CAPRINA DEL CENTRO DE DESARROLLO GANADERO :
Especialmente al Sr. Mártir Pablino.
- AL MEDICO VETERINARIO : JORGE MARIO RODRIGUEZ
Por la ayuda que nos brindó en forma espontánea y desinteresada.
- A LOS MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR :
Por sus acertadas observaciones con el fin de mejorar el documento.
- A LA SEÑORA MARINA RODRIGUEZ :
Por su valiosa colaboración.

- AL PERSONAL DE LA BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS :
Especialmente a los señores Francisco Osorio Vargas y - Carlos Corvera, por su valiosa y oportuna colaboración.

- NUESTRO AGRADECIMIENTO A LAS PERSONAS QUE DE UNA U OTRA MANERA CONTRIBUYERON AL DESARROLLO DEL PRESENTE TRABAJO.

DEDICATORIA

- A DIOS TODOPODEROSO :
Con eterna gratitud por manifestarme su presencia cada día ayudándome a vencer obstáculos en el desarrollo de mi carrera.
- A MI PADRE : Andrés Ismael Morales
Por su ayuda y sabios consejos en los momentos difíciles.
- A MI MADRE : Ana Cristina Herrera
Con amor eterno y profunda gratitud, por su abnegación y sacrificio para ayudarme a culminar con éxito mis estudios.
- A MI HERMANO : Nelson Iván Morales
Con mucho cariño.
- A MI ABUELITA : María Martha Serrano
Con especial cariño por toda su ayuda y cariño.
- A MIS TIOS :
Alba Marina, Gloria, Yenia, Silvia, Eduardo y Víctor.
Con todo cariño por brindarme su apoyo y comprensión en todo momento.
- A MI NOVIO Y COMPAÑERO DE TESIS : Carlos Armando Borja Melara, por darle sentido a mi vida, demostrándome su amor en todo momento.
- A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS :
Por su amistad y apoyo.

- A MIS MAESTROS ;

Por la enseñanza brindada en toda mi formación profesional.

- A MIS AMISTADES :

Con especial cariño.

Aura Jasmin

DEDICATORIA

- A DIOS MI CREADOR :
Por permitirme lograr los anhelos de mis padres.
- A LA MEMORIA DE MIS PADRES :
José Brígido Borja y María Antonia Melara de Borja.
Por haberme guiado con sabiduría, amor y sacrificio hasta donde Dios les permitió.
- A MI HERMANA : Salvadora Borja.
Quien ha sido una segunda madre al brindarme apoyo en todo momento fortaleciendo mis deseos de superación.
- A MIS DEMAS HERMANOS :
Dolores, Silvio, Angela, Rosario, Rosa Audelia, Eduardo y Roberto, por su apoyo y amor en todo momento.
- A MI TIA CARMEN :
Con mucho cariño y amor.
- A MIS SOBRINOS :
Alfredo, Patricia, Ernesto, Susana, Silvia, José, Helen, Ana y Josue, con mucho cariño.
- A MI NOVIA Y COMPAÑERA DE TESIS : Aura Jasmin Morales Herrera, por su gran ayuda, amor y comprensión durante mi carrera.
- A MIS PROFESORES :
Por todo los conocimientos brindados que contribuyeron a mi formacion profesional.
- A MIS COMPAÑEROS DE ESTUDIO:
Por su amistad y ayuda durante mi carrera.

Carlos Armando

I N D I C E

	Página
RESUMEN	iv
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA	viii
INDICE DE CUADROS	xvi
INDICE DE FIGURAS	xviii
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	3
2.1. Generalidades del espermatozoide	3
2.1.1. Morfología y fisiología de los esper matozoides	3
2.2. Semen : Definición	6
2.3. Generalidades del semen	6
2.3.1. Volumen	6
2.3.2. Aspecto	7
2.3.3. Viscosidad	7
2.3.4. Presión osmótica	7
2.3.5. Movimiento	8
2.3.6. Temperatura	8
2.3.7. Concentración	9
2.4. Conservación del semen en congelación	9
2.5. Procesamiento del semen en minitubos	10
2.6. Congelamiento del semen caprino	11
2.7. Técnicas de recolección del esperma	11

	Página
2.7.1. Método del electroeyaculador	13
2.7.2. Método de la vagina artificial	14
2.8. Vagina artificial para cabro	15
2.9. Recolección de semen caprino	16
2.10. Edad de los animales reproductores	16
2.11. Dilución del semen	17
2.12. Condiciones que debe de reunir un diluyente.	18
2.13. Composición de los diluyentes utilizados para la conservación a bajas temperaturas del semen caprino	19
2.14. Función de los componentes en el diluyente .	21
2.14.1. Función de la yema de huevo	21
2.14.2. Función de la glucosa	22
2.14.3. Función del citrato de sodio	22
2.14.4. Función de los antibióticos	22
2.14.5. Función de la glicerina	23
2.14.5.1. Acción protectora de la glic <u>er</u> ina	24
2.14.5.2. Grado óptimo de glic <u>er</u> iniza <u>ci</u> ón	25
2.15. Definición de inseminación artificial	25
2.16. Reseña histórica de la inseminación artificial	26
2.17. Ventajas de la inseminación artificial	27
2.18. Desventajas de la inseminación artificial ..	29

	Página
3.3.3. Recolección del material espermático.	35
3.3.4. Evaluación del semen	36
3.3.4.1. Evaluación del volumen	37
3.3.4.2. Evaluación del color	37
3.3.4.3. Evaluación de la consisten- cia	38
3.3.4.4. Evaluación del pH	38
3.3.4.5. Evaluación de la motilidad.	38
3.3.4.6. Determinación de la concen- tración de espermatozoides.	40
3.3.4.7. Determinación de espermato- zoides vivos, muertos y anor- malidades	41
3.3.5. Dilución	42
3.3.6. Envasado	43
3.3.7. Congelación del semen caprino	44
3.3.8. Evaluación del porcentaje de viabili- dad del semen post-descongelamiento..	45
3.3.8.1. Descongelamiento a tempera- tura de 38 °C	45
3.3.8.2. Prueba ácida	46
3.3.8.3. Unidades experimentales ...	47
3.4. Metodología estadística	47
3.4.1. Factores en estudio	47
3.4.2. Diseño estadístico	48

	Página
3.4.3. Distribución de los tratamientos ...	48
4. RESULTADOS	50
4.1. Análisis de viabilidad del material espermá tico	50
4.2. Análisis de costos	51
4.3. Discusión de resultados	53
5. CONCLUSIONES	55
6. RECOMENDACIONES	56
7. BIBLIOGRAFIA	57

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Componentes del diluyente testigo	34
2	Escala de valores para medir motilidad esper- mática	39
A-1	Datos de resultados en porcentajes de viabi- lidad para la prueba de descongelamiento a - temperatura de 38 °C	61
A-2	Datos de resultados en porcentajes de viabi- lidad para la prueba ácida	62
A-3	Transformaciones angulares ($\text{arc sen } \sqrt{x}$) de los porcentajes de viabilidad a temperatura de 38 °C	63
A-4	Transformaciones angulares ($\text{arc sen } \sqrt{x}$) de los porcentajes de viabilidad para la prueba ácida	64
A-5	Análisis de varianza (38 °C)	65
A-6	Rango múltiple de Duncan para los tratamien- tos (38 °C)	65
A-7	Rango múltiple de Duncan para la edad de los cabros (38 °C)	65
A-8	Análisis de varianza (prueba ácida)	66

Cuadro		Página
A- 9	Rango múltiple de Duncan para los tratamien- tos (Prueba ácida)	66
A-10	Rango múltiple de Duncan para la edad de -- cabros (prueba ácida)	66
A-11	Presupuesto por litro de diluyente	67
A-12	Presupuesto (costo de inversión)	69
A-13	Examen de Brucelosis	78
A-14	Examen coprológico	79
A-15	Hemograma	80
A-16	Examen coprológico	81
A-17	Prueba de Brucelosis	82

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
A-1	Efecto de cabro y diluyente de semen congelado sobre la viabilidad (arc sen de la raíz cuadrada del %), post-descongelamiento a -- 38 °C	71
A-2	Efecto de cabro y diluyente de semen congelado sobre la viabilidad (arc sen de la raíz cuadrada del %), post-descongelamiento a prueba ácida	72
A-3	Viabilidad post-descongelamiento de semen caprino a 38 °C, a prueba ácida	73
A-4	Método de la vagina artificial, utilizando como señuelo una cabra	74
A-5	Vista lateral de un maniquí portátil, para recolección de semen caprino	74
A-6	Vagina artificial y sus componentes	75
A-7	Método de llenado de la cámara cuenta glóbulos con la pipeta de Tome	76
A-8	Cuadrícula para conteo de eritrocitos de la cámara de Neubauer, empleada para determinar la concentración de espermatozoides	76
A-9	Diagrama de la ultra estructura del espermatozoide	77

INTRODUCCION

La importancia social de los caprinos, en El Salvador - radica en especial en que estos animales representan un - acceso económico a la proteína de origen animal en la dieta alimenticia de las familias pobres, en forma de leche y algunas veces la carne.

Debido a que estos animales se reproducen con eficiencia, de 2 a 4 crías por año y algunas veces 5; se puede lograr un mejoramiento genético rápido al utilizar sementales calificados, estos sementales deben mantenerse en buenas condiciones y en forma estabulada, lo que incrementa los costos de mantenimiento. La técnica de congelamiento de semen caprino permite una mayor utilización de estos sementales, reduciendo los costos de su mantenimiento.

El seleccionar un reproductor de alta fertilidad, es uno de los problemas más críticos y ello implica que a cada animal se le exija una alta capacidad fertilizadora. Se considera que un macho de fertilidad normal es aquel que produce una adecuada cantidad de gametos viables, es capaz de depositar estos gametos en los genitales de la hembra y que la cría nacida también debe ser viable. En el caso de los reproductores destinados a inseminación artificial es necesario agregar que el semen producido, debe mantener su capacidad fecundante después de haber sido sometido a un proceso de dilución.

congelación y descongelación. Toda alteración de los procesos : dilución, refrigeración, congelación, almacenamiento, descongelamiento, para nombrar los principales, provocan deterioro de la capacidad fecundante.

En esta investigación se realizó , por primera vez en El Salvador, la conservación del semen caprino a bajas temperaturas con una alta viabilidad post-descongelamiento, a un costo razonable lo cual ofrecerá al usuario alternativas para seleccionar el tipo de explotación caprina que desee (cárnica o lechera) y a la vez reducirá los costos de mantenimiento de un semental en explotaciones pequeñas.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Generalidades del espermatozoide

Los espermatozoides son células germinales que, por maduración en su tránsito por el epidídimo, tiene la facultad de poder fecundar el óvulo. Su actividad aumenta al envolverse en el líquido segregado por la próstata (12).

Están conformados por un núcleo portador de la información genética, dotado de un flagelo con función de central energética y carecen de protoplasma. Pueden permanecer largo tiempo inmóviles en el epidídimo, en un estado de anabiosis, pero al ser eyaculados entran en activo movimiento, como manifestación de una actividad metabólica intensa que se desarrolla en el espiral mitocondrial del flagelo, con glicólisis de azúcar (fructosa, glucosa, sorbitol, etc.), contenidos en el plasma seminal (18).

2.1.1. Morfología y fisiología de los espermatozoides

Un espermatozoide flagelado típico, ofrece tres regiones distintas: la cabeza, la pieza intermedia y la cola, que en su forma, dimensiones y estructura varían bastante según las especies. Las dos funciones principales del espermatozoide maduro, la motilidad y el poder de fertiliza-

ción, dependen de la disposición estructural de la cabeza y del flagelo (10).

Aunque el tamaño y la forma difiere entre las especies de animales domésticos, la estructura morfológica es similar. La cabeza del espermatozoide es alargada y ovoidal, ancha y plana en un plano y estrecha en el otro, con la porción más gruesa en la base y aplanándose hasta volverse muy fina en el extremo. La cabeza está llena de material nuclear casi homogéneo que contiene el material genético, ADN (22).

Cada espermatozoide contiene alrededor de 2,500 millones de unidades de información necesarias para formar un feto. La parte anterior de la membrana nuclear o membrana interna del acrosoma, se modifica para formar el perforatorio, poco desarrollado en los espermatozoides de los animales domésticos en comparación con los de la rata, el perforatorio, está cubierto por el casquete del acrosoma, una estructura en forma de bolsa de pared doble de alrededor de 0,1 micra de grosor que encierra la sustancia acrosómica y el corpúsculo acrosómico más denso. La zona o segmento ecuatorial, es la parte posterior al acrosoma o casquete de la cabeza, y está ubicada alrededor de la porción media de la cabeza espermática. La membrana celular, compuesta de varias capas, encierra la cabeza, el cuerpo y la cola del espermatozoide. La membrana está adherida a la célula en la parte anterior del casquete acrosómico, el post-nuclear y el anillo ---

de Jensen (22). El acrosoma puede deteriorarse con la edad, y abstinencia sexual larga, al desprenderse dejando libre la hialuronidaza (13). El deterioro se debe a la ruptura de la membrana celular y de la membrana externa del casquete acrosómico de la zona ecuatorial que dejó al descubierto enzimas tales como la hialuronidaza del casquete acrosómico, - necesarias junto con el perforatorio para la penetración del espermatozoide en el óvulo. Las membranas externas del acrosoma, una vez desprendidas pueden romperse en dos mitades o seguir unidas y aparecer como estructuras en forma de gorra de baño en frotis de semen coloreado (22).

La región centriolar, cuello o zona de implantación es estrecha y une la cabeza, la parte intermedia y al flagelo; es la parte más vulnerable y más frágil del espermatozoide: contiene el centriolo proximal, considerado como el centro cinético de la motilidad del espermatozoide, ya que, aun faltando la cabeza, la pieza intermedia o la cola son capaces de movimiento (10).

La región de la cola, que es la parte más larga del espermatozoide, se origina en el anillo terminal del cuerpo y se extiende hasta la parte extrema. La parte final o terminal de la cola, tiene de 3 a 4 micras de largo. La acción ondulante o flagelo de la cola se inicia en la región del cuello de la pieza intermedia y genera fuerza contráctil a medida que procede en dirección distal (22).

2.2. Semen : Definición

El semen o esperma es la descarga seminal completa del macho durante la eyaculación. Consiste en elementos celulares, los espermatozoides, producidos por los canalículos seminíferos, y plasma seminal, o sea la parte líquida del semen (22).

Los espermatozoides y el plasma seminal en distintas proporciones, constituyen el esperma o plasma fecundante que presenta diferente constitución según la especie.

El plasma espermático sirve de vehículo para los espermatozoides, pero su importancia radica, en que contiene sustancias como sales minerales (calcio, sodio, potasio, magnesio, fósforo), nitrógeno, fosfatasa, albúmina, proteínas, fructosa, ácido láctico, ácido cítrico, que condicionan la actividad funcional de los espermatozoides, su maduración, su respiración y su movilidad (24).

2.3. Generalidades del semen

2.3.1. Volumen

La cantidad de esperma eyaculado, es muy diferente según las especies y los individuos, y está determinado por las condiciones raciales, ambientales e individuales (10, 24).

2.3.2. Aspecto

El aspecto del esperma en el momento de la eyaculación, es espeso, como un líquido denso, láctecente, gelatinoso, -- granuloso, con floculaciones por la presencia abundante (80%) de "geles" (10, 12).

2.3.3. Viscosidad

A la observación directa presenta cierto grado de viscosidad necesaria para el movimiento de los espermatozoides, y que aumenta a mayor concentración espermática. Esta viscosidad no debe, sin embargo pasar cierto grado más allá del cual el movimiento de los espermatozoides sería difícil. El moco denso proveniente de lesiones de la vagina o de la cervix no permite el paso de los espermatozoides. Se ha demostrado experimentalmente que no pueden avanzar en una solución de goma arábica al 35% (12).

2.3.4. Presión osmótica

La presión osmótica tiene también gran importancia: -- Las soluciones hipertónicas o hipotónicas, detienen el movimiento de los espermatozoides, produciendo en ellos profundas modificaciones, de la cola (12).

2.3.5. Movimiento

La movilidad es un índice de vigor de los elementos espermáticos (7). El movimiento de los espermatozoides es un movimiento activo, debido, según algunos autores, al centro cinético localizado en el segmento intermedio; según otros en la cola. Los espermatozoides presentan ya cierta movilidad al pasar por los tubos seminíferos a las vesículas espermáticas, en las cuales la presencia de fructosa aumenta la energía cinética. El movimiento se realiza en línea recta y contra la corriente (10, 24).

2.3.6. Temperatura

La temperatura es un factor importantísimo en la actividad dinámica funcional de los espermatozoides, determinada talvés por las condiciones del medio ambiente y por la temperatura de los testículos cubiertos por el escroto, fuera de la cavidad abdominal; esta temperatura, inferior a la del interior del cuerpo, es debida a un mecanismo termorregulador de origen reflejo.

La temperatura óptima para los espermatozoides, es de al rededor de los 37 °C, ó muy poco menos, mientras que la de 40 °C; es ya nociva, y a los 45 °C mueren. Las temperaturas bajas moderan el movimiento y el metabolismo, y hasta los --

0 °C los espermatozoides se inmovilizan, sobreviven, sin embargo, en un estado de anabiosis en temperaturas muy bajas. La temperatura condiciona su metabolismo actuando sobre la fructólisis, que activada por las altas temperaturas, determina la acidez del plasma seminal por la mayor producción de ácido láctico (12, 24).

2.3.7. Concentración

La concentración espermática, indica la riqueza de espermatozoides del semen (24). Esta riqueza de espermatozoides se expresa por mm^3 ; este valor tiene gran importancia y es necesario conocerlo para juzgar la calidad de un esperma. Se han empleado diversos métodos para investigarlo, especialmente: la numeración directa en la cámara cuenta glóbulos, la nefelometría y la espermio-densimetría (7, 10, 21)..

2.4. Conservación del semen por congelación

El inicio de la conservación de semen por congelación, fue marcado por Polge y Col (1949), al observar la acción protectora de la glicerina, por primera vez en espermatozoides de aves. Ya en plena era de congelación de semen bovino, Nagase y Graham (1964), mostraron las ventajas de una solución lactosa al 11% que adicionada de 20% de yema de huevo y

5% de glicerina, constituía un diluyente sencillo y barato para la congelación de pellets. En forma simultánea, Davis y Col (1963), complementados por Steinbach y Foote (1967), ensayaron el buffer "TRIS" (hidróximetil aminometano 3.028 gr.; ácido cítrico. H₂O 1.678 gr.; fructosa 1.25 gr; glicerol 8 ml; H₂O C.S.P. 100 ml), que adicionado de 20% de yema de huevo, constituye una interesante alternativa al - buffer citrato (18).

2.5. Procesamiento del semen en minitubos

La criopreservación de semen en nitrógeno líquido, que abrió la posibilidad de conservar el semen por períodos ilimitados, hizo que a partir de la década de 1960, los Centros de Inseminación, buscaran alternativas de empaque de dosis, que permitieran ahorrar espacio en los costosos envases térmicos de conservación. La meta más ambiciosa, de conservar semen por lyofilización no ha sido lograda. Sin embargo, se han consolidado las tecnologías de conservación en pajuelas, descritas como "PAILLETES" por Cassou (1964) y su derivación, las pajuelas "Minitub", descritas por Simmet (1972). Para semen bovino, estas últimas son utilizadas en combinación con diluyente, TRIS (Steinbach & Foote, 1967), el cual permite diluir el semen en una sola fracción - glicerizada, a temperatura ambiente, haciendo prescindible

vitricas o cámaras de refrigeración necesarias para metodologías de procesamiento fraccionado.

Tanto la forma de empaque en minitubos, como también el diluyente Tris, han resultado adecuados para la conservación de semen caprino. El volumen de la dosis (0.25 ml), corresponde a la cantidad de semen posible de inseminar en el canal cervical, sin provocar un reflujo excesivo (18).

2.6. Congelamiento del semen caprino

El envase utilizado para el semen congelado, es la pajilla de 0.25 ó de 0.5 ml, que contiene entre 75 - y 150 millones de espermatozoides por dosis. Las pajillas se congelan en tanques de nitrógeno líquido a -196°C , la capacidad de congelación del esperma es variable. Existen machos cuyo esperma se congela con muy buena motilidad post-descongelación, mientras que en otros se produce una necropermia casi total. Con esta técnica, la capacidad fecundante disminuye de 22 a un 60% (17).

2.7. Técnicas de recolección del esperma

La recolección del esperma constituye la primera operación que hay que realizar en la técnica de la inseminación artificial. El método más comúnmente empleado, y prácticamente, en todas las especies animales, es el de la vagina ar

tificial. Al lado de este método corriente, hay que citar la electroeyaculación en el toro, en el morruco, en el perro y en las aves; la recolección directa dentro de la vagina natural en las yeguas y la posibilidad de recoger el esperma pos masturbación en el perro y por masaje de las vesículas seminales en el toro (10).

A fin de hacer la investigación exacta y completa, en semen colectado debe salir, semejando tanto como sea posible, como sucede durante un apareamiento natural. De los distintos métodos descritos, sólo dos son prácticos y proporcionan muestras aceptables.

La recolección hecha por medio de una vagina artificial es el método más fidedigno en lo que respecta a la calidad de la muestra.

Electroeyaculador, este método, cuando lo emplea un operador experto, proporciona buenas muestras. El pene se evagina durante un período mayor al que se requiere durante el apareamiento natural y por lo tanto se puede hacer un examen más completo (26).

La colección del semen puede hacerse en una vagina artificial o mediante estímulo eléctrico del aparato genital, - prefiriéndose el primer método, ya que el semen es de mejor calidad para la conservación por tener una menor cantidad de líquido de las glándulas accesorias (25).

2.7.1. Método del electroeyaculador

Este método se basa en la estimulación eléctrica sobre los centros erector y eyaculador (26).

Este método consiste en la obtención de semen, por medio de un electroeyaculador colocado en el ano, el cual produce descargas eléctricas que estimulan las glándulas vesiculares, ampollas de los conductos deferentes y glándulas sexuales accesorias, las cuales están regidas por el plexo hipogástrico.

Este método se utiliza en los machos que por alguna causa no pueden montar o no aceptan la vagina artificial, animales que padecen de poliartritis, espondilitis, fracturas consolidadas o anquilosis (17).

En caso de emplear el electroeyaculador, es necesario que el macho efectúe una monta sobre un objeto, aunque aún así debe utilizarse la vagina artificial. Un electrodo que presente varios contactos es colocado en el recto del macho y después de una ligera estimulación eléctrica se producirá la eyaculación (23). El macho se debe colocar en posición decúbito lateral (aborregado), el cilindro del electroeyaculador se lubrica y se introduce por el ano, ocupando la cavidad pélvica; la emisión del semen se logra al estimular los nervios simpáticos lumbares (hipogástrico) en la parte anterior de la cavidad pélvica. La aplicación del estímulo debe ser rítmica e intermitente y su intensidad deberá aumentar

se en forma paulatina hasta que se produzca la eyaculación, la - cual es muy rápida. El semen se recoge colocando el embudo con el tubo graduado en la punta del glande (17).

Por lo general, esta técnica produce buenas muestras, - tanto en cantidad como en calidad, aunque la concentración espermática puede ser baja. El método en sí no requiere de un entrenamiento muy intenso y permite la recolección del - semen aún de aquellos machos que se resistan o son incapaces de montar o de soportar una vagina artificial (23).

2.7.2. Método de la vagina artificial

El principio de la vagina artificial, puesto en prácti - ca por Milavanov, consiste en reunir en un aparato simple y practico todas las condiciones naturales presentadas por las vías genitales femeninas en el momento del coito y en reco - ger rápido un eyaculado total y limpio. La forma y las dimensiones de la vagina artificial están en función de la especie para la cual ha sido prevista, teniendo en cuenta la conformación del pene y la talla del animal (10).

La vagina artificial debe de tener las mismas condicio - nes naturales de la vagina de la hembra a fin de despertar la acometida y el reflejo de eyaculación. Los requerimientos im - portantes que deben considerarse en la preparación final del instrumento son: temperatura propia, presión y lubricación - (26).

La vagina artificial consta de dos tubos, un externo de goma fuerte y gruesa y otro interno, de goma fina y suave, y el espacio entre ambos se llena con agua tibia. Uno de los extremos de la vagina lleva una especie de embudo de goma - que termina en un tubo de ensayo graduado que recoge el semen después de la eyaculación (el extremo anterior de la vagina, queda abierto para permitir la entrada del pene). Para mantener la temperatura corporal, el tubo de recolección debe ser protegido con un material aislante de temperatura, para prevenir daño a los espermatozoides en la eyaculación, ya sea por sobrecalentamiento o choque frío (13).

2.8. Vagina artificial para cabro

La vagina artificial empleada para cabros, está compuesta por un tubo rígido de hule, con 20 cm de longitud -- por 4 a 5 cm de diámetro, con una válvula exterior; por el lumen del tubo se introduce una manga de látex de 30 - cm, la cual se dobla sobre los extremos del tubo, creando así una cámara de aire. En uno de los extremos del tubo se coloca un cono de látex, provisto de un tubo colector en su parte terminal (tubo de centrifuga graduado), cubierto con una funda para evitar que la luz afecte los espermatozoides. Por la válvula del tubo de hule se introduce agua caliente para que la temperatura interna de la vagina artificial - al momento de la colección del semen, esté temperada, entre -

40 y 42 °C (17).

2.9. Recolección del semen caprino

La recolección se realiza en general por medio de la vagina artificial del mismo tipo que la empleada en el morruco. La temperatura interior debe situarse entre los 44-45 °C y, como el espermatozoides del macho caprino es muy sensible al choque térmico, es aconsejable el calentar y proteger el tubo colector o incorporarlo en el interior de la vagina artificial después de la recolección.

El tiempo necesario para conseguir la eyaculación varía con los individuos, con el grado de preparación y con la temperatura; la recolección es preferible la realice siempre la misma persona y en el mismo lugar. Los machos con buen ardor sexual pueden dar dos eyaculados durante una misma sesión, pero es útil dejar transcurrir cierto tiempo entre cada recolección (10).

2.10. Edad de los animales reproductores

La calidad del semen y la fertilidad se desarrollan con la pubertad hasta el momento de alcanzar la madurez sexual. La edad también influye sobre el líbido y capacidad para el apareamiento (8).

Existen notorias diferencias entre las razas respecto a -

la edad a la cual se alcanza la madurez sexual primaria. - Puede variar de 4 a 3 meses en aquellas razas de maduración temprana y hasta 12 meses en las otras (13).

El macho cabrío, es un reproductor muy vigoroso de acuerdo con la raza, y en pleno desarrollo puede dar de 10 a 20 saltos diarios y cubrir igual número de cabras. Uno solo sería suficiente en un sistema irracional para 200 cabras y aún más. Lo normal es que un macho joven a los 12 ó 18 meses de edad pueda preñar de 20 a 25 hembras, mientras que un macho maduro de 40 a 50 (1).

Los machos cabríos menores de 18 meses de edad, no deben cubrir a las hembras porque si las cubren se quedan pequeños y las hembras que fecundan no paren buenas crías.

Cuando tiene más de cuatro años, los machos son menos vigorosos y las crías que se producen no son buenas (8).

2.11. Dilución del semen

La expansión de la inseminación artificial, ha estado ligada a la puesta en práctica de medios apropiados para la dilución y la conservación del semen. La dilución permite aumentar el volumen total de la masa espermática, asegurar un medio favorable para la supervivencia de los espermatozoides in vitro y realizar, a partir de un solo eyaculado, la inseminación de un número muy elevado de hem--

bras. Los progresos más evidentes sobre esta materia están ligados al descubrimiento por Phillips (1939), del papel protector y conservador de la yema de huevo y la puesta en práctica por este autor y Lardy de un diluyente de yema de huevo fosfatada (10).

El semen se diluye a frecuencias específicas, de tal forma que el volumen de semen inseminado contenga suficientes espermatozoides para dar una elevada fertilidad, sin desperdiciar muchas células (13).

2.12. Condiciones que debe de reunir un diluyente

Los medios de dilución deben responder a un cierto número de condiciones :

- Presentar una presión osmótica lo más isotónica posible, semejante al esperma de la especie para la cual ha de ser utilizada y que sea capaz de mantenerla durante el tiempo de almacenamiento.
- Contener sustancias tampón que permitan mantener un pH favorable para los espermatozoides. Estos elementos tampón tienen menos importancia en los espermatozoides de escasa concentración, como los sementales equino o de verraco; sin embargo, tienen una gran importancia para el esperma del morruco y de toro debido a la elevada concentración de espermatozoides que hacen que presenten una glucólisis intensa.

- Contener sustancias coloidales (yema de huevo, lipoproteínas o lecitinas), capaces de proteger a los espermatozoides.
- Poseer elementos que favorezcan el metabolismo, la vitalidad y longevidad de los espermatozoides.
- Estar libres de sustancias, productos bacterianos y organismos infecciosos que sean perjudiciales para los espermatozoides, para el tracto genital de la hembra o para el proceso de fecundación, así como para la implantación y desarrollo del óvulo fecundado.
- El diluyente debe mejorar el poder fecundante del espermatozoide y mantenerlo a un nivel elevado de vida, durante el mayor tiempo posible.
- Debe de ser de fácil preparación, prestarse fácilmente a la esterilización e higiénico.
- Ser finalmente económico (9, 10).

2.13. Composición de los diluyentes utilizados para la conservación a bajas temperaturas del semen caprino.

<u>Diluyente 0</u>	<u>Cantidad</u>
Ingredientes :	
Citrato de sodio	32.2 gr
Glicerina	70.0 ml
Yema de huevo	200.0 ml
Penicilina	1.6 gr
Dihidro estreptomycinina	1.6 gr

<u>Ingredientes :</u>	<u>Cantidad</u>
Agua destilada estéril cantidad suficiente para (C.S.P.).	1000.0 ml

Diluyente 1

<u>Ingredientes :</u>	<u>Cantidad</u>
Citrato de sodio	23.2 gr
Glicerina	70.0 ml
Yema de huevo	200.0 ml
Penicilina	1.6 gr
Dihidro estreptomicina	1.6 gr
Agua destilada estéril (C.S.P.)	1000.0 ml

Diluyente 2

<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidad</u>
Citrato de sodio	32.2 gr
Glicerina	80.0 ml
Yema de huevo	200.0 ml
Penicilina	1.6 gr
Dihidro estreptomicina	1.6 gr
Agua destilada estéril (C.S.P.)	1000.0 ml

Diluyente 3

<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidad</u>
Citrato de sodio	32.2 gr
Glicerina	80.0 ml
Yema de huevo	100.0 ml
Penicilina	1.6 gr
Dihidro estreptomicina	1.6 gr
Glucosa	10.0 gr

<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidad</u>
Agua destilada estéril (C.S.P.)	1000.00 ml

Diluyente 4

<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidad</u>
Citrato de sodio	32.2 gr
Glicerina	80.0 ml
Yema de huevo	200.0 ml
Penicilina	1.6 gr
Dihidro estreptomicina	1.6 gr
Glucosa	10.0 gr
Agua destilada estéril (C.S.P.)	1000.0 ml

2.14. Función de los componentes en los diluyentes

2.14.1. Función de la yema de huevo

La yema de huevo parece tener una función protectora y un efecto conservador sobre los espermatozoides, permitiendo una mayor supervivencia de los mismos. Su efecto protector se manifiesta ante las variaciones bruscas de temperatura, como ante ciertos agentes químicos.

Los lípidos del huevo se comportan como factores de protección, mientras que los complejos lípidos-protéicos actúan como protectores y conservadores.

El efecto protector se consigue con una concentración de

5% de yema de huevo, mientras que el efecto conservador-protector requiere por lo menos una concentración de 25%.

La yema de huevo se separa de los demás componentes del huevo, ya que éstos son deletérios para los espermatozoides (9, 21).

2.14.2. Función de la glucosa

La adición de glucosa o fructosa a un medio de dilución, parece constituir un elemento que favorece la vitalidad de los espermatozoides. Parece sin embargo, que estos azúcares intervendrían más por su acción física al mantener una presión osmótica y un balance electrolítico conveniente para el medio, que por la energía metabólica que pudiese proporcionar a los espermatozoides (10).

2.14.3. Función del citrato de sodio

Este funciona regulando el medio ácido de los desechos resultantes del metabolismo de los espermatozoides. En particular, la acción del ácido láctico (21).

2.14.4. Función de los antibióticos

Los antibióticos son productos inhibidores del desarrollo de los gérmenes tanto vanales como específicos. La con-

taminación del semen hace descender de forma significativa su capacidad de conservación y fertilidad, por ello la adición de antibióticos al diluyente está justificada (20).

Estos tienen una doble función: destruir los organismos patógenos y reducir el metabolismo de los espermatozoides. Los investigadores encuentran que la adición de penicilina y estreptomicina al semen congelado no tiene ningún efecto desfavorable sobre el grado de reanimación, la motilidad y la fertilidad, es de uso corriente y aconsejable incorporar estos antibióticos a la concentración de 500 a 1000 mg/ml (10, 21).

2.14.5. Función de la glicerina

Su función es la de servir como anticongelante, si el esperma se congela en la ausencia de un anticongelante, la célula se lisa y muere, ya que las formaciones cristalinas de hielo son como agujas que punzan el espermatozoide. El anticongelante produce un cambio en la formación de los cristales de hielo, de modo que éstos formen capas en vez de agujas. Los espermatozoides son capaces de soportar el proceso y permanecer viables.

El anticongelante más común es el glicerol, cuya concentración, en el semen diluido varía de 6-12%. La incorporación de glicerol al semen es un proceso delicado que debe ha

cerse en forma gradual; la que se realiza con rapidez, destruye los espermatozoides (21).

2.14.5.1. Acción protectora de la glicerina

El mecanismo protector de la glicerina se basa, en varias circunstancias: La glicerina suprime la parte - peligrosa durante la cual los espermatozoides se encuentran en presencia de una solución salina demasiado concentrada; reduce el choque osmótico disminuyendo la concentración salina e impidiendo la salida del agua celular; dificulta la formación de hielo intracelular, pero conduce, por el contrario, a la formación de una masa vítrea solidificada. La glicerina puede participar en la actividad metabólica oxidativa de la célula.

Las investigaciones realizadas sobre la criogenización - del esperma, han sido numerosos y todavía se realizan hoy en día; se han llevado a cabo sobre el conjunto de factores capaces de actuar y modificar el proceso, a saber: naturaleza del diluyente, proporción óptima de glicerina, tiempo de glicerización y equilibración, velocidad de refrigeración, -- temperatura óptima de congelación y almacenamiento, temperatura de descongelación y poder fecundante del semen congelado (10).

2.14.5.2. Grado óptimo de glicerización

La documentación que trata sobre la concentración de glicerina en el menstuo y sobre la forma de realizarlo es abundante. Al inicio Polge y Col, habían sugerido el 15% después este mismo autor recomienda no sobrepasar el 10% si se quiere evitar cualquier alteración de los espermatozoides. Del conjunto de los numerosos trabajos relativos a este problema se puede resumir que la concentración de glicerina puede variar con arreglo al diluyente; el grado óptimo final se situaría entre 7 y 7.6% con un menstuo citrato; estaría entre 7 y 10% con la leche homogenizada y podría alcanzar del 10 al 13% en los diluyentes a base de leche descremada, el grado de supervivencia de los zoospermios después de la congelación y calentamiento estaría en parte condicionado por la relación entre las cantidades de glicerina y yema de huevo. Las tasa óptimas respectivas de estos productos podrían situarse entre el 7 y el 20% (10).

2.15. Definición de inseminación artificial

La inseminación artificial, consiste en depositar el esperma por vía instrumental, en la parte más apropiada de las vías genitales de la hembra. El semen fecundante, recogido por un procedimiento variable, sufre ante todo una dilución apropiada y conveniente de tal manera que el producto

de una sola eyaculación puede servir para la inseminación de un número más o menos elevado de hembras. El método permite, pues, multiplicar de forma considerable la capacidad reproductora de los machos y, aplicada en forma juiciosa puede constituir un poderoso medio de mejora del ganado, porque permite utilizar reproductores de alto valor, que facilitan la selección y el mejoramiento genético (10).

2.16. Reseña histórica de la inseminación artificial

El método había sido utilizado por los árabes ya hacia el año 1332 ; no obstante, no es hasta el año 1779 - cuando aparece la primera realización cierta de inseminación artificial. El fisiólogo italiano Lauro Spallanzini inyecta en la vagina de una perra en celo esperma recogido por excitación mecánica del pene; la hembra así tratada parió 62 días después tres cachorros bien constituidos. Un siglo más tarde, Sir Everett Millais (1884) y Albrecht (1884) reprodujeron con acierto el experimento de Spallanzini. La inseminación artificial fue practicada con éxito en la yegua por Repiquet (1890). Por Hofman de Stuttgart, que da una descripción detallada de la técnica y del material necesario, y por Sand (1902), que ya vió en ella un medio de difusión para el semen de progenitores selectos. Hay que tener en cuenta, sin embargo, los trabajos de Elie Ivanow y los de la Escuela Rusa, para ver como la inseminación toma un verda

dero desarrollo al introducirse de una forma clara en las prácticas de cría del ganado; después de haber obtenido grandes éxitos en la yegua (en 1912 obtiene 31 concepciones de 39 yeguas inseminadas). Ivanow busca el modo de aplicar el método a los bovinos y a las ovejas.

Con la ayuda de sus colaboradores Kuznetsova, Milavanov, Selivanova, etc., pone a punto la cuestión de la vagina artificial y publica estudios del más alto interés sobre la fisiología del esperma.

En 1938, las hembras inseminadas en Rusia se agruparon de la forma siguiente: 120,000 yeguas, 1,200,000 vacas y 15,000,000 de ovejas. Sorensen, en Dinamarca, establece la primera Cooperativa de Inseminación Artificial en 1936 y 1,700 vacas son inseminadas en el primer año, con un 59% de fecundaciones a la primera intervención; 1,200,000 cabezas, es decir, más del 60% de los efectivos de la nación, fueron inseminados en Dinamarca en 1954 (9, 10).

2.17. Ventajas de la inseminación artificial

- Este método permite el empleo en gran escala de machos cabríos.
- Permite mayor aprovechamiento de los machos seleccionados.
- Es más económico que el poseer un macho cabro, para aquellos productores que tienen rebaños pequeños (4).

- Servicios económicos por el precio de la dosis.
- Contribuye a la utilización de registros de apareamientos exactos, que benefician el manejo del hato.
- Reduce los daños físicos a las hembras por el uso de machos nerviosos (10).
- La conservación del esperma a baja temperatura, permite una mayor utilización del semen, tanto en el tiempo como en el espacio :
 - a) En el tiempo, porque es posible mantener por períodos prolongados semen que proviene de un individuo y emplearlo aún hasta después de muerto el macho donante.
 - b) En el espacio, a consecuencia de la facilidad del -- transporte del semen a grandes distancias y sin ninguna alteración de su calidad, sin que sea necesario -- trasladar al macho.
- La posibilidad, gracias al método de electroeyaculación, de utilizar animales de alto valor genético que padecen incapacidad coital adquirida, como consecuencia de alteraciones esqueléticas y sin la cual su sustitución hubiese sido necesaria.
- La posibilidad de neutralizar las incompatibilidades físicas y psíquicas, que en condiciones naturales constituyen un obstáculo a la unión sexual (13).

2.18. Desventajas de la inseminación artificial

- Se requiere de personal capacitado y con experiencia (4).

2.19. Inconvenientes de la inseminación artificial

- La utilización de reproductores de escaso valor genético, puede tener consecuencias catastróficas para la producción.
- Se puede contribuir a la diseminación de enfermedades venéreas, si el control sanitario de los reproductores no se realiza de una forma sistemática (10).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización

El trabajo se desarrolló en la División de Reproducción Artificial, Departamento de Inseminación Artificial del Centro de Desarrollo Ganadero, dependencia del Ministerio de -- Agricultura y Ganadería, ubicado en el Cantón El Matazano, municipio de Soyapango, departamento de San Salvador, con las - coordenadas $89^{\circ}08'40''$ longitud oeste y $13^{\circ}41'20''$ latitud norte, con una elevación de 660 msnm.

3.2. Características climáticas

Humedad relativa promedio anual de 76%; precipitación pluvial promedio anual de 1959 mm; vientos predominantes de rumbo norte con una velocidad media de 8.3 km/hora; y una máxima absoluta de 115 km/hora, temperatura promedio anual de 26°C , con una máxima promedio anual de 30.4°C y una mínima promedio anual de 18.2°C . (11).

3.3. Metodología

El ensayo se realizó en un período de 120 días, comprendidos del 19 de febrero al 19 de junio de 1992. Fué dividido en dos fases; pre-experimental y experimental.

3.3.1. Fase pre-experimental

Esta fase consistió en la preparación del alojamiento, selección y adiestramiento de los animales.

3.3.1.1. Preparación del alojamiento

Los corrales utilizados, tenían un área de 4 m² cada uno, fueron desinfectados con cal, instalándose comederos, bebederos y heniles antes de alojar los animales.

3.3.1.2. Selección de los cabros a -- utilizar como sementales.

Se utilizó para el ensayo tres animales de diferente edad (8 meses, 2 años y 4 años), seleccionados en base a las siguientes características :

- a) Fertilidad comprobada por descendencia
- b) Características fenotípicas deseables
- c) Características físicas que facilitaran su manejo (machos sin cuernos).

3.3.1.3. Control sanitario

Se realizaron exámenes coprológicos y en atención a los resultados, se aplicaron desparasitaciones.

Se realizaron pruebas de brucelosis a cada animal y no fue necesario descartar ninguno por resultados negativos de la prueba. Se aplicaron complejos vitamínicos (AD₃E, 2 cc - vía intramuscular a cada cabro) cada quince días.

Lo anterior garantizó que el semen recolectado provenía de animales sanos.

3.3.1.4. Alimentación

Una vez estabulados los animales, se les ofreció en forma diaria : Concentrado, pasto Callie fresco y agua. El alimento no consumido se retiró en igual forma.

3.3.1.5. Adaptación de los animales al manejo

Para domesticarlos se bañaron y cepillaron dos veces - por semana

3.3.1.6. Adiestramiento a montas vivas para recolección del semen

Con el propósito de entrenar los animales a la monta se estimularon usando como señuelo una cabra, la cabra fué inmovilizada con un cepo, esto facilitó la recolección del semen al usar la vagina artificial. Este adiestramiento se logró en un período de treinta días.

3.3.2. Fase experimental

3.3.2.1. Desinfección del material

El día anterior a la recolección y dilución del material espermático, fueron preparados los diluyentes, para lo cual el material de cristalería a utilizar fue lavado con detergente, luego de remover el detergente con agua potable, el material se enjuagó con una solución sulfocrómica y detergente, el cual se removió con agua potable, el último enjuague se hizo con agua destilada. Una vez lavado el material se esterilizó por medio del calor en una estufa a 80 °C, durante seis horas.

3.3.2.2. Preparación de los diluyentes

Los reactivos sólidos que se utilizaron para elaborar los diluyentes fueron pesados en una balanza analítica y depositados en un balón de 1000 ml a excepción de los antibióticos, al balón se le agregaron 250 ml de agua destilada, se agitó en forma manual hasta disolver los cristales y homogenizar la solución. Una vez homogénea se aforó el balón, luego se tomó un Erlenmeyer provisto de un embudo con su respectivo filtro desechable, para filtrar la solución, después se depositó en una olla de presión a vapor a 10 lbs de presión, durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se retiró de la olla el Erlenmeyer y se enfrió a temperatura ambiente durante 30 mi-

nutos; su contenido fué dividido en dos porciones de 500 ml.

Partiendo de las dos porciones de 500 ml de la solución de citrato filtrada y esterilizada, se prepararon las soluciones A y B.

Estas soluciones se diferencian en el porcentaje de glicerina que debe de llevar cada una.

Cuadro 1. Componentes del diluyente testigo.

Solución	Citrato de sodio	Glicerina	Yema de huevo	Penicilina	Dihidroestrep-tomicina	Total
A	385 ml	15 ml	100 ml	0.8 gr	0.8 gr	500 ml
B	345 ml	55 ml	100 ml	0.8 gr	0.8 gr	500 ml

3.3.2.3. Preparación de la solución "A"

Del Erlenmeyer destinado a la solución A, se tomaron 385 ml, decantándolos en una probeta de 500 ml y agregándole 15 ml de glicerina y 100 ml de yema de huevo.

3.3.2.4. Preparación de la solución "B"

Del Erlenmeyer destinado a la solución B, se tomaron 345 ml, decantándolos en una probeta de 500 ml y agregándole 55 ml de glicerina y 100 ml de yema de huevo.

Las soluciones A y B se decantaron en forma lenta en su

respectivo Erlenmeyer (A y B), colocando cada uno en agitación magnética durante dos horas.

Simultáneamente se pesaron 0.8 gr de penicilina y 0.8 gr de dihidroestreptomicina para cada una de las soluciones, di solviéndolas por separado en 20 ml de agua destilada estéril, agregando 5 ml de antibióticos a cada una de las soluciones aún en agitación para que se homogenizara.

Homogenizadas las soluciones A y B fueron refrigeradas.

3.3.3. Recolección del material espermático

La recolección se realizó de cabros con previo en- treno a montas vivas utilizando como señuelo una cabra estimu- ladora, el método de recolección utilizado fué el de la vagi- na artificial. (Fig. 4 y 5).

Antes de recolectar el semen se bañaron los cabros ponien- do especial atención en la región abdominal, de manera específica en el prepucio, el cual fué lavado introduciendo agua a pre- sión con una jeringa, se afeitaron los vellos del prepucio y se secó la zona.

Se procedió a preparar la vagina artificial introduciendo la manga de látex dentro del tubo rígido de hule, doblando los extremos de la manga en el tubo de hule, se colocó un cono de látex al cual se sujetó el tubo colector, en el otro extremo se colocó una esponja, de 1/2 pulgada de grosor, ranurada al

centro en forma de cruz, para limpiar en lo posible de vello_u sidades, polvo e impurezas previo a la penetración del pene en la vagina. Se introdujo agua caliente por la válvula del tubo de hule, para que la temperatura interna de la vagina artificial al momento de la recolección del semen, esté entre 40-42 °C, se agregó aire en forma bucal por la misma válvula hasta lograr una turgencia que permitiese la penetración del pene (Fig. 6).

Una vez temperada la vagina, se lubricó la entrada a ésta con una jalea lubricante hidrosoluble (K-Y), y el tubo colector se introdujo en agua temperada a 37 °C, y se protegió con papel aluminio.

Después de preparar la vagina, se estimuló al cabro llevándolo al cepo, donde se encontraba la cabra sin dejarlo montar en los primeros cuatro intentos, hasta que éste se encontrara muy excitado, lo cual se notaba por la desenvainadura del pene y se encatetó la vagina al momento del salto.

Obtenido el semen, se trasladó al laboratorio para su evaluación.

3.3.4. Evaluación del semen

La evaluación se hizo en forma inmediata a la recolección del semen para que las muestras colectadas cuidadosamente pudieran procesarse para preservar la calidad inicial y la

fertilidad al momento de la dilución. Esta valoración comprendió : examen macroscópico con determinación de color, volumen y consistencia del eyaculado, y microscópico, con determinación del porcentaje de células espermáticas con movimiento progresivo (motilidad) y posible detección de malformaciones, alteraciones espermáticas y concentración.

3.3.4.1. Evaluación del volumen

El volumen se midió en forma directa dentro del recipiente de recolección, se utilizó para ello tubos graduados (10 ml). El volumen eyaculado por el cabro varió entre 0.15 y 1.68 ml con un promedio de 0.8 ml.

El promedio del volumen obtenido por eyaculado para el ensayo fue de 1.0 ml.

3.3.4.2. Evaluación del color

El semen eyaculado presentó una coloración blanco cremosa, lo cual sirvió como parámetro de ser semen sano para procesarlo.

Cualquier otra coloración, rosada o amarillenta, hubiera indicado la presencia de glóbulos rojos o de orina en la muestra, lo cual es motivo para su descarte.

3.3.4.3. Evaluación de la consistencia

Generalmente es denso, de aspecto viscoso, el semen pareciera hervir por la motilidad de los espermatozoides y su apariencia perlada.

3.3.4.4. Evaluación del pH

La determinación del pH en el ensayo, se hizo con papel marcador de pH (hidron-paper), que expresa los valores por medio de números enteros del 1 al 14, el valor que se determinó en el ensayo fue de 6.0.

El pH promedio que posee el semen de cabro es de 6.6.

3.3.4.5. Evaluación de la motilidad

Para la apreciación de la motilidad masal, el semen se examinó de manera inmediata a su recolección a una temperatura de 35 °C con el fin de evitar un shock térmico que perjudicara la motilidad del espermatozoide (la temperatura de 35 °C fue la temperatura proporcionada por el tubo colector).

Debido a que el semen caprino posee un intenso movimiento progresivo que da la apariencia de hervir, fue fácil apreciarla en el tubo colector. Para observarlo a través del microscopio, fue necesario calentar láminas y laminillas a --

35 °C utilizando una platina calentadora.

Para observar la existencia de oleadas, movimientos de flujo y reflujo, provocados por la reunión y posterior dispersión de los espermatozoides, se utilizaron aumentos de 10X y 40X.

La existencia de estas ondas se consideró como indicio de buena vitalidad y concentración de espermatozoides.

La calificación del semen con respecto a su motilidad fue hecha en base a la siguiente escala, que depende del modelo de ondas que esté presente.

Cuadro 2. Escala de valores para medir motilidad espermática.

Células móviles, (%)	Valor descriptivo	Valor numérico	Aspecto del modelo de ondas
90-95	Excelente	5	Ondas y remolinos extremadamente rápidos.
85-90	Muy bueno	4	Ondas rápidas y remolinos.
75-85	Bueno	3	Ondas vigorosas y remolinos de lento desplazamiento.
+ 50	Regular	2	Movimiento vigoroso rápido - sin ondas ni remolinos.
- 50	Pobre	1	Movimiento en su mayor parte débil y oscilatorio.
0- 10	Malo	0	Ninguna motilidad discernible.

3.3.4.6. Determinación de la concentración de espermatozoides por eyaculado.

La concentración indica el número de espermatozoides por unidad de volumen. La determinación exacta del número de espermatozoides por mm^3 de semen es importante; esta es una característica del semen altamente variable. En las recolecciones efectuadas se obtuvo un número de 4-5 millones de espermatozoides por mm^3 . Cuando se combina con el volumen del eyaculado, esta cantidad de espermatozoides determina el número de dosis que se pueden preparar, cada una con el óptimo de células espermáticas; que en el caso de las cabras es recomendable usar de 75 a 125 millones de espermatozoides por dosis (0.5 ml), de semen diluido.

Para realizar el recuento de espermatozoides, se utilizó una pipeta de Tome, la cual se llenó con semen no diluido hasta la marca de 0.5 y se absorbió solución de Drabkings hasta la marca de 101 de la pipeta; este líquido diluyó el semen y mató los espermatozoides. Se agitó la mezcla en forma enérgica durante tres minutos, evitando derramar su contenido; se desecharon tres gotas y luego se colocó una gota en la cámara cuentaglóbulos de Neubauer.

Se contaron, en forma diagonal, los espermatozoides en 5 cuadros grandes, subdivididos en 16 cuadros pequeños, haciendo un total de 80 divisiones. La suma de los espermatozoides contados en los cinco cuadros grandes multiplicado por -



10,000, dió la cifra total de espermatozoides por mm^3 de semen. (Figura 7 y 8).

3.3.4.7. Determinación de espermatozoides vivos, muertos y anomalías

Para realizar esta determinación, se hizo uso de una tinción diferencial entre células vivas y muertas, utilizando el colorante azul de bromofenol, el cual penetra y tiñe las células espermáticas muertas mientras que las células viables son impermeables a este colorante. Se procedió colocando una gota pequeña de semen en un porta objeto tibio, luego se añadió una gota de 5 a 10 veces más grande de la mezcla colorante y se mezcló con una laminilla, la cual se frota en una segunda lámina. La mezcla se dejó de 2 a 5 segundos, secándose en forma espontánea. al examinar el frotis al microscopio, se contó por lo menos 100 células teñidas y no teñidas, determinando el porcentaje de cada grupo. Para su aceptación el semen no debe de tener más del 20% de células muertas.

Para la determinación de anomalías se utilizó la tinción diferencial descrita en el párrafo anterior, que tiñe el medio lo cual facilita la determinación visual de las anomalías, que para el caso de los caprinos no presentó malformaciones mayores de un 5 a un 10%.

3.3.5. Dilución

Después de realizar los exámenes macroscópicos y microscópicos del semen y cumpliendo los requerimientos de células vivas igual o superior al 80% y anomalías de 5-10%, se procedió al siguiente paso. Dilución, con la que se pretende ampliar el semen a un volumen muchas veces mayor al de la cantidad original, pero manteniendo una concentración de 75-125 millones de espermatozoides en 0.5 ml. Concentración suficiente para inseminar una cabra. La relación de dilución utilizada fue de 1:16.

El semen examinado se diluyó en la solución A calentada en baño de María a una temperatura de 35 °C. -- El volumen que se tomó de la solución A, fue de 8 ml que fueron medidos con una pipeta volumétrica, depositándolos en el tubo colector del semen, luego se decantó el contenido del tubo a un Erlenmeyer de 25 ml colocando éste en una bandeja con agua y hielo, la que se colocó en refrigeración, reduciéndose la temperatura a 4 °C, aquí permaneció durante dos horas; transcurrido este tiempo, la bandeja así como el diluyente B, se trasladaron al cuarto frío que tiene una temperatura de 4 °C, en donde se añadieron 8 ml de la solución B al Erlenmeyer mezclando en forma lenta y continua; se dejó reposar por unos minutos, en este tiempo se prepararon las pajillas para el proceso de envasado.

3.3.6. Envasado

Para el envasado del semen congelado, se utilizaron pajillas plásticas de 0.5 ml, éstas fueron etiquetadas por medio de una máquina impresora a la que se le colocó el sello que correspondía a la identidad de cada animal.

Etiquetadas las pajillas se pasaron al cuarto frío dejando pasar tres minutos para que las pajillas tomaran la temperatura del cuarto frío. En forma simultánea se preparó la máquina llenadora con material estéril, se colocó: el recipiente cónico, conductos de hule con pajillas desechables y aguja inyectora. Las pajillas se colocaron en una prensa porta pajillas, que se adaptó a la máquina llenadora y selladora, se colocó el cono con la dilución en la base respectiva, se conectó la máquina y empezó el llenado y sellado en forma automática. Las pajillas se llenaron succionando al vacío el semen y fueron selladas en un extremo con un polvo de polivinilo y en el otro se sellan de manera hermética en forma automática.

Finalizado este proceso, se trasladaron las pajillas de la prensa al bastidor porta pajillas, donde permanecieron durante dos horas en el cuarto frío para que el contenido de la pajilla se estabilizara, de modo que los espermatozoides estén protegidos antes de congelarlos en nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C .

3.3.7. Congelación del semen caprino

Una vez envasado y estabilizado el semen dentro de las pajillas, se procedió al congelamiento en nitrógeno líquido de la manera siguiente :

- Se retiró la cubierta del tanque, y se verificó que tuviera el nivel de nitrógeno líquido correcto, esto se hizo con una regla graduada en pulgadas.
- El nivel mínimo del nitrógeno líquido debe ser de 12".
- En caso de no tener este nivel, se debe agregar nitrógeno líquido, para ello debe colocarse la parrilla protectora sobre los canastos rectangulares, para evitar que al verter el nitrógeno, rebalsen los vasos y floten las pajillas.
- Para congelar mediante el vapor del nitrógeno líquido, se colocó sobre la parrilla, el bastidor porta pajillas con las dosis y unos vasos plásticos, cerrándose el tanque por 10 minutos, lo que permitió que los vapores envolvieran por completo las pajillas, produciéndose un congelamiento uniforme.
- Transcurridos los 10 minutos, se abrió el tanque, se pasaron las pajillas del bastidor a los vasos plásticos, sumergiendo éstos en el nitrógeno líquido. Este manipuleo se realizó dentro del tanque.
- Pasadas 24 horas, se procedió a evaluar el porcentaje de viabilidad post-descongelamiento mediante dos pruebas.

3.3.8. Evaluación del porcentaje de viabilidad del semen post-descongelamiento

La evaluación del porcentaje de viabilidad post-descongelamiento, se realizó mediante dos pruebas : Descongelamiento a temperatura de 38 °C y descongelamiento en agua potable a temperatura del medio ambiente (prueba ácida).

3.3.8.1. Descongelamiento a temperatura de 38 °C

El procedimiento realizado para las doce repeticiones fué el siguiente: Se abrió el tanque de nitrógeno y por medio de una pinza, se retiró cada pajilla de los depósitos que las -- contenían, introduciéndolas de forma inmediata en un termo que contenía agua temperada a 38 °C durante tres minutos, transcurridos los tres minutos, se sacó la pajilla del termo, secándose con un Kleenex; se agitó para homogenizar la concentración de espermatozoides dentro de la pajilla, luego se cortó por el extremo cerrado en forma hermética para liberar su contenido del -- cual se depositaron dos gotas en un porta objeto, una a cada extremo de él y se cubrieron con laminillas previamente calentadas a 35 °C.

El porta objeto se observó al microscopio con un aumento de 40X, la evaluación se hizo en forma estimada, según la escala de motilidad (Cuadro 2).

Para esta prueba, se exige un nivel mínimo de viabilidad - de 50%, el material espermático que no alcance este porcentaje se descarta.

3.3.8.2. Prueba ácida

Procedimiento : Se abrió el tanque de nitrógeno y se reti raron las pajillas de sus depósitos con la ayuda de una pinza, las pajillas se introdujeron en depósitos que contenían - agua potable a temperatura del medio ambiente; en donde perma necieron durante seis horas.

Transcurrido este tiempo, se secó la pajilla con un Kleene x, se agitó y se cortó por el extremo sellado de manera hermética se depositaron dos gotas de semen en una lámina porta obje to, una en cada extremo, cubriendo cada una con una laminilla temperada a 35 °C, procediéndose a su evaluación microscópica con un aumento de 40X en forma estimada según la escala de motilidad (Cuadro 2).

Las muestras que presentan porcentajes de viabilidad menores del 30% se descartan.

Esta prueba se realizó para garantizar que el material esper mático tenga buena viabilidad después de un período de seis horas, tiempo suficiente para transportar el material espermático al lugar donde se realizará la inseminación.^{1/}

1/ BELTRAN, M. 1992. Técnico de la Unidad de Inseminación - Artificial del Centro de Desarrollo Ganadero. (Comunica ción personal).

3.3.8.3. Unidades experimentales

Se utilizaron para el ensayo, tres cabros de raza criolla, todos de diferente edad y tamaño, pero con características fenotípicas deseables, además de capacidad reproductora comprobada por haber servido ya como sementales (monta libre) dando excelentes crías.

El manejo en cuanto a la alimentación y sanidad, fué similar, variando sólo en la cantidad de alimento por el peso del animal.

A los cabros se les entrenó a que montaran la cabra usada como señuelo sin llevar a cabo la cópula dentro de ella sino que dentro de la vagina artificial. Debido a que tenían diferente edad, fué más fácil entrenar al cabro más joven que a los de mayor edad. Una vez entrenados se procedió a recolectar el material espermático.

3.4. Metodología estadística

3.4.1. Factores en estudio

- La viabilidad del semen caprino post-descongelamiento, tanto en la prueba a 38 °C como en la ácida.
- La mejor edad de los sementales para obtener semen de óptima calidad.

3.4.2. Diseño estadístico

Se utilizó el diseño estadístico de parcelas divididas completamente al azar, formado por cinco tratamientos (parcela principal) con tres cabros (sub-parcela) y doce repeticiones.

Su modelo matemático es :

$$Y_{ijk} = M + R_i + P_j + (R \times P)_{ij} + S_k + (P \times S)_{jk} + (R \times S)_{ik} + (R \times P \times S)_{ijk}$$

Donde : Y_{ijk} = Cualquier observación de la unidad experimental.

M = Promedio sobre el cual está girando cualquier valor del experimento.

R_i = Efecto de la i -ésima repetición.

P_j = Efecto de la j -ésima parcela principal

$(R \times P)_{ij}$ = Error (a) entre parcelas principales

S_k = Efecto de la k -ésima sub-parcela.

$(P \times S)_{jk}$ = Efecto de la interacción de la parcela principal " j " x subparcela " k "

$(R \times S)_{ik} + (R \times P \times S)_{ijk}$ = Error (b) entre sub-parcelas.

3.4.3. Distribución de los tratamientos

Se distribuyeron los tratamientos en forma completamente al azar, donde los tratamientos (gran parcela) fueron evaluados con el material espermático de los tres cabros, de cada animal se analizaron 12 pajillas de material espermático congelado.

DISTRIBUCION DE LOS TRATAMIENTOS

T_3
Repeticiones

C ₁
C ₂
C ₃

T_1
Repeticiones

C ₁
C ₂
C ₃

- C₁ = Cabro 1
- C₂ = Cabro 2
- C₃ = Cabro 3

T_4
Repeticiones

C ₁
C ₂
C ₃

- T₀ = Tratamiento testigo
- T₁ = Tratamiento 1
- T₂ = Tratamiento 2
- T₃ = Tratamiento 3
- T₄ = Tratamiento 4

T_2
Repeticiones

C ₁
C ₂
C ₃

T_0
Repeticiones

C ₁
C ₂
C ₃

4. RESULTADOS

4.1. Análisis de viabilidad del material espermático

Los resultados de viabilidad obtenidos en el período experimental se muestran en los Cuadros 1 y 2 de Anexos. Los valores de viabilidad post-descongelamiento se obtuvieron en base a porcentajes, los cuales presentaron una distribución binomial en vez de una distribución normal, por lo que se hizo necesario realizar una transformación por medio del Arccoseno.

Esta transformación consistió en hallar para cada dato del experimento el seno del arco \sqrt{x} ó el seno $^{-1}/\sqrt{x}$ (14).

La toma de datos de viabilidad post-descongelamiento, para ambas pruebas se realizó en forma semanal, en un período de tres meses para cada uno de los tratamientos en estudio, se empleó como testigo un diluyente para la congelación de semen bovino.

A los resultados ya transformados (Cuadros 3 y 4), se les realizó un análisis de varianza y prueba de Duncan, para determinar la viabilidad del esperma post-descongelamiento en cada uno de los tratamientos en ambas pruebas.

El análisis no mostró diferencia significativa entre repeticiones pero sí entre tratamientos y edades de los animales, esto indica que la significación en los resultados se debió a

la acción de los tratamientos y al desarrollo fisiológico de los animales.

El comportamiento del tratamiento T_2 en la prueba de des^u congelamiento a temperatura de 38 °C, fue altamente significativo en comparación con el resto de tratamientos, seguido por los tratamientos T_4 y T_0 que presentaron igual significan^u cia entre sí y de último los tratamientos T_3 y T_1 (Cuadros - A-5 y A-7).

En los tratamientos sometidos a prueba ácida, se tuvo los siguientes resultados: el tratamiento T_2 presentó alta signifi^u ficancia en comparación con el resto de los tratamientos, se^u guido por los tratamientos T_0 y T_4 que presentaron igual sig^u nificancia entre sí y en último los tratamientos T_3 y T_1 (Cua^u dros A-8 y A-9).

Los tratamientos evaluados con la prueba ácida reportaron una diferencia significativa para el semen del cabro de cua^u tro años, sobre el semen del cabro de dos años y el de ocho meses, excepto en el tratamiento T_2 , donde fue superado por el semen del cabro de dos años cuya diferencia no fue signifi^u cativa (Cuadros A-8 y A-10).

4.2. Análisis de costos

Los costos por litro de cada tratamiento, son los si^u guientes: $T_0 = \text{¢ } 49.16/\text{litro}$, $T_1 = \text{¢ } 46.95/\text{litro}$, $T_2 = \text{¢ } 52.5$ /litro, $T_3 = \text{¢ } 52.75/\text{litro}$; y $T_4 = \text{¢ } 58.35/\text{litro}$.

El análisis de costos (Cuadro A-11), demuestra que de los diluyentes evaluados para la conservación del material espermático a baja temperatura, el tratamiento T_2 que dió los mayores valores de viabilidad tuvo mayor costo que el tratamiento testigo en ¢ 3.34 y mayor que T_1 en ¢ 5.55, con un costo similar al tratamiento T_3 .

En cuanto al tratamiento T_4 , éste resultó ser el de mayor costo en comparación con el tratamiento testigo en ¢ 9.19 ; pero presentó niveles altos de viabilidad.

5. DISCUSION DE RESULTADOS

En la prueba de descongelamiento a temperatura de 38 °C, el tratamiento T₂ resultó ser el mejor para mantener la viabilidad del semen, éste en su composición contiene el nivel más alto de glicerina 8% (anticongelante), al igual que los tratamientos T₃ y T₄ y el porcentaje de yema de huevo 20% - (crioprotector) igual que los tratamientos T₀ y T₁, cuyos niveles de glicerina y yema de huevo parecen ser la mejor combinación.

El semen del cabro de cuatro años de edad mostró mayor viabilidad en la prueba de descongelamiento a temperatura de 38 °C con un 67.21% (porcentaje transformado) de viabilidad, también presentó alta viabilidad en la prueba ácida 60%, superado por el semen proveniente del cabro de dos años en un 4.25 %.

El semen de cabro proveniente de animales menores de cuatro años, presentó una menor viabilidad post-descongelamiento en ambas pruebas, excepto en el tratamiento T₃ de la prueba a 38 °C (cuya variación se debe probablemente a la adición de glucosa que favorece el metabolismo del semen de animales jóvenes).

En la prueba post-descongelamiento en agua a temperatura ambiente (prueba ácida), el tratamiento T₂, superó en viabilidad al resto de los tratamientos, combinado con el semen de -

animales iguales o mayores de dos años. Pero dió un porcentaje inferior para semen de animales menores de un año.

Para garantizar la calidad del material espermático, éste debe pasar ambas pruebas. La evaluación para la aceptación del semen congelado, debe tener un mínimo del 50% de viabilidad para la prueba de descongelamiento a temperatura de 38 °C y de 30% para la prueba ácida.

El material espermático de todos los animales en los tratamientos T_0 , T_2 y T_4 , pasaron ambas pruebas, en cambio en los tratamientos T_1 y T_3 , el material espermático presentó una conducta heterogénea, sin alcanzar los niveles mínimos de aceptación requeridos en las pruebas por algunas edades, por lo que no se puede afirmar que los tratamientos pasaron el nivel mínimo de aceptación.

6. CONCLUSIONES

- De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede garantizar, que el material espermático de cabro, puede conservarse en nitrógeno líquido.
- Los mayores porcentajes obtenidos de viabilidad espermática, se lograron con el tratamiento que contenía los niveles óptimos de glicerina (8%) y de yema de huevo (20%).
- Al analizar los resultados por medio de la prueba de Duncan, se determinó que el semen proveniente del cabro de cuatro años de edad, alcanzó los mayores niveles de viabilidad en todos los tratamientos, contrario a lo investigado en el Manual de Cría de Ovinos y Caprinos (8).
- El semen proveniente del reproductor caprino de dos años de edad, no dió resultados satisfactorios de viabilidad post-descongelamiento al ser congelado en nitrógeno líquido.

7. RECOMENDACIONES

- La recolección del material espermático, deberá hacerse en una forma adecuada utilizando material estéril, con el propósito de que el eyaculado esté libre de contaminantes, y así ofrecer un producto de buena calidad.
- Para congelar material espermático de caprinos, debe utilizarse el tratamiento que contiene los siguientes reactivos: Citrato de sodio 32,2 gr, glicerina 80ml, yema de huevo 200 ml, penicilina 1.6 gr, Dihidroestreptomicina 1.6 gr, agua destilada C.S.P. 1000 ml.
- Los sementales caprinos que no presten servicio para monta natural, deberán mantenerse estabulados con un buen control sanitario, y aislados de las cabras para evitar desgastes físicos por masturbación.
- Habrá de evaluarse otras edades de sementales caprinos para utilizarlos en inseminación artificial, a fin de determinar cuál es la edad más eficiente para mantener la supervivencia de los espermatozoides.
- Se recomienda al Centro de Desarrollo Ganadero, llevar a cabo la conservación, venta y distribución del semen caprino en nitrógeno líquido utilizando el tratamiento T₂, por mantener altos porcentajes de viabilidad post-descongelamiento a bajo costo por pajilla, lo cual contribuiría al desarrollo y mejoramiento genético de los caprinos en El Salvador.

8. BIBLIOGRAFIA

1. ABRAHAM, A.G. 1984. Caprinotecnia I. 2 ed. México, D.F. Limusa. P. 721.
2. AGRICULTURA EN EL SALVADOR. 1991. Vol. 18 No. 1. Julio-septiembre. P. 22-23.
3. AMERICAN BREEDERS SERVICE. 1972. Manual para técnicos inseminadores. Inseminación artificial. Ej. 2. P. C5: P1-P5.
4. ANIMALES MENORES para granjas pequeñas. Algunas prácticas básicas de zootecnia de carpinos. Santiago, Chile. P. 7.
5. BATTAGLIA, R.A. 1989. Técnicas de manejo para ganado y aves de corral. Trad. Ramón Elizando Mata. 2 ed. México. Limusa. P. 441-494.
6. BENZA, J.C. 1970. Métodos estadísticos para la investigación. 3 ed. Lima, Perú. Jurídica, S.A. P. 280.
7. COFFIN, D.L. 1966. Laboratorio clínico en medicina veterinaria. Trad. José Santiváñez. 3 ed. México. Impresiones moderno. P. 291-299, 149-155.
8. CRIA DE ovinos y caprinos. 1979. Roma. P. 43.
9. DERIVAUX, J. 1967. Fisiopatología de la reproducción e inseminación artificial de los animales domésticos. Trad. José Gómez Piquer. Zaragoza, España. Acribia. P. 311, 313-355.

10. _____. 1976. Reproducción de los animales domésticos. Trad. José Gómez Piquer. Zaragoza, España, - Acribia. P. 195, 202-211.
11. DICCIONARIO GEOGRAFICO de El Salvador. 1986. Ministerio de Obras Públicas, Instituto Geográfico Nacional Pablo Arnoldo Guzmán. Tomo II. L-2. P. 1359-1360.
12. FRANDSON, R.D. 1984. Anatomía y fisiología de los animales domésticos. Trad. Vicent Agut Armer. 3 ed. México, D.F. Interamericana. P.
13. HAFEZ, E.S.E. 1985. Reproducción e inseminación artificial en animales. Trad. Flor de María Berenger. México, D.F. Interamericana. P. 497-519.
14. LITTLE, T.M. 1976. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Trad. Anatolio de Paula Crespo. 2 ed. México. Trillas. P. 139-140.
15. LOOSLI, J.K. 1978. El papel que desempeñan las cabras en reunir suplementos alimenticios para el mundo. - Trad. Carlos A. Zometa. Florida, E.U. IFAS. P. 49-56.
16. NUILA DE MEJIA, J.A. 1990. Manual de diseños experimentales con aplicación a la agricultura y ganadería. P. 225.
17. MAYEN, M.J. 1989. Explotación caprina. México, D.F. - México, Trillas. P. 76-81.

18. ORELLANA, S.C.; FRASER, L.B. 1989. Curso de reproducción e inseminación artificial en caprinos. Valdivia, Chile. FAO. Vol. 1. P. 110.
19. PRODUCCION Y Sanidad Animal. 1982. Enfermedades transmitidas por semen y embriones. Roma. FAO. Tomo 23. P. 1-10.
20. RILLO, M.S. 1992. Curso superior de reproducción animal. Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza. -- P. 6-15.
21. SORENSEN, A.M. 1982. Reproducción animal principios y prácticas. Trad. Ramón Elizondo Mata. México, D.F. Ingramex. P. 125-150, 163-183.
22. STEPHEN, J.R. 1979. Obstetricia veterinaria y patología de la reproducción. Trad. Eduardo Prieto. Buenos Aires, Argentina. Hemisferio Sur, S.A. P. 817-833.
23. TECNOLOGIA DE la Producción Caprina. 1987. Santiago Chile. FAO. P. 132-141, 146-157.
24. VATTI, G. 1969. Ginecología y obstetricia veterinaria. Trad. Raúl J. Blaiston. México. UTLA. P.
24. VELEZ, N.M. 1986. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Honduras. P. 101-104.
25. ZENJANIS, R. 1973. Reproducción animal. México, D.F. México. Limusa. P. 158-212.

9. A N E X O S

Cuadro A-1. Datos de resultados en porcentajes de viabilidad para la prueba de des- congelamiento a temperatura de 38 °C.

Diluyen- te	% de via- bilidad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Promedio
T ₀	Repetic. Cabro 1	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70.00
	Cabro 2	70	70	70	50	50	70	70	70	70	70	70	70	66.66
	Cabro 3	65	70	70	65	70	70	70	70	65	70	70	70	68.75
T ₁	Repetic. Cabro 1	50	50	60	60	50	50	60	60	50	50	60	60	55.00
	Cabro 2	10	10	60	60	40	40	40	40	50	50	40	40	36.66
	Cabro 3	50	50	30	30	30	30	40	40	40	40	30	30	36.66
T ₂	Repetic. Cabro 1	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85.00
	Cabro 2	70	70	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	78.33
	Cabro 3	80	80	80	80	80	80	80	80	70	70	70	70	76.66
T ₃	Repetic. Cabro 1	50	50	30	30	30	30	60	60	50	50	50	50	45.00
	Cabro 2	40	40	40	40	40	40	60	60	50	50	50	50	46.66
	Cabro 3	50	50	50	50	50	50	70	70	70	70	60	60	58.33
T ₄	Repetic. Cabro 1	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70.00
	Cabro 2	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70.00
	Cabro 3	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70.00

Cabro 1 : 4 años de edad
 Cabro 2 : 2 años de edad
 Cabro 3 : 8 meses de edad

Cuadro A-2. Datos de resultados en porcentaje de viabilidad para la prueba ácida.

Diluyen te	% de via bilidad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Promedio
T ₀	Repetic. Cabro 1	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65.00
	Cabro 2	45	65	65	55	65	65	65	65	65	75	55	55	61.66
	Cabro 3	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35.00
T ₁	Repetic. Cabro 1	65	65	45	45	45	45	45	45	55	55	45	45	51.66
	Cabro 2	45	45	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	36.66
	Cabro 3	15	15	5	5	5	5	25	25	25	25	15	15	15.00
T ₂	Repetic. Cabro 1	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75.00
	Cabro 2	75	75	85	85	85	85	85	85	85	85	75	75	80.83
	Cabro 3	45	45	45	65	45	45	45	65	65	65	65	65	55.00
T ₃	Repetic. Cabro 1	35	35	35	35	45	45	45	45	55	65	45	45	44.16
	Cabro 2	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	55	55	38.33
	Cabro 3	35	35	35	35	55	55	35	35	45	45	55	45	42.90
T ₄	Repetic. Cabro 1	65	65	65	65	45	45	65	65	65	65	65	65	61.66
	Cabro 2	35	35	35	35	45	45	35	35	35	35	35	35	36.66
	Cabro 3	35	35	35	35	45	45	55	55	65	65	55	55	48.33

Cabro 1 :: 4 años de edad
 Cabro 2 :: 2 años de edad
 Cabro 3 :: 8 meses de edad.

Cuadro 3 - Transformaciones angulares (arc sen \sqrt{x}) de los porcentajes de viabilidad a temperatura de 38 °C

Diluyente	% de viabilidad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	\bar{X}	
T ₀	Repetición	Cabro 1	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79
		Cabro 2	56.79	56.79	56.79	45.00	45.00	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	54.83
		Cabro 3	53.73	56.79	56.79	53.73	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	53.73	56.79	56.79	55.98
T ₁	Repetición	Cabro 1	45.00	45.00	50.77	50.77	45.00	45.00	50.77	50.77	45.00	45.00	50.77	50.77	43.65
		Cabro 2	18.44	18.44	50.77	50.77	39.23	39.23	39.23	39.23	45.00	45.00	39.23	39.23	38.65
		Cabro 3	45.00	45.00	33.21	33.21	33.21	33.21	39.23	39.23	39.23	39.23	33.21	33.21	37.18
T ₂	Repetición	Cabro 1	67.21	67.21	67.21	67.21	67.21	67.21	67.21	67.21	67.21	67.21	67.21	67.21	67.21
		Cabro 2	56.79	56.79	63.44	63.44	63.44	63.44	63.44	63.44	63.44	63.44	63.44	63.44	62.33
		Cabro 3	63.44	63.44	63.44	63.44	63.44	63.44	63.44	63.44	56.79	56.79	56.79	56.79	71.79
T ₃	Repetición	Cabro 1	45.00	45.00	33.21	33.21	33.21	33.21	50.77	50.77	45.00	45.00	45.00	45.00	42.03
		Cabro 2	39.23	39.23	39.23	39.23	39.23	39.23	50.77	50.77	45.00	45.00	45.00	45.00	43.07
		Cabro 3	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	56.79	56.79	56.79	56.79	50.77	50.77	49.85
T ₃	Repetición	Cabro 1	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79
		Cabro 2	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79
		Cabro 3	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79	56.79

Cabro 1: 4 años de edad
 Cabro 2: 2 años de edad
 Cabro 3: 8 meses de edad

- 63 -

Cuadro 4 - Transformaciones angulares arc sen \sqrt{x} de los porcentajes de viabilidad para la prueba ácida .

Diluyente	% de viabilidad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	\bar{X}	
T ₀	Repetición	Cabro 1	53.73	53.73	53.73	53.73	53.73	53.73	53.73	53.73	53.73	53.73	53.73	53.73	53.73
		Cabro 2	42.13	53.73	53.73	47.87	53.73	53.73	53.73	53.73	53.73	60.00	47.87	47.87	51.82
		Cabro 3	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27
T ₁	Repetición	Cabro 1	53.73	53.73	42.13	42.13	42.13	42.13	42.13	43.13	47.87	47.87	42.13	42.13	45.10
		Cabro 2	42.13	42.13	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	37.25
		Cabro 3	22.79	22.79	12.92	12.92	12.92	12.92	30.00	30.00	30.00	30.00	22.79	22.79	21.90
T ₂	Repetición	Cabro 1	60.00	60.00	60.00	60.00	60.00	60.00	60.00	60.00	60.00	60.00	60.00	60.00	60.00
		Cabro 2	60.00	60.00	67.21	67.21	67.21	67.21	60.00	67.21	67.41	67.21	60.00	60.00	64.25
		Cabro 3	42.13	42.13	42.13	53.63	42.13	42.13	42.13	53.73	53.73	53.73	53.73	53.73	47.93
T ₃	Repetición	Cabro 1	36.27	36.27	36.27	36.27	42.13	42.13	42.13	42.13	47.87	53.73	42.13	42.13	41.62
		Cabro 2	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	47.87	47.87	38.20
		Cabro 3	36.27	36.27	36.27	36.27	47.87	47.87	36.27	36.27	42.13	42.13	47.87	42.13	40.64
T ₄	Repetición	Cabro 1	53.73	53.73	53.73	53.73	42.13	12.13	53.73	53.73	53.73	53.73	53.73	53.73	51.79
		Cabro 2	36.27	36.27	36.27	36.27	42.13	42.13	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	36.27	37.25
		Cabro 3	36.27	36.27	36.27	36.27	42.13	42.13	47.87	47.87	53.73	53.73	47.87	47.87	44.02

Cabra 1 : 4 años de edad
 Cabra 2 : 2 años de edad
 Cabra 3 : 8 meses de edad

Cuadro A-5. Análisis de varianza (38 °C).

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F. Calc.	F. Tablas	
					5%	1%
Tratamientos	4	12111.22	3027.805	122.68	3.54	3.68
Error	55	1357.45	24.681			
Cabros	2	276.52	138.260	9.04	3.17	5.01
Trat. x Cabro	8	1237.17	154.647	10.11	1.94	2.51
Error	110	1682.65	15.297			

Coefficiente de variación = 7.45%

Cuadro A-6. Rango múltiple de Duncan para los tratamientos (38 °C).

Tratamientos	Orden original	Tratamiento	Orden de calidad
T ₀	55.97 B	T ₂	63.59 A
T ₁	41.24 D	T ₄	56.79 B
T ₂	63.59 A	T ₀	55.97 B
T ₃	45.00 C	T ₃	45.00 C
T ₄	56.79 B	T ₁	41.24 D

Cuadro A-7. Rango múltiple de Duncan para la edad de los cabros (38 °C)

Cabro	Orden original	Cabro	Orden de calidad
1	54.14 A	1	54.14 A
2	51.13 B	3	52.27 AB
3	52.27 AB	2	51.13 B

Cuadro A-8. Análisis de varianza (Prueba ácida).

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F. Calc.	F. Tablas	
					5%	1%
Tratamientos	4	10335.88	2583.971	104.14	2.54	3.68
Error	55	1364.66	24.812			
Cabros	2	4620.55	2310.276	135.18	3.17	5.01
Tratam. x cabro	8	3981.88	497.735	29.12	1.94	2.51
Error	110	1879.97	17.091			

Coefficiente de variación = 9.23%

Cuadro A-9. Rango múltiple de Duncan para los tratamientos (prueba ácida).

Tratamientos	Orden original	Tratamientos	Orden de calidad
T ₀	42.27 B	T ₂	57.38 A
T ₁	34.75 D	T ₀	47.27 B
T ₂	57.38 A	T ₄	44.36 B
T ₃	40.15 C	T ₃	40.15 C
T ₄	44.36 B	T ₁	34.75 D

Cuadro A-10. Rango múltiple de Duncan para la edad de los cabros (prueba ácida).

Cabro	Orden original	Cabro	Orden de calidad
1	50.45 A	1	50.45 A
2	45.74 B	2	45.74 B
3	38.15 C	3	38.15 C

Cuadro A-11. Presupuesto por litro de diluyente.

Diluyente T₀

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad (gr ó ml)</u>	<u>Costo (¢)</u>
Citrato de sodio	32.2 gr	7.73
Glicerina	70.0 ml	23.33
Yema de huevo	200.0 ml	11.20
Penicilina	1.6 gr	1.60
Dihidro estreptomicina	1.6 gr	1.60
Agua destilada	730.0 ml	3.70
TOTAL ¢		49.16/lt.

Diluyente T₁

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad (gr ó ml)</u>	<u>Costo (¢)</u>
Citrato de sodio	23.2 gr	5.52
Glicerina	70.0 ml	23.33
Yema de huevo	200.0 ml	11.20
Penicilina	1.6 gr	1.60
Dihidro estreptomicina	1.6 gr	1.60
Agua destilada	730.0 ml	3.70
TOTAL ¢		46.95/lt.

Diluyente T₂

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad (gr ó ml)</u>	<u>Costo (¢)</u>
Citrato de sodio	32.2 gr	7.73
Glicerina	80.0 ml	26.67
Yema de huevo	200.0 ml	11.20
Penicilina	1.6 gr	1.60
Dihidro estreptomicina	1.6 gr	1.60
Agua destilada	720.0 ml	3.70
TOTAL ¢		52.50/lt

Continuación.... Anexo 11.

Diluyente T₃

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad (gr ó ml)</u>	<u>Costo (¢)</u>
Citrato de sodio	32.2 gr	7.73
Glicerina	80.0 ml	26.67
Yema de huevo	100.0 ml	5.60
Penicilina	1.6 gr	1.60
Dihidro estreptomycin	1.6 gr	1.60
Glucosa	10.0 gr	5.90
Agua destilada	720.0 ml	3.65
	TOTAL ¢	52.75/lt.

Diluyente T₄

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad (gr ó ml)</u>	<u>Costo (¢)</u>
Citrato de sodio	32.2 gr	7.73
Glicerina	80.0 ml	26.67
Yema de huevo	200.0 ml	11.20
Penicilina	1.6 gr	1.60
Dihidro estreptomycin	1.6 gr	1.60
Glucosa	10.0 gr	5.90
Agua destilada	720.0 ml	3.65
	TOTAL ¢	58.35/lt

Anexo 12. PRESUPUESTO. (Gastos de inversión).

EQUIPO	CANTIDAD	COSTO UNITARIO (¢)	COSTO TOTAL (¢)
Balanza analítica *	1	-	-
Agitadores magnéticos *	2	-	-
Microscopios*	1	-	-
Máquina llenadora y selladora de pajillas*	1	-	-
Refrigeradora*	1	-	-
Autoclave*	1	-	-
Tanque de nitrógeno	1	-	-
<u>MATERIALES DE LABORATORIO</u>			
Papel toalla (rollos)	6	7.00	42.00
Balones volumétricos*		-	-
Probeta graduada*		-	-
Láminas y laminillas*		-	-
Papel aluminio (rollos)	3	15.00	45.00
Tirro (rollos)	2	7.00	14.00
Capilares*		-	-
Citrato de sodio (gr)	1000	-	240.00
Glicerina (ml)	450	-	150.00
Penicilina (gr)	100	-	100.00
Dihidroestreptomicina (gr)	100	-	100.00
Agua destilada estéril (Bot.)	5	3.85	19.25
Glucosa (lba)	1	-	150.00
Pajillas plásticas*		-	-
Huevos	72	0.75	54.00
<u>MATERIALES DE CAMPO</u>			
Cabros*	3	-	-
Cabras*	2	-	-

Continuación..... Anexo 12.

	CANTIDAD	Costo Uni tario (¢)	Costo to- tal (¢)
Baldes	3	5.00	15.00
Cepillos	2	5.00	10.00
Cepos*	1	-	-
Vagina artificial*	1	-	-
Concentrado*			
TRANSPORTE	3 personas x ¢ 4.00 x 120 días =		1,440.00
SUB-TOTAL			2,404.25
IMPREVISTOS (10%)			240.42
TOTAL :	¢	2,644.67

* Equipo y materiales proporcionados por la Unidad de Reproducción del Centro de Desarrollo Ganadero.

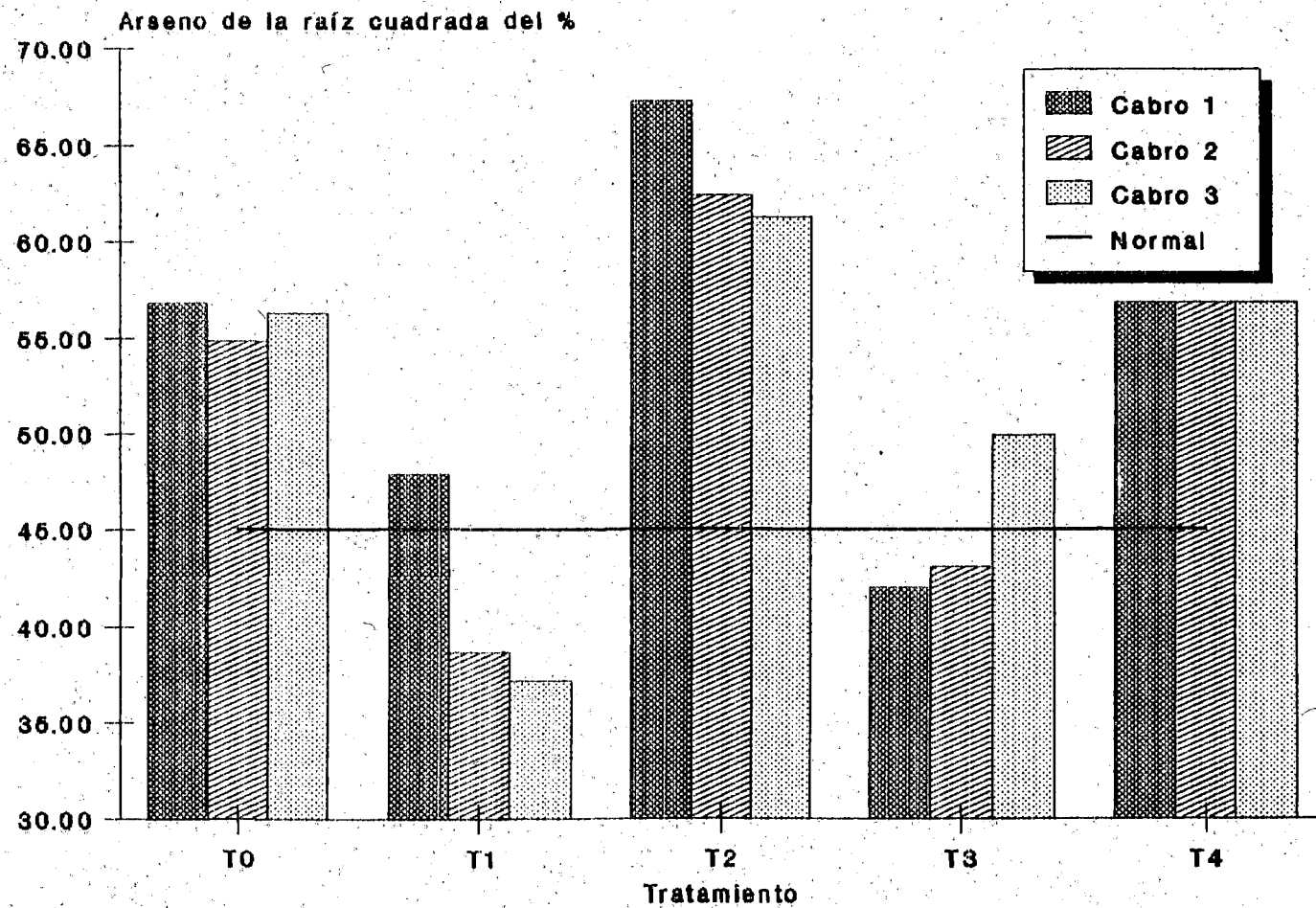


Figura A-1: Efecto de cabo y diluyente de semen congelado sobre la viabilidad (arseno de la raíz cuadrada del %), post-descongelamiento a 38 °C

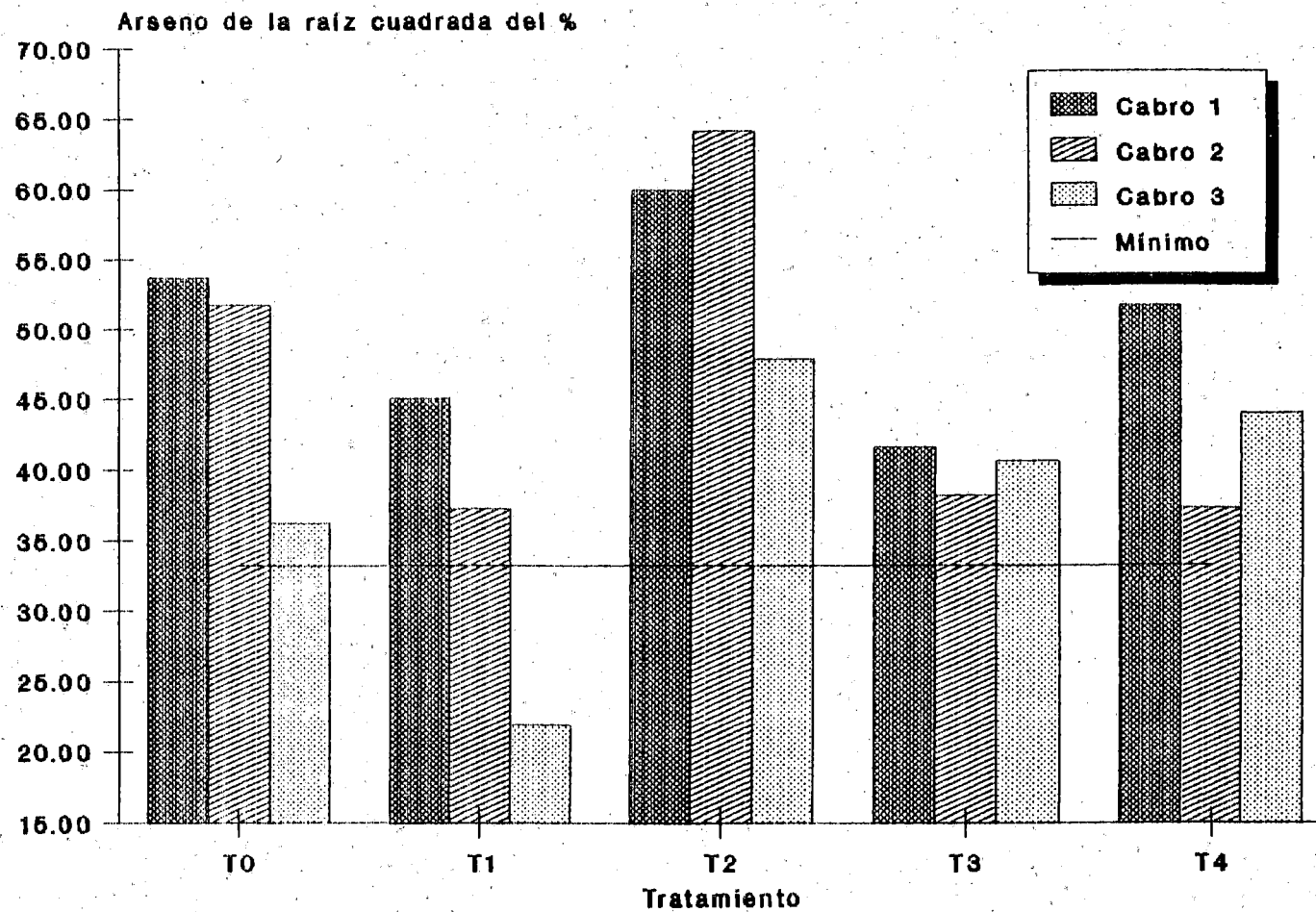


Figura A-2: Efecto de cabro y diluyente de semen congelado sobre la viabilidad (arseno de la raíz cuadrada del %), post-descongelamiento a prueba ácida

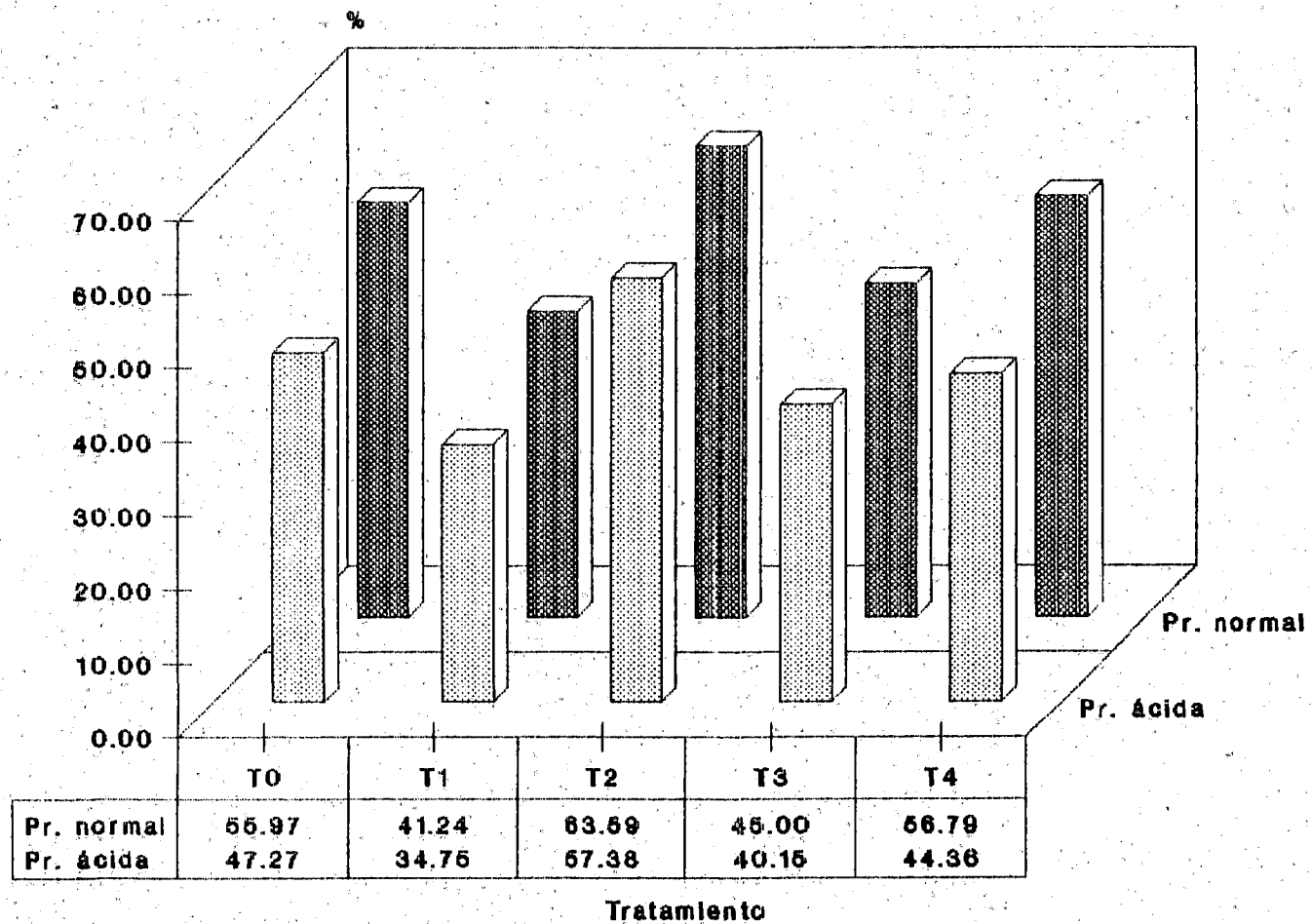


Figura A-3 : Viabilidad post-descongelamiento de semen caprino a 38 °C a prueba ácida

- MÉTODOS DE RECOLECCION DE MATERIAL ESPERMATICO :

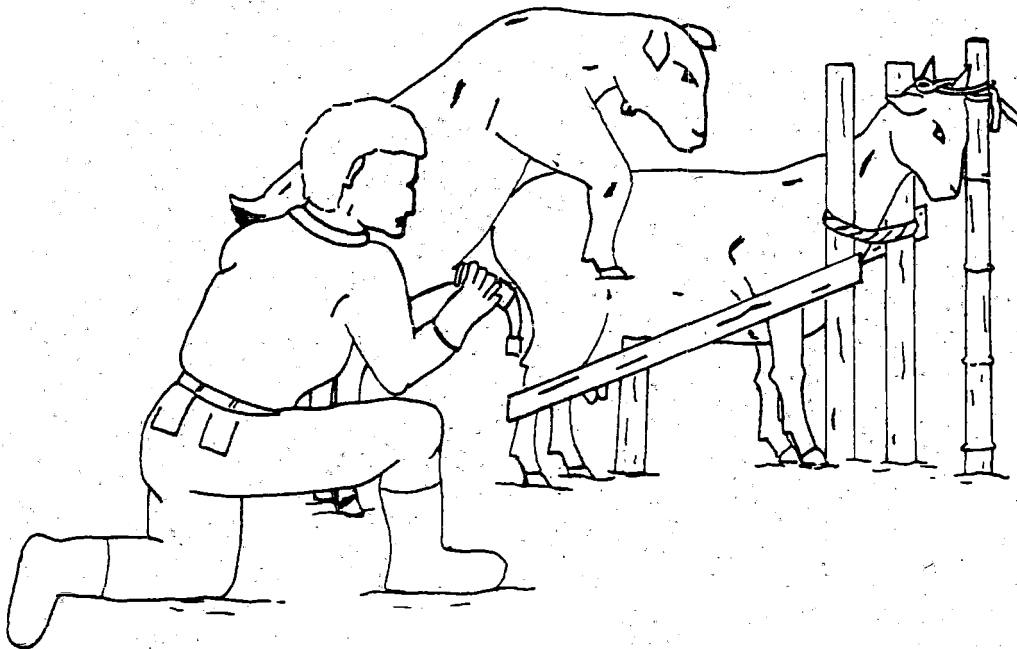


Fig. A-4. Método de la vagina artificial, utilizando como señuelo una cabra.

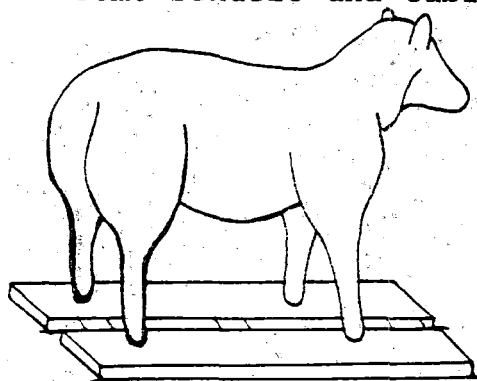


Fig. A-5. Vista lateral de un maniquí portatil, para recolección de semen caprino

COMPONENTES DE LA VAGINA ARTIFICIAL

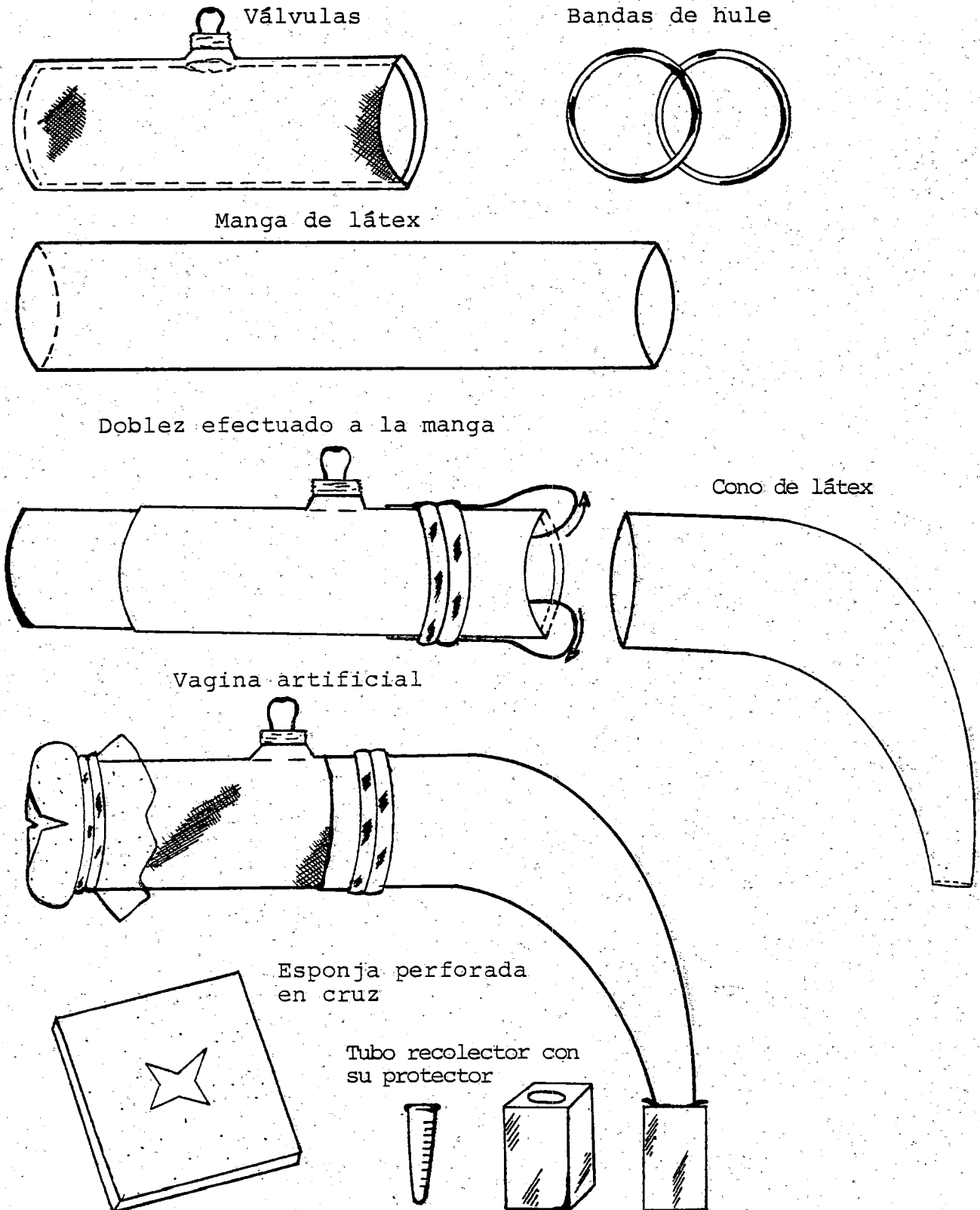


Fig. 6. Vagina artificial y sus componentes.

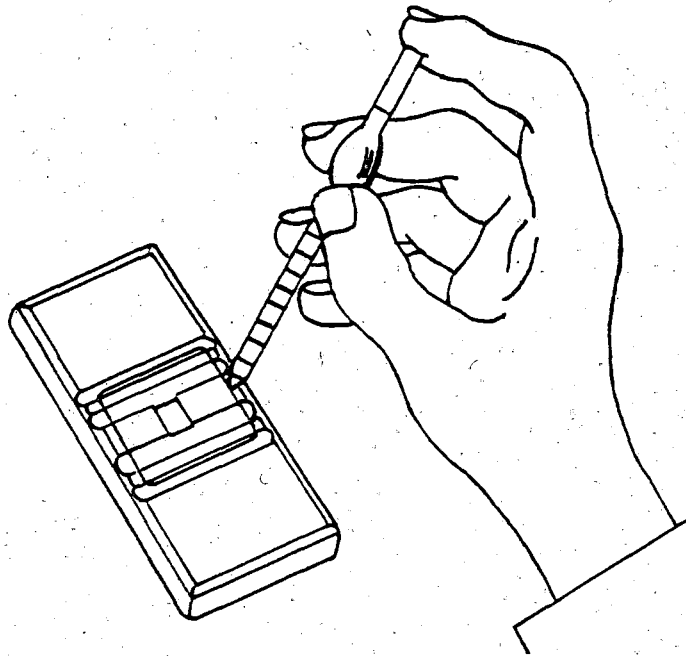
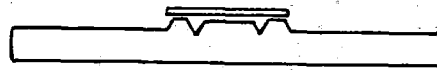


Fig. A-7. Método de llenado de la cámara cuenta glóbulos con la pipeta de tome.



Vista lateral

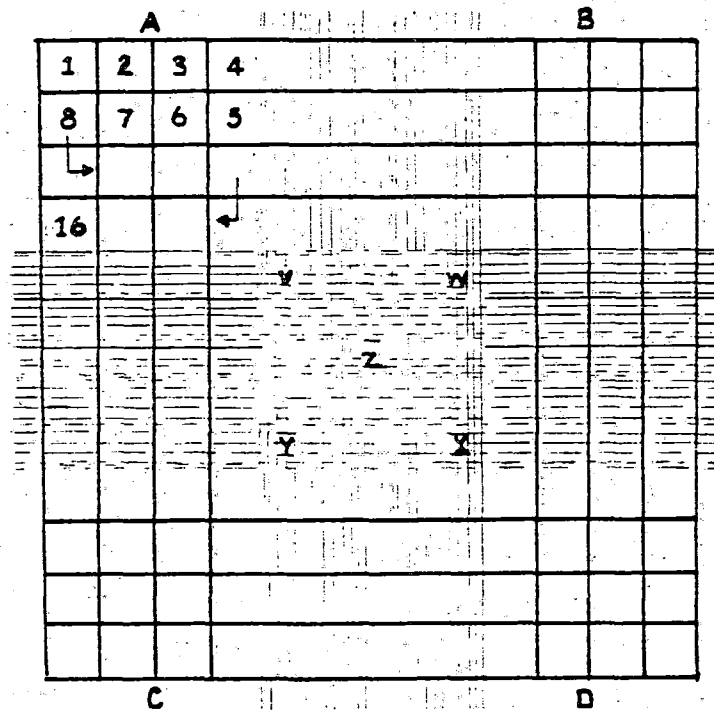


Fig. A-8. Cuadrícula para conteo de eritrocitos de la cámara de Neubauer, empleada para determinar la concentración de espermatozoides,

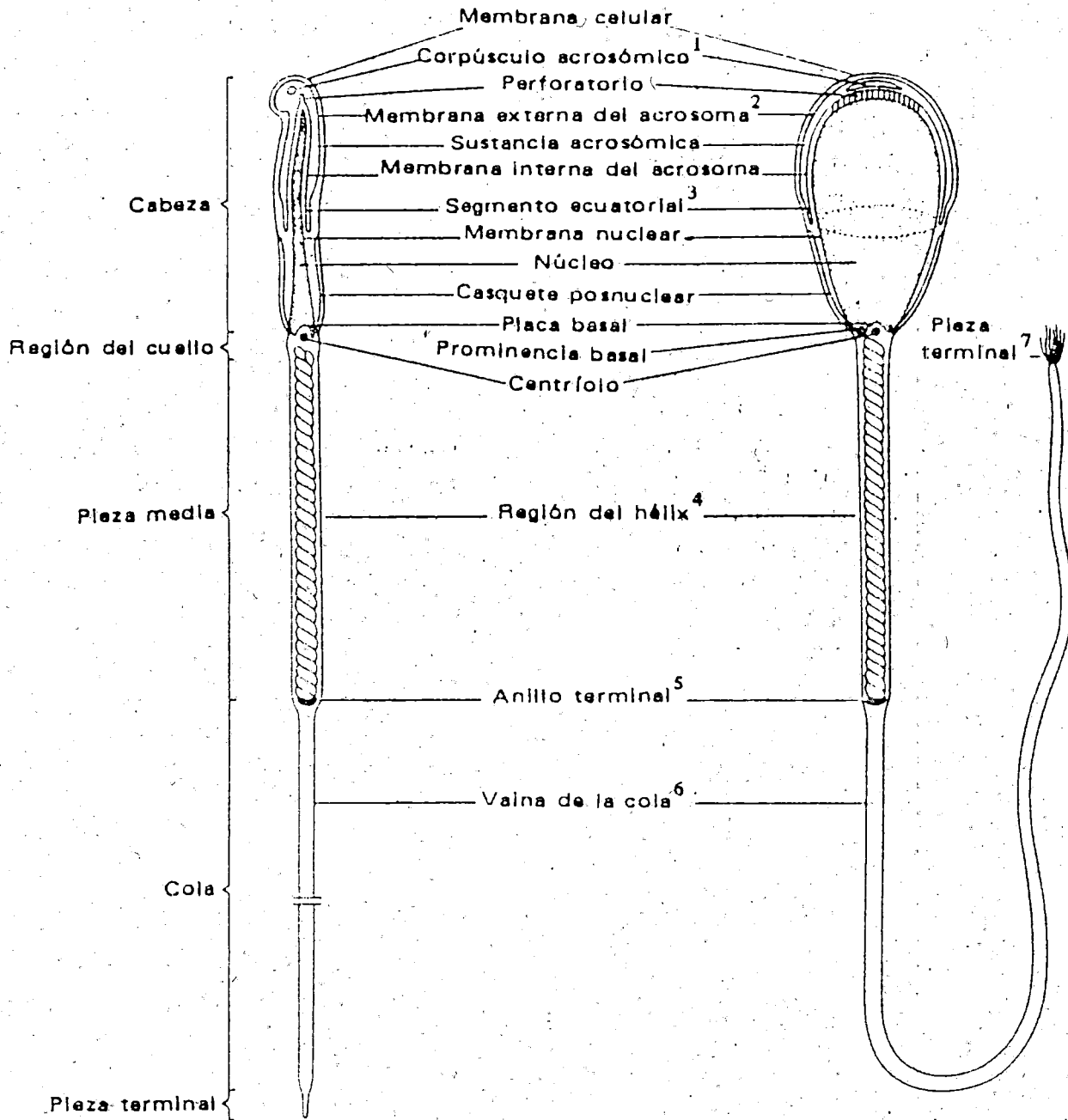


Figura A-9. Diagrama de la ultra estructura del espermatozoide; 1) Vacuola acrosómica o cuerpo apical; 2) Jalea capitis o casco del espermatozoide; zona ecuatorial; 4) Elicoide mitocondrial; 5) anillo de Jensen; 6) Citoplasmático o fibrilar; 7) Filamento terminal.

CENTRO DE DESARROLLO GANADERO
LABORATORIO DE DIAGNOSTICO E INVESTIGACION VETERINARIA


LABORATORIO DE HEMATOLOGIA

Soyapango, 29-1-92
 Fecha de Análisis 29-1-92
 Propietario C.D.G.
 Dirección : Soyapango

Caso P- 55 Exámen solicitado Zemegrana
 Especie : Caprino Raza : Cruce
 Sexo : M y H Edad: Varias
 Médico Veterinario Dr. Jorge Mario Rodríguez

Nº	Identificación	Ht	Hb	Glóbulos Rojos x 10 ⁶ / ml	Total	GLOBULOS BLANCOS / ul				
						Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos	Eosinófilos	Basófilos
1-	NEGRO	36	10.5	14,200,000	10,400	8320	2080	0	0	0
2-	BLANCO	18	6.0	10,150,000	18,800	13160	5452	0	188	0
3-	MUCA	30	9.1	9,550,000	15,000	7800	6900	0	300	0
4-	AMARILLO	27	7.1	8,500,000	16,600	8964	7636	0	0	0
5-	CUERNO	MUESTRA COAGULADA								
				////	////	////	////	////	////	////

Observaciones :
José Antonio Recinos S.
 Técnico Responsable
 Dr. José Antonio Recinos S.


Dr. Orlando Alberto Silva Hernández
 Jefe del Depto. de Laboratorio

