

**Efecto del método de extracción seminal sobre la vitalidad y motilidad espermática postdescongelación en machos cabríos de raza mestiza**

Efect of method extration seminal about the vitality and motility sperm post thaw in bucks mixed race

**Hernández-Corredor L.** <sup>1,3,4✉</sup>, Dorado J. <sup>2</sup>; Hidalgo M. <sup>2</sup>, Rubio-Parada J. <sup>3,4</sup> y Quintero-Moreno A. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Investigación en Producción Animal (UNIPA)/ Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad del Zulia (LUZ) Apdo. 15252, Maracaibo 4005-A. Maracaibo-Venezuela.

<sup>2</sup> Grupo de Reproducción Animal, Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Universidad de Córdoba, 14071, Córdoba-España.

<sup>3</sup> Universidad Francisco de Paula Santander. Avenida Gran Colombia No. 12E-96 Barrio Colsag. Cúcuta-Colombia.

<sup>4</sup> Servicio Nacional de Aprendizaje SENA. CEDRUM, Norte de Santander. Avenida Quinta Barrio Pescadero. Cúcuta-Colombia. Autor para correspondencia: ✉lehernandez@fa.luz.edu.ve; lhernandezc@sena.edu.co

**Recibido: 12/06/2014**

**Aceptado: 25/10/2014**

**RESUMEN**

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de dos métodos extracción seminal, Electroeyaculación (EE) y Vagina Artificial (VA) y de tres diluyentes de congelación de seminal. Un total de 64 eyaculados fueron obtenidos de 4 machos adultos, empleando la EE (8 eyaculados de 4 machos) o VA (8 eyaculados de 4 machos). Todos los eyaculados fueron evaluados, divididos en 3 alícuotas y congelados mediante un protocolo estándar empleando los diluyentes comerciales AndroMed®, Ovixcell® y Triladyl®. Antes y después de la congelación, se evaluaron la vitalidad (mediante Eosina-Nigrosina) y motilidad espermática (mediante análisis espermático asistido por computadora - CASA). Aquellos eyaculados recolectados mediante VA presentaron valores estadísticamente ( $P < 0,05$ ) superiores para la mayoría de parámetros seminales evaluados: vitalidad espermática (Triladyl®  $80,08 \pm 4,25\%$ ); Motilidad (Triladyl®  $63,67 \pm 8,71\%$ ); progresividad (Triladyl®  $23,8 \pm 4,7\%$ ); espermatozoides rápidos (Triladyl®  $34,24 \pm 8,4\%$ ) existiendo diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Para los parámetros de velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad media (VAP), índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (WOB), frecuencia de batido de cabeza (BCF), no existieron diferencias estadísticas ( $P \geq 0,05$ ), solo el parámetro de amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH) presenta diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Concluyendo que el método de extracción seminal VA y el

diluyente a base de huevo como el Triladyl® presentan los mejores resultados en la criopreservación de espermatozoides caprinos.

**Palabras claves:** espermatozoides, electroeyaculador, vagina artificial, diluyentes, CASA.

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of three seminal means freezing in cryopreservation of goat spermatozoa and two seminal extraction Electroejaculation (EE) and Artificial Vagina (VA) and three extender methods were evaluated. The total 64 Ejaculates obtained of 4 bucks, with EE (8 ejaculation of 4 buck) or VA (8 ejaculation of 4 buck). All ejaculates were evaluated, divided into 3 aliquots and frozen using a standard protocol using commercial extenders AndroMed®, Ovixcell® and Triladyl®. Before and after freezing, vitality, sperm motility were evaluated (using eosin Nigrosin) and (using computer-assisted sperm analysis - CASA). Those ejaculates collected by VA values statistically ( $P < 0.05$ ) higher for most seminal parameters evaluated: sperm vitality ( $80.08 \pm 4.25\%$  Triladyl®); Motility ( $63.67 \pm 8.71\%$  Triladyl®); escalation ( $23.8 \pm 4.7\%$  Triladyl®); rapid sperm ( $34.24 \pm 8.4\%$ ) with significant differences ( $P \leq 0.05$ ). For the parameters of curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), average path velocity (VAP), linearity index (LIN), straightness index (STR), oscillation index (WOB), head beat frequency (BCF), there were no statistical differences ( $P \geq 0.05$ ), only the parameter mean amplitude of lateral displacement of the sperm head (ALH) differ significantly ( $P \leq 0.05$ ). Concluding that the method of extraction seminal VA and diluent with egg as Triladyl® presented the best results in goat sperm cryopreservation.

**Keywords:** sperm, electroejaculator, artificial vagina, diluents, CASA.

### INTRODUCCIÓN

La electroeyaculación (EE) es una método alternativo a la colecta seminal en caprino diferente a la vagina artificial (VA). Marco-Jiménez *et al.* (2008) observó las diferencias entre la calidad espermática y la composición seminal entre los dos métodos. Como se conoce desde 1962 por los estudios de Mattner y Voglmayr, los estímulos eléctricos durante la EE estimulan las glándulas accesorias que causan un aumento de volumen, lo que resulta en una mayor cantidad de plasma seminal. Iritani y Nishikawa (1963) encontraron la enzima fosfolipasa, en el plasma seminal

caprino, que cataliza la hidrólisis de los lípidos en la yema de huevo de ácidos grasos y lisofosfolípidos que son tóxicos para los espermatozoides de los caprinos (Sias *et al.*, 2005; Roof *et al.*, 2012; Jiménez-Rabadan *et al.*, 2013). La centrifugación del semen diluido y la posterior eliminación del plasma seminal es habitualmente realizada para mejorar la calidad del semen caprino a la descongelación, especialmente cuando se usan diluyentes que contienen yema de huevo o leche (Purdy, 2006). Sin embargo, no todos los estudios realizados hasta la fecha describen un efecto beneficioso en la centrifugación o lavado del semen y, por tanto, las opiniones difieren con respecto a la necesidad de retirar el plasma

seminal caprino (Azerêdo *et al.*, 2001; Matsas, 2005; Roof *et al.*, 2012; Konyali *et al.*, 2013; Hernández-Corredor *et al.*, 2013).

La evaluación de la motilidad y vitalidad de los espermatozoides es un criterio esencial en la evaluación de la calidad de una muestra de semen antes de su uso para la IA (Salamon y Maxwell, 2000; Dorado *et al.*, 2010). Diferentes autores han encontrado una variabilidad en la respuesta de la motilidad espermática postdescongelación de acuerdo a diferentes factores como: el medio diluyente utilizado, protocolo de dilución y congelación y el procedimiento de evaluación. Tuli y Holtz (1994) en un estudio con semen congelado caprino obtuvieron un 25% de motilidad espermática postdescongelación. Kozdrowski *et al.* (2007) utilizando Tris con la adicción de yema de huevo al 20%, reporto valores de 23%. Dorado *et al.* (2009) reportaron motilidades de 56,07%. Batista *et al.* (2011) obtuvieron valores de motilidad de 10,5%. Mientras que Bispo *et al.* (2011) evaluó Tris-yema al 20% y EDTA glucosa con un 2,5% de yema de huevo obteniendo valores de 58,7 y 61,2%, respectivamente. Naijian *et al.* (2013) encontró valores de 56,60%. Estos estudios previos demuestran que los parámetros cinéticos obtenidos mediante los sistemas CASA son eficaces a la hora de evaluar tanto el efecto del proceso de criopreservación como para comparar diluyentes (Dorado *et al.*, 2009, 2010).

Por lo expuesto, el objetivo del presente estudio fue examinar los parámetros de motilidad y vitalidad espermática de muestras seminales criopreservadas de macho, evaluando el efecto de dos métodos de extracción seminal (EE y VA) y de tres diluyentes de congelación comerciales (AndroMed®, Triladyil® y Ovixcell®).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Animales y colecta de semen:** Se utilizaron 4 machos cabríos adultos mestizos, con edades entre los 15 y 36 meses de edad y de fertilidad conocida. Los animales fueron sometidos a un ritmo de recogidas de dos veces por semana. En total se recolectaron 64 eyaculados (16 eyaculados por macho) durante un periodo experimental de tres meses. Empleando un electroeyaculador (Electroyac 5®, Neogen Corporation, Lexington, KY, USA) durante las primeras 4 semanas del estudio y una vagina artificial (MINITÜB, 11320, Tiefenbach

Alemania) durante otras 4 semanas. Las muestras fueron mantenidas en baño maría a 37 °C hasta su valoración.

**Evaluación y criopreservación de las muestras seminales:** Inmediatamente tras la recogida de semen. Las muestras de espermatozoides fueron evaluadas para el volumen (mL), pH (Método tiras reactivas), motilidad masal (%) e individual (%), la concentración espermática (spz/ml) y la morfología (%).

Tras la evaluación rutinaria, las muestras fueron diluidas 1:1 con el diluyente comercial y centrifugadas a 800 x g durante 3 minutos (Centrifuga Dynac III®, Becton Dickinson, USA). A continuación, se retiró el sobrenadante y el pellet de espermatozoides fue re-diluido con los diluyentes comerciales Triladyil® (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania), Ovixcell® (IMV Technologies, L'Aigle, Francia) o AndroMed® (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania). Una vez diluidas hasta una concentración final aproximada de  $50 \times 10^6$  de espermatozoides/ml, las muestras fueron envasadas en pajuelas de 0,5 ml y refrigeradas a 4°C durante 2 horas. Finalmente, las pajuelas de cada tratamiento fueron congeladas en vapores de nitrógeno líquido, colocándolas a 4 centímetros de la superficie del nitrógeno, durante 5 minutos para

seguidamente sumergirlas en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

**Análisis objetivo del movimiento espermático:** Las muestras congeladas fueron transportadas al Laboratorio de andrología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia (Venezuela) en un tanque de nitrógeno líquido (Taylor-Wharton®, XTL3, 4075 Hamilton Blvd. Theodore, AL 36582), donde se procedió a realizar la valoración de los parámetros cinéticos mediante el sistema de análisis de esperma asistido por ordenador (CASA) Sperm Class Analyzer (SCA® versión 2002, Microptic, Barcelona, España). Se evaluó un total de 2 pajuelas por tratamiento, según la metodología descrita por Grajales *et al.* (2011) para el macho cabrío, previamente elegidas al azar y descongeladas en baño maría a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Las muestras descongeladas y evaluadas a una concentración de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/ml y alícuotas (5  $\mu\text{l}$ ) de semen diluido se depositó en cámaras de un solo uso Leja® (20 micras - 4 cámaras, SC-20-01-04-B, Netherlands). En cada análisis, un total de 5 campos microscópicos fueron aleatoriamente capturados en 2 gotas, empleando un microscopio de contraste de fases negativo (Olympus BX40, Olympus Optical Co., Ltda., Tokio, Japón) a 100 X.

Los parámetros cinéticos calculados fueron: porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo (PRO, %), concentración de espermatozoides progresivos por dosis (spz/ml), velocidad curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidad rectilínea (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidad media (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), índice de linealidad (LIN, promedio entre VSL/VCL, %), índice de rectitud (STR, promedio entre VSL/VAP, %), índice de oscilación (WOB, promedio entre, VAP/VCL, %), amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH,  $\mu\text{m}$ ) y frecuencia de entrecruzamiento (BCF, Hz). Estos parámetros

cinéticos han sido previamente descritos por Mortimer (1997).

**Valoración de la vitalidad espermática:** La segunda fracción se procesó con el fin de evaluar el porcentaje de espermatozoides vivos en cada grupo experimental, empleando la tinción vital Eosina-Nigrosina (EN). Un total de 100 espermatozoides por cada muestra, fueron valuados según la metodología descrita por Madrid-Bury (2003).

**Análisis estadístico:** Los datos fueron expresados en medias ( $\pm\text{EE}$ ). Los tratamientos (tipo de recogida de semen y diluyente) fueron comparados mediante un análisis de factorial. Cuando obtuvimos diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), las medias fueron comparadas mediante la prueba de Duncan. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, versión 9.1, 2002).



## RESULTADOS

**Tabla 1.** Interacción entre el método de obtención seminal y los diluyentes para la característica general de vitalidad y motilidad de las muestras seminales criopreservadas de caprinos.

Método de extracción seminal	Diluyente	Parámetro (%)/ M ± EE				
		Vitalidad	Motilidad	Progresiva	No progresiva	Estáticos
Electroeyaculador	AndroMed®	61,83±9,03 <sup>a</sup>	33,06±9,01 <sup>a</sup>	11,66 ± 4,2 <sub>a</sub>	21,43 ± 4,9 <sub>a</sub>	66,91 ± 9 <sub>b</sub>
	Triladyl®	64,33±6,74 <sup>a</sup>	36,52±8,95 <sup>a</sup>	12,41 ± 4,8 <sub>a</sub>	24,11 ± 4,7 <sub>ab</sub>	63,46 ± 8,9 <sub>b</sub>
	Ovixcell®	45,50±15,04 <sup>b</sup>	19,60±5,59 <sup>b</sup>	5,62 ± 2,1 <sub>b</sub>	14 ± 3,5 <sub>a</sub>	80,40 ± 5,5 <sub>c</sub>
	<b>Total</b>	59,57±5,26 <sub>B</sub>	31,86±5,24 <sub>B</sub>	10,74 ± 2,6 <sub>B</sub>	21,13 ± 2,8 <sub>A</sub>	68,12 ± 5,24 <sub>B</sub>
Vagina Artificial	AndroMed®	66,87±4,11 <sup>b</sup>	36,58±5,37 <sup>b</sup>	11,42 ± 2,3 <sub>b</sub>	25,30 ± 3,4 <sub>ab</sub>	63,03 ± 5,3 <sub>b</sub>
	Triladyl®	80,08±4,25 <sup>a</sup>	63,67±8,71 <sup>a</sup>	23,80 ± 4,7 <sub>a</sub>	39,86 ± 4,5 <sub>b</sub>	36,33 ± 8,7 <sub>a</sub>
	Ovixcell®	66,83±11,64 <sup>b</sup>	48,55±15,55 <sup>ab</sup>	15,96 ± 6,3 <sub>ab</sub>	32,56 ± 9,7 <sub>b</sub>	51,46 ± 15,5 <sub>b</sub>
	<b>Total</b>	72,96±3,62 <sub>A</sub>	51,85±5,88 <sub>A</sub>	18,13 ± 2,8 <sub>A</sub>	33,70 ± 3,3 <sub>B</sub>	48,04 ± 5,87 <sub>A</sub>

(a, b; A, B): Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 2.** Interacción entre el método de obtención seminal y los diluyentes para la característica general de índices de velocidad de las muestras seminales criopreservadas de caprinos.

Método de extracción seminal	Diluyente	Parámetro / M ± EE							
		VCL µm/s	VSL µm/s	VAP µm/s	LIN %	STR %	WOB %	ALH µm/s	BCF Hz
Electro Eyaculador	AndroMed®	76,2 ± 4,4 <sub>a</sub>	38,3 ± 5,5 <sub>a</sub>	51,3 ± 5,1 <sub>a</sub>	49,6 ± 6 <sub>ab</sub>	72,8 ± 5 <sub>a</sub>	66,8 ± 4,7 <sub>a</sub>	3,08 ± 0,2 <sub>a</sub>	8,08 ± 1,3 <sub>a</sub>
	Triladyl®	72 ± 9,6 <sub>a</sub>	29,6 ± 4,7 <sub>a</sub>	44,1 ± 6,6 <sub>a</sub>	40,1 ± 2,9 <sub>b</sub>	65,8 ± 2,9 <sub>a</sub>	60,2 ± 2,4 <sub>a</sub>	2,54 ± 0,2 <sub>ab</sub>	5,83 ± 1,05 <sub>b</sub>
	Ovixcell®	72,1 ± 5,1 <sub>a</sub>	46,7 ± 12,4 <sub>a</sub>	53,9 ± 11 <sub>a</sub>	62,3 ± 14 <sub>a</sub>	80,7 ± 10 <sub>a</sub>	72,8 ± 11 <sub>a</sub>	1,95 ± 0,05 <sub>b</sub>	5,97 ± 1,7 <sub>b</sub>
	<b>Total</b>	73,39 <sub>A</sub>	36,01 <sub>A</sub>	48,49 <sub>A</sub>	47,82 <sub>A</sub>	71,20 <sub>A</sub>	66,2 <sub>A</sub>	2,5 <sub>B</sub>	<b>6,5<sub>A</sub></b>
Vagina Artificial	AndroMed®	79,3 ± 7,2 <sub>a</sub>	42,5 ± 3,92 <sub>a</sub>	54,9 ± 5,6 <sub>a</sub>	54,4 ± 4,1 <sub>a</sub>	77,9 ± 3,6 <sub>a</sub>	69,2 ± 2,8 <sub>a</sub>	2,96 ± 0,2 <sub>a</sub>	8,98 ± 0,8 <sub>a</sub>
	Triladyl®	87,2 ± 3,3 <sub>a</sub>	39,6 ± 2,82 <sub>a</sub>	55,9 ± 3,3 <sub>a</sub>	45 ± 2,1 <sub>ab</sub>	70,4 ± 1,6 <sub>a</sub>	63,6 ± 2 <sub>a</sub>	3,37 ± 0,1 <sub>a</sub>	8,5 ± 0,5 <sub>a</sub>
	Ovixcell®	61,7 ± 7,5 <sub>a</sub>	31,7 ± 5,47 <sub>a</sub>	42,5 ± 6 <sub>a</sub>	48,9 ± 7,1 <sub>ab</sub>	70,7 ± 7,9 <sub>a</sub>	67,3 ± 3,6 <sub>a</sub>	2,46 ± 0,1 <sub>ab</sub>	6,45 ± 1,2 <sub>ab</sub>
	<b>Total</b>	78,93 <sub>A</sub>	38,7 <sub>A</sub>	52,56 <sub>A</sub>	48,81 <sub>A</sub>	72,8 <sub>A</sub>	66,96 <sub>A</sub>	3,03 <sub>A</sub>	8,18 <sub>A</sub>

(a, b; A, B): Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSION

Es el primer trabajo donde se compara el método de extracción seminal y el efecto de tres diluyentes comerciales, en el parámetro de motilidad se puede observar como la colecta espermática con vagina artificial y el medio Triladyl®, superando lo reportado por Hernández-Corredor *et al.* (2013), trabajando con AndroMed® y con extracción por EE, a pesar que el uso de medios diluyentes libres de proteína animal como el AndroMed® o el Ovixcell®, presentan mejor respuesta debido a que su contenido de fosfolípidos son derivados a partir de extracto de soya y no se va afectados los espermatozoides por la fosfolipasas de los medios como el Triladyl® que contienen yema de huevo y este efecto puede ser más marcada en las muestras recogidas por EE. Por lo tanto, las muestras de esperma recogidas por este método podrían requerir diferentes extensores y protocolos de congelación para llevar una criopreservación exitosa. Cuando se trabajó con vagina artificial se demostró que los medios diluyentes con niveles bajos de proteína animal (5% yema de huevo) se comportan mejor que los medios con proteína vegetal. Jiménez-Rabadan *et al.* (2013) obtuvo motilidades espermáticas excelentes trabajando con el diluyente Biladyl® con un 20% de yema de huevo.

En los parámetros de velocidad espermática no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los diluyentes. Según estudios reportan que valores altos para VCL y ALH son indicativos de esperma hiperactivado (Kathiravan *et al.*, 2010). Así mismo, Hernández-Corredor *et al.* (2013) concluye que estos valores en un diluyente con yema de huevo, podría sugerir una tendencia a la hiperactivación de los espermatozoides caprinos postdescongelados; probablemente relacionado por la inclusión de proteínas de origen animal. Afirmación que contrasta con lo

reportado por Januskauskas *et al.* (2003) al evaluar dichos parámetros con semen bovino. Según el estudio de Leite *et al.* (2010) valores altos de VSL en diluyentes con lecitina de soya y ALH en diluyentes con yema de huevo presentan variabilidad en sus valores, debido a las diferencias de densidad y viscosidad de los diluyentes. Afirmación que se corrobora con los valores obtenidos en cada uno de los tratamientos evaluados en nuestro estudio.

Según Bravo *et al.* (2011), el índice de rectitud (STR) define los espermatozoides que son considerados progresivos cuando el valor es superior a 80%. Para nuestro estudio los tres diluyentes presentaron valores muy similares, no existiendo diferencias significativas entre ellos ( $p \geq 0,05$ ).

Solo en el índice LIN mostro diferencia significativas; según el estudio de Cox *et al.* (2006) demostrando que valores mayores a 50% en espermatozoides evaluados *In Vitro* presentan una excelente migración. Sin embargo, para Quintero-Moreno *et al.* (2003) un valor bajo (menor a 50%) para el parámetro LIN está correlacionado a la hiperactivación espermática.

Los mejores valores de motilidad espermática evaluados por el método CASA fueron obtenidos para las muestras de material seminal caprino en el medio diluyente Triladyl® y obtenidas por medio de vagina artificial, mostrando una mejor respuesta al proceso de criopreservación, encontrándose que la composición del medio diluyente afecta el grado respuesta. El método de recolección seminal por medio de electroeyaculador puede llevar a obtener distintos eyaculados que pueden influir en la respuesta de los espermatozoides a diferentes procedimientos tales como la criopreservación. Los espermatozoides obtenidos a través de vagina artificial presentaron valores más altos para los parámetros de vitalidad y motilidad que las



obtenidas por electroeyaculación. AndroMed® y Ovixcell®, no obtuvieron los mejores resultados en el presente estudio. Destacando que las muestras seminales siempre se centrifugaron y de alguna manera esto afectó la motilidad espermática al remover el plasma seminal. El semen colectado utilizando vagina artificial presentó los mejores parámetros de motilidad y velocidad espermática en comparación con el método de electroeyaculación.

### LITERATURA CITADA

- Azerêdo G, C. Esper y K. Resende 2001. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Rumin Res*; 41:257– 63.
- Batista M., T. Niño; M. Santana; D. Alamo; N. Castro; R. Reyes; F. Gonzalez; F. Cabrera; A. Gracia. 2011. Influence of the Preservation Temperature (37, 20, 4, 196°C) and the Mixing of Semen over Sperm Quality of Majorera Bucks. *Reprod Dom Anim* 46: 281–288; doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01659.x
- Bispo C., G. Pugliesi; P. Galvão; M. Rodrigues; P. Kerb; B. Filgueiras; G. Carvalhob. 2011. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small Ruminant Research* 100: 54– 58.
- Bravo J., J. Montanero; R. Calero y T. Roy. 2011. Relación entre variables subjetivas e informatizadas del movimiento espermático del morueco. *Arch. Zootec.* 60 (232): 1087-1094.
- Cox F., V. Alfaro; V. Montenegro y H. Rodriguez-Martinez. 2006. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus, *Theriogenology* 66: 860–867.
- Dorado J., M. Hidalgo; A. Muñoz y I. Rodríguez. 2009. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Animal Reproduction Science* 112: 150–157.
- Dorado J., M. Hidalgo; A. Muñoz y I. Rodríguez. 2010. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Animal Reproduction Science* 121:115–123
- Grajales H., N. Tovia y A. Duica. 2011. Guía técnica de Producción Ovino Caprina III. Manejo y Control Reproductivo. Primera Edición. Bogotá. 77p.
- Hernández-Corredor L., A. Nivia-Osuna; D. Hernández-Villamizar; J. Rubio-Parada y A. Quintero-Moreno. 2013. Evaluación de la motilidad espermática de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes a través del sistema CASA. *Revista Respuesta. UFPS*, 02: 15-26.
- Iritani A. y Y. Nishikawa. 1963 Studies on the egg yolk coagulating factor in goat semen. III. Release of some acids accompanied by the coagulating phenomena. *J. Anim. Reprod.* 8:109-12.
- Januskauskas A., A. Johannisson; y H. Rodriguez-Martinez. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*; 60:743–58.

- Jiménez-Rabadán P., M. Ramón; O. García-Álvarez; A. Maroto-Morales; P. Álvaro-García; E. Del Olmo; D. Pérez-Guzmán; R. Fernández-Santos y A. Soler. 2013. Improved cryopreservation protocol for Blanca-Celtibérica buck semen collected by electroejaculation. *Cryobiology* 67: 251–257.
- Kathiravan, P., J. Kalatharan; G. Karthikeya; K. Rengarajan y G. Kadirvel. 2010. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull Fertility using computer-aided system – A review. *Reprod Domest Anim*; no. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01603.
- Konyali C., C. Tomas; E. Blanch; E. Gomez; J. Graham y E. Moce. 2013. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol- loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology* En: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.06.001>
- Kozdrowski R., A. Dubiel; W. Bielas y M. Dzięcioł. 2007. Two Protocols of Cryopreservation of Goat Semen with the Use of Computer-Assisted Semen Analysis System. *Acta Vet. Brno*, 76: 601-604 doi: 10.2754/avb200776040601
- Leite T., V. Do Vale Filho; R. De Arruda; A. De Andrade; L. Emerick; F. Zaffalon; J. Martins y V. De Andrade. 2010. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Anim Reprod Sci*; 120: 31–8.
- Madrid-Bury, N. 2003. Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. En: *Reproducción Bovina*. C. Gonzalez-Stagnaro (Ed.) SA. Fundación GIRARZ, Maracaibo-Venezuela. Ediciones Astrodata. Cap. XVI, pp.: 263-278.
- Mattner P., y Voglmayr J. 1962. A comparison of ram semen collected by the artificial vagina and by electro-ejaculation. *Australian J, Exp. Agr. An. Husb.* 2: 78.
- Matsas D., V. Huntress; H. Levine; S. Ayres; J. Amini; R. Duby; P. Borden; G. Saperstein y E. Overstrom. 2005. Preservation of heritage livestock breeds: integrated program to cryopreserve germplasm from Tennessee Myotonic goats. *Reprod Fertil Dev* 17:195 (abstract).
- Marco-Jiménez F, J. Vicente; M. Viudes-de-Castro. 2008. Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra ram, *Reprod. Domest. Anim.* 43: 403–408.
- Mortimer, S. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update.* 3: 403-439.
- Naijian H., H. Kohram; A. Shahneh; M. Sharafi y M. Bucak. 2013. Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze-thaw process. *Cryobiology* 66 (2): 151-5.
- Purdy P. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res*; 63:215–25.

- Quintero-Moreno A., J. Miró; T. Rigau y J. Rodríguez-Gil. 2003 Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*. 59, 1973-1990.
- Roof D., S. Bowley; L. Price y D. Matsas. 2012. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology* 77, 412–420.
- Salamon S. y W. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 77–111.
- Sias B., F. Ferrato; M. Pellicer-Rubio; Y. Forgerit; P. Guillouet; B. Leboeuf y F. Carriere. 2005. Cloning and seasonal secretion of the pancreatic lipase-related protein 2 present in goat seminal plasma, *Biochim. Biophys. Acta* 1686: 169–180.
- Tuli, R., y W. Holtz. 1994. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and got-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology* 42 (3): 547-555