



**ivia**  
Instituto Valenciano  
de Investigaciones Agrarias



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

## MÁSTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

# RELACIÓN ENTRE LA CALIDAD *IN VITRO* DE LOS EYACULADOS Y LA FERTILIDAD *IN VIVO* DE DOSIS REFRIGERADAS DE CAPRINO DE RAZA MURCIANO- GRANADINA

**Trabajo Fin de Máster**

Valencia, Septiembre 2018

Alumno: **D. Sócrates Josué Contreras Gómez**

Directores: Dra. Eva Mocé Cervera y Dr.  
Ernesto Ángel Gómez Blasco

## RESUMEN

En el presente estudio analizamos la posible relación entre las condiciones de las cabras y los parámetros de calidad *in vitro* de los espermatozoides recogidos de los machos cabríos pertenecientes a la raza Murciano Granadina y la fertilidad de las dosis refrigeradas *in vivo*. Se recogieron eyaculados de 13 machos, se diluyeron con un extensor de leche desnatada y se cargó semen en pajuelas de 0,25 ml que se enfriaron a 4 ° C. La calidad del espermatozoide (motilidad y viabilidad) se analizó en muestras frescas y refrigeradas. La motilidad (porcentajes de espermatozoides móviles totales y progresivamente móviles), los parámetros cinéticos se evaluaron con un sistema de análisis de espermatozoide asistido por computadora (CASA) y la integridad de la membrana plasmática (viabilidad) se evaluó con una doble tinción fluorescente (SYBR-14 y yoduro de propidio) y citometría de flujo. Además, las dosis de 62 eyaculados se utilizaron para la inseminación de 541 cabras ubicadas en diferentes granjas (las inseminaciones se realizaron en 13 sesiones). Los eyaculados frescos presentaron una calidad promedio de 78,6% de espermatozoides móviles totales y 66,7%, mientras que las dosis refrigeradas exhibieron una calidad promedio de 76,6% de espermatozoides móviles totales y 54,9% espermatozoides vivos. La fertilidad al nacer fue del 59.3%. Se usaron modelos logísticos mixtos para explicar los resultados de la fertilidad. Entre las condiciones femeninas, la edad y el número de paridas afectaron la fertilidad. En cuanto a los parámetros de calidad espermática, los más relevantes fueron las velocidades lineal y curvilínea (VSL y VCL, respectivamente). Sin embargo, la fertilidad no fue adecuadamente explicada por diferentes modelos y no encajaba adecuadamente debido al enorme peso del efecto de la sesión.

## SUMMARY

In the present study we analyzed the possible relationship between the conditions of the goat females and the in vitro quality parameters of sperm collected from goat bucks belonging to the Murciano Granadina breed and the fertility of refrigerated doses in vivo. Ejaculates from 13 males were collected, diluted with a skimmed milk extender and semen was loaded into 0.25 mL straws that were chilled to 4 °C. The sperm quality (motility and viability) was analyzed in both fresh and refrigerated samples. Motility (percentages of total motile and progressively motile sperm) and kinetic parameters were evaluated with a computer-assisted sperm analysis system (CASA) and the sperm plasma membrane integrity (viability) was evaluated with a double fluorescent staining (SYBR-14 and propidium iodide) and flow cytometry. In addition, the doses from 62 ejaculates were used for the insemination of 541 goats located in different farms (the inseminations were performed in 13 sessions). Fresh ejaculates presented an average quality of 78.6% total motile and 66,7% live sperm while refrigerated doses exhibited an average quality of 76,6% total motile and 54,9% live sperm. Fertility at birth was 59.3%. Mixed logistic models were used trying to explain the results of fertility. Among the female conditions, age and number of parities affected the fertility. Regarding sperm quality parameters, the most relevant were the linear and the curvilinear velocities (VSL and VCL, respectively). Nevertheless, fertility was not adequately explained by different models and they did not fit properly because the enormous weight of session effect.

## TABLAS DE CONTENIDO

### RESUMEN

### SUMMARY

1.-INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1. Materiales.....	7
3.2. Preparación de los medios.....	7
3.3. Animales.....	8
3.4. Recuperación del semen.....	9
3.5. Preparación de las dosis de semen refrigeradas.....	10
3.6. Análisis de la calidad seminal.....	10
3.7. Protocolo de sincronización de celo e inseminación artificial.....	13
3.8. Modelos estadísticos.....	14
4. RESULTADOS.....	16
4.1 Variables de calidad seminal.....	16
4.1.1 Descriptivo.....	16
4.2 Variables con información de las hembras.....	22
4.2.1 Descriptivo.....	22
4.2.2 Regresiones logísticas con factores de información de las hembras.....	23
4.3 ANALISIS CONJUNTO.....	26
5. DISCUSIÓN.....	28
7. CONCLUSIONES.....	33
8. AGRADECIMIENTOS.....	35
9. BIBLIOGRAFÍA.....	36

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Definición de las velocidades e índices del sistema CASA .....	3
Tabla 2. Composición de los diluyentes utilizados.....	6
Tabla 3. Análisis descriptivo de variables de calidad seminal en fresco .....	14
Tabla 4. Análisis descriptivo de variables de calidad en semen refrigerado.....	15
Tabla 5. Correlación entre medidas de semen fresco y refrigerado.....	17
Tabla 6. Modelos logísticos con un solo efecto entre los factores de calidad de semen fresco(_F) y refrigerado (_R) (N=541 inseminaciones).....	18
Tabla 7. Modelos logísticos con varios efectos entre los factores de calidad de semen fresco y refrigerado (N=513 inseminaciones).....	19
Tabla 8. Modelos logísticos mixtos con varios efectos entre los factores de calidad de semen fresco y refrigerado (N=513 inseminaciones).....	19
Tabla 9. Análisis descriptivo de variables relacionadas con las hembras.....	20
Tabla 10. Modelos logísticos con un solo efecto con información de las hembras.....	22
Tabla 11. Modelos logísticos con varios factores de información de las hembras (N=541).....	23
Tabla 12. Modelos logísticos mixtos con información de las hembras (N=541).....	23
Tabla 11. Modelos logísticos mixtos con varios factores de información, tanto de la calidad del eyaculado como de las hembras inseminadas (N=502).....	24
Tabla, 10, Diferentes modelos mixtos de regresión logística con efectos fijos (significación de VCL_F o VAP_F) y aleatorios (varianzas de sesión y de macho dentro de sesión) con parámetros de ajuste (AIC y BIC) (N=502 registros).....	24

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Percepción gráfica de las velocidades medias del sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) .....	4
Figura 2. Correlaciones entre los parámetros de calidad del semen fresco .....	15
Figura 3. Correlaciones entre los parámetros de calidad del semen refrigerado .....	16
Figura 4. Correlación entre las variables con información de las hembras.....	21

## 1.-INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es una técnica reproductiva de mucha utilidad, empleada en los programas de mejoramiento genético. La IA ha sido una de las técnicas más utilizadas y de mayor avance en la reproducción animal (López-Gatius, 2012), con impacto en la mejora genética, fácil manejo y prevención de enfermedades venéreas. El uso de la IA en los programas de mejora genética nos permite aprovechar el potencial reproductivo de los machos cabríos, considerando que, con esta técnica podemos aumentar el número de hijas por macho de una manera más efectiva, rentable y en menos tiempo. Utilizando IA podemos difundir de una manera más eficaz el material genético de los machos a las explotaciones ganaderas mediante el reparto de dosis seminales de machos élite, debido a que podemos controlar cuándo servir las cabras mediante sincronización de celos. Por tanto, la IA juega un papel fundamental en el avance de los programas de mejora genética, ya que permite conectar de una forma eficaz los rebaños para poder evaluar el potencial genético de los sementales que se encuentran en fase de prueba, así como también, acceder a animales mejorados genéticamente y su difusión a un mayor número de hembras y explotaciones con garantías sanitarias (Leboeuf et al., 2008). El avance de un programa de selección será tanto más rápido cuanto mayor sea el número de cabras inseminadas y cuanto mayor sea la fertilidad conseguida porque el número de hijas necesarias para testar a los sementales se obtendrá en menor tiempo.

El éxito de un programa de IA a tiempo fijo puede verse afectado por factores ambientales, de nutrición y de manejo. En lo concerniente a las hembras, las cabras deben encontrarse en estado óptimo de salud, tener una alimentación adecuada y los factores ambientales favorables para que puedan ser capaces de producir, ovular ovocitos normales y fecundables.

Dentro de los factores de manejo relacionados con los machos y que afectan al éxito de la IA podemos destacar la preparación de las dosis seminales utilizadas para servir las cabras mediante la IA. Deben realizarse una serie de análisis que garanticen la capacidad fecundante de cada dosis seminal, aunque, con simples pruebas de laboratorio, no se puede predecir directamente el potencial fecundante de cada eyaculado. Se debe tener un buen manejo durante el proceso de recolección del eyaculado, manejo del semen y la preparación de las dosis de inseminación, ya que de esto va a depender, en parte, el éxito del programa de IA (Leboeuf et al., 2000).

Por tanto, la calidad del eyaculado juega un rol importante en la IA, ya que la fertilidad en las cabras depende en cierto grado de la calidad de los espermatozoides. Para garantizar la fertilidad, un espermatozoide debe poseer una serie de atributos para poder fecundar el ovocito, tales como motilidad, mitocondrias activas para suministrar la energía necesaria para la motilidad, membranas acrosómicas intactas que permitan el proceso de capacitación para que ocurra la reacción acrosómica en el momento en que el espermatozoide se una a la zona pelúcida del óvulo, receptores que permitan que éste se una a la zona pelúcida y al oolema y membranas plasmáticas capaces de fusionarse con el oolema (Graham y Mocé, 2005).

El eyaculado debe pasar por una serie de análisis para evaluar su calidad. En muchos de los centros de inseminación artificial solo se estiman el volumen, la concentración y la motilidad masal como parámetros de evaluación seminal, pero esto no es suficiente para predecir la capacidad fecundante de las dosis seminales. La valoración seminal permite descartar los eyaculados que no cumplen unos mínimos de calidad y, aunque no permite predecir la fertilidad en dosis con valores de calidad normales, sí permite descartar dosis con calidades muy bajas y que presentarán problemas de fertilidad. Por este motivo, todos los eyaculados deben evaluarse a fondo (Graham y Mocé, 2005).

La capacidad predictiva de los análisis laboratoriales aumenta a medida que aumenta el número de características estudiadas sobre cada espermatozoide

(Graham, 2001). No obstante, en muchas especies ganaderas los centros de inseminación se ven obligados a utilizar técnicas sencillas y rápidas para el estudio del eyaculado como es el análisis de la motilidad. La mayoría de las IA en ganado caprino (>85%) se realizan en España con semen refrigerado, debido a que su fertilidad (55-65%) es superior a la del semen congelado (35-38%; Arrébola, 2013). Las dosis seminales refrigeradas deben salir a campo en un corto intervalo de tiempo desde la extracción, ya que los espermatozoides de caprino conservados en estado líquido sufren un rápido deterioro que compromete su fertilidad, disminuyendo ésta drásticamente a partir de las 12 h de conservación (Leboeuf et al., 2000). De hecho, la mayoría de las inseminaciones que se realizan con semen conservado se aplican entre 5-8 h. Este reducido tiempo de conservación limita el número de pruebas que se pueden realizar en laboratorios sobre las dosis seminales y obliga a tomar decisiones con celeridad.

El uso de las tecnologías y de las nuevas herramientas para la evaluación del eyaculado nos permiten estudiar más a fondo cada célula espermática. El sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) es una herramienta muy útil a la hora de analizar la motilidad de las muestras, puesto que permite analizar de manera más precisa el porcentaje de espermatozoides móviles y de espermatozoides con motilidad progresiva, e incluso la trayectoria y motilidad de cada uno de los espermatozoides. Este sistema no sólo proporciona información cuantitativa del movimiento (porcentaje de móviles totales-progresivos) sino que también proporciona información acerca de la calidad de ese movimiento (velocidades e índices) e incluso de otros parámetros (Tabla 1). Este sistema permite incluso diferenciar muestras con distintos grados de capacitación en función de la distribución de los espermatozoides en distintas subpoblaciones con patrones de movimientos específicos (Mortimer, 2000).

Tabla 1. Definición de las velocidades e índices del sistema CASA

<b>Acrónimo</b>	<b>Variable</b>	<b>Significado</b>	<b>Unidades</b>
VAP	Average path velocity	Trayectoria general del espermatozoide. La velocidad media en el tiempo del espermatozoide a lo largo de su trayectoria media.	µm/s



VSL	Straight line velocity	Velocidad lineal en la línea recta. Velocidad media en el tiempo de la cabeza de espermatozoide en la línea recta desde su primera posición hasta su última posición detectada.	$\mu\text{m/s}$
VCL	Curvilinear path velocity	Velocidad curvilínea. Velocidad media en el tiempo de la cabeza del espermatozoide a lo largo de la trayectoria real.	$\mu\text{m/s}$
LIN	Linearity	índice de linealidad. Mide o determina la linealidad trayectoria curvilínea ( $\text{VSL/VCL} \times 100$ ).	%
STR	Straightness	índice de rectitud. Determina la rectitud de la trayectoria media o allanada ( $\text{VSL/VAP} \times 100$ ).	%
WOB	Wobble oscilation index	Índice de oscilación ( $\text{VAP/VCL} \times 100$ ).	%
ALH	Amplitud of lateral head displacement	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza. Determina la amplitud de las variaciones de la trayectoria real de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria media o allanada, usada como aproximación de la amplitud de las batidas del flagelo.	$\mu\text{m}$
BCF	Beat cross frequency	Frecuencia de batida de la cola. Frecuencia media a la que la cabeza del espermatozoide cruza la dirección general del movimiento (cada vez que VCL cruza VAP).	Hz

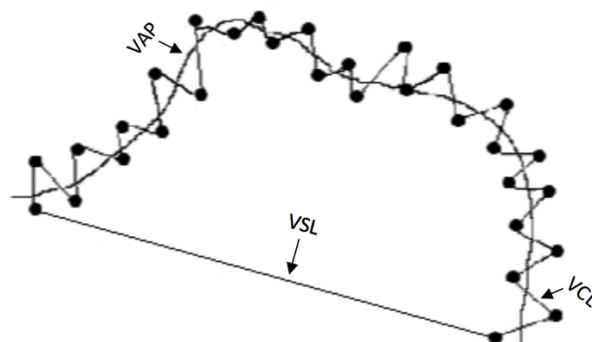


Figura 1. Percepción gráfica de las velocidades medias del sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). Adaptado de Mortimer (2000).

Otra técnica de mucha utilidad es la citometría de flujo, que nos permite evaluar múltiples atributos de miles de espermatozoides en unos pocos segundos utilizando tinciones fluorescentes (Graham, 2001). Con ello se puede obtener más información acerca de la calidad de los espermatozoides. Además, y en función de la configuración del sistema, se pueden combinar varias tinciones fluorescentes para evaluar diferentes estructuras espermáticas a la vez (membranas plasmáticas,

mitocondrias, acrosomas, núcleo, etc.) (Martínez-Pastor et al., 2010).

Se han estudiado las relaciones entre algunos de los parámetros de calidad seminal con la fertilidad en algunas especies ganaderas, como es el caso de la motilidad. Así, se ha observado que la motilidad masal de los espermatozoides es un indicador conveniente de la fertilidad en ovejas (David et al., 2005), y en conejos (Brun et al., 2001). Entre las medidas de movimiento de esperma derivadas de CASA, los valores medios de VCL, VAP y BCF están correlacionados positivamente con la tasa de preñez en burros andaluces (Dorado et al., 2013). En caprinos, se ha estudiado la correlación del porcentaje de espermatozoide móviles de semen congelado y la fertilidad (Furstoss et al., 2010), pero no ha sido estudiada en semen refrigerado.

## 2. OBJETIVOS

Por tanto, el objetivo general de este trabajo es estudiar la relación entre la calidad del semen *in vitro* con la fertilidad del semen refrigerado en campo en cabras.

- Relación entre los parámetros de calidad seminal laboratorial.
- Relación entre estos parámetros y la fertilidad.
- Relación entre algunas características de las cabras y su fertilidad a inseminación.
- Análisis conjunto para relacionar las medidas de calidad seminal y características de las cabras sobre la fertilidad a la inseminación.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en el Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA), del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) ubicado en Segorbe, Castellón.

#### 3.1. Materiales

Los productos químicos que se emplearon para la preparación de los medios fueron de grado reactivo procedentes de Sigma-Aldrich (Madrid, España) y las tinciones fluorescentes Yoduro de Propidio y SYBR-14 de Invitrogen (Barcelona, España).

#### 3.2. Preparación de los medios

Para la preparación de las dosis de semen se utilizó un diluyente de base leche desnatada (skimmed milk, SM1). Para la evaluación de la calidad del semen fresco y refrigerado, se utilizaron el diluyente TCG y el diluyente TCG suplementado con albúmina sérica bovina (3 mg/mL; TCG-BSA). La composición de todos los diluyentes utilizados se encuentra resumida en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de los diluyentes utilizados

Ingredientes	Peso	Tris-cítrico-glucosa - TCG		SM1
	Molecular	Concentración	(g/L)	(g/L)
TRIZMA base	121,1	250 mM	26,2	20,4
Ácido cítrico anhidro	192,12	83 mM	51	11,6
D (+) Glucosa	180,16	69 mM		
Agua Milli-Q			Hasta 1L	
Leche desnatada UHT (Central Lechera Asturiana)				Hasta 1 L
mOsm		300		
pH		6,8-7		

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

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

### 3.3. Animales

En este estudio se utilizaron muestras de semen fresco y refrigerado de 13 machos cabríos de raza Murciano-Granadina ubicados en la nave de ovino-caprino del CITA en Segorbe (Castellón), entre los cuales se encuentran sementales probados y en fase de prueba. Los sementales se alojaron en corrales comunes, disponiendo de agua y paja *ad libitum* y fueron alimentados con 1 kg de pienso concentrado por macho (17% proteína bruta, 4,5% aceites y grasas brutas y 11,6% fibra bruta). Tanto el alojamiento como los protocolos para la recuperación del semen e inseminación artificial cumplían la normativa europea para el cuidado y uso de los animales de experimentación (Directiva EC 2010/63/EU).

Para las pruebas de fertilidad se utilizaron los datos de inseminación de 549 cabras de raza Murciano-Granadina alojadas en doce ganaderías pertenecientes a la Asociación Española de Criadores de la Cabra Murciano-Granadina (ACRIMUR), localizadas en diferentes provincias.

Desde la Asociación, se nos proporcionó información relativa a las cabras inseminadas:

- Edad: edad (días) de la cabra en el momento de la inseminación.
- Características relacionadas con la producción global de la cabra
  - o Maxleche: leche total en la mejor lactación de la hembra, en kg de leche.
  - o LECHEPARTO: suma de producciones de leche dividida entre el número de lactaciones en las que produjo, en Kg de leche.
  - o KG\_gra\_pro: suma de producciones de kg de grasa y proteína dividida entre el número de lactaciones en las que las produjo, en kg.

- Partos: número de partos (entre 1 y 11). Esta información se ha agrupado en un efecto con 4 niveles (cod\_partos: 1, 2, 3 y >3 partos, con 168, 152, 94 y 127 cabras en cada nivel).
- Características relacionadas con la evaluación genética del programa de mejora:
  - VG\_LECHE: valor genético para producción de leche por lactación, en Kg de leche.
  - VG\_GRASA: valor genético para cantidad de grasa producida por lactación, en Kg de grasa.
  - VG\_PROTEINA: valor genético para cantidad de proteína producida por lactación, en Kg de proteína.
  - ICOt: índice de producción y morfología.
- Modo de refrigeración del semen (R\_transporte): ya se haya realizado en el baño programable del laboratorio o en itinere (230 es 0, 311 es 1).
- Número de espermatozoides totales en inseminación (SPZ) (140 (523 hembras) /280 (18 hembras) millones).
- Estado de la esponja de progestágeno en el momento de su retirada (cod\_esponja): indicando si a la retirada la esponja estaba limpia (511 hembras) o no (30 registros: sucia 16, diarrea 2, hemorrágica 6 , sangre fresca 3 o sin esponja 3).

### **3.4. Recuperación del semen**

La colección seminal se realizó dos veces por semana mediante vagina artificial atemperada a 40-45 °C, según el protocolo descrito por Silvestre et al. (2004). Una vez obtenido el eyaculado el tubo que contenía el eyaculado se rotuló con los datos del semental y se colocó en baño maría a 25 °C.

El volumen del semen se estimó mediante pesaje. El cálculo de la concentración se realizó en una muestra diluída 1:400 (v:v) con la solución de cloruro sódico 0,9% mediante un fotómetro que mide la densidad espermática por la absorbancia que ofrece la suspensión de espermatozoides, y calibrado para el semen de caprino (Accucell, IMV, Humeco, Huesca, España).

### **3.5. Preparación de las dosis de semen refrigeradas**

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

El resto del semen fue envasado en pajuelas de 0,25 mL (IMV, Humeco, Huesca, España) que fueron selladas con polivinil alcohol en polvo (PVA, Humeco, Huesca, España), que polimeriza al entrar en contacto con el agua.

Hubo dos procedimientos para la refrigeración de las pajuelas, o en el laboratorio del CITA mediante un baño programable o bien durante el transporte (in itinere), mediante un prototipo de refrigeración diseñado exprofeso que se adapta a las neveras de transporte de dosis. Para las dosis refrigeradas en el baño programable, las pajuelas se colocaron en un baño de agua termostatado programable (Julabo GmbH, Seelbach, Alemania), donde fueron enfriadas lentamente desde 20 a 4 °C en 90 min (velocidad teórica de enfriamiento:  $-0,18$  °C /min) siendo posteriormente conservadas a 4 °C hasta su uso. En el caso de las dosis refrigeradas durante el transporte, las pajuelas se colocaron en un frasco de vidrio sumergido en un baño de agua a 23-25 °C y éste fue rodeado por enfriadores y colocado en la nevera de transporte a 4 °C de forma que se alcanzó una temperatura de 4 °C en 3 horas y 45 minutos a una velocidad de enfriamiento entre 0,1 y 0,3 °C /min.

Después de la refrigeración se guardó una pajueta de cada uno de los eyaculados refrigerados para evaluar la calidad seminal.

### **3.6. Análisis de la calidad seminal**

Para evaluar la calidad del semen, se realizaron análisis de movilidad y de integridad de membrana plasmática de los espermatozoides, tanto en muestras de semen

fresco (antes de refrigerar las muestras) como refrigerado. Se siguieron los protocolos descritos por Konyali et al. (2013), con ligeras modificaciones.

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

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

La concentración para el análisis de motilidad se ajustó en cada M-30 a  $6 \times 10^6$  espermatozoides/mL con TCG-BSA. Estas muestras fueron incubadas a 37 °C durante 10 min antes de realizar los análisis de motilidad. A continuación, se tomaron 5  $\mu\text{L}$  de muestra y se depositaron en una cámara Makler (Counting Chamber Makler, Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) atemperada a 37 °C en una placa calefactada y se tomaron los datos de un mínimo de 200 espermatozoides en tres campos distintos. Las trayectorias de los espermatozoides fueron posteriormente revisadas para eliminar posibles confusiones con partículas no espermáticas y trayectorias erróneamente analizadas.

Para obtener el porcentaje de espermatozoides viables (membrana plasmática intacta) en cada muestra fresca o refrigerada se utilizó la tinción dual fluorescente



SYBR-14/yoduro de propidio (PI) y citometría de flujo según el protocolo descrito por Purdy y Graham (2004) con ligeras modificaciones. Todas las diluciones se realizaron a temperatura ambiente.

Para el análisis mediante citometría de flujo se transfirieron 0,1 mL de cada M-30 a tubos y a continuación se añadieron 30  $\mu$ L de una solución de tinción que contenía 25  $\mu$ L de diluyente TCG, 2,5  $\mu$ L de SYBR-14 (solución 10  $\mu$ M en dimetil sulfóxido-DMSO) y 2,5  $\mu$ L de PI (solución 1,5 mM en agua Milli-Q) y se incubaron con las tinciones durante 10 min a temperatura ambiente. Tras la incubación las muestras se diluyeron con 425  $\mu$ L de diluyente TCG y se analizaron en un citómetro de flujo Epics XL-MCL (Beckman Coulter, IZASA, Barcelona, España) equipado con sistema óptico estándar (láser de argón de 488 nm a 15-mW; Cyonics; Coherent, Santa Clara, CA, EE.UU.), y un software EXPO 2000 (Coulter Corporation, West Lafayette, EE.UU). La fluorescencia verde emitida por el SYBR-14 se detectó utilizando un filtro de paso largo de banda (LP) de 550-nm en combinación con un filtro de paso de banda (BP) de 525-nm (ancho de banda 505–545) (FL1). La fluorescencia roja emitida por el PI se detectó usando un filtro LP de 645-nm combinado con un filtro BP de 620-nm (ancho de banda 605–635) (FL3). El valor del fotomultiplicador (PMT) del detector en FL1 se fijó a 650 V y en FL3 a 691 V. La compensación utilizada entre los filtros FL1–FL2 fue del 41,4%, y entre FL3–FL1 fue 5,5%. Se analizaron un mínimo de 10.000 eventos por muestra. Usando este protocolo, todas las células se tiñen con SYBR-14, lo que permite distinguir a las células de los eventos que no contienen ADN (SYBR-14 y PI negativas) pero que presentan un tamaño similar al de los espermatozoides, pero sólo las células no viables (es decir, con la membrana plasmática dañada) se tiñen con PI. El porcentaje de partículas sin ADN no se consideró en los cálculos finales para evitar sobrestimar el porcentaje de espermatozoides vivos (PI negativos) (Petrunkina y Harrison, 2010; Petrunkina y Harrison, 2010). Como resultado del análisis sólo se consideró el porcentaje de espermatozoides vivos (SYBR-14 positivos y PI negativos).

Sólo se eliminaron las dosis de aquellos eyaculados que tras la refrigeración presentaban o un bajo porcentaje de espermatozoides vivos, o móviles o una deficiente calidad de movimiento.

### **3.7. Protocolo de sincronización de celo e inseminación artificial**

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

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

La IA se realizó el día 8, en un intervalo entre las 45 y las 48 h tras la inyección de PMSG. Durante la IA cada cabra fue inmovilizada con ayuda de un asistente que sujetó y levantó a las cabras por los miembros posteriores. A continuación, el técnico encargado de realizar la IA limpió la vulva, introdujo en la vagina un espéculo lubricado (8-10 cm; lubricante BOVIVET Gel 1000 ml, Kruuse, Langeskov, Dinamarca) y lo abrió para localizar la entrada del cérvix en la base de la vagina. En caso de encontrarse moco cervical, éste fue retirado cuidadosamente ya que acumula productos bacterianos e inflamatorios que pueden afectar a la viabilidad

espermática (Manes y Ungerfeld, 2015). Posteriormente, se colocó el inyector en la entrada del cérvix empujando suavemente para insertarlo lo más profundo posible en el cuello uterino (casi siempre a la entrada del cérvix) y se depositó lentamente el semen para evitar un reflujo excesivo. Cada cabra fue inseminada con el contenido de una pajuela de IA con un total de  $140 \times 10^6$  espermatozoides. Cuando se usaron dos dosis en la misma hembra, se anotó en las hojas de campo. El espéculo fue desinfectado entre cada cabra con una solución de amonio cuaternario (CATIGENE PLUS, Quimicamp Higiene, S.L., Valencia, España). La fertilidad de una cabra se consideró positiva cuando la hembra paría.

### **3.8. Modelos estadísticos**

Se realizó un pre-filtrado con un análisis exploratorio de los datos.

Al ser la fertilidad un carácter binario se utilizaron modelos de regresión logística, que permiten utilizar efectos numéricos y efectos categóricos fijos y modelos lineales generalizados, que permiten incluir efectos aleatorios para el análisis de variables binarias.

En una primera fase se analizaron los datos de fertilidad en relación con los parámetros de la calidad del eyaculado: VIVOS, MT, MP, VAP, VSL, VCL, LIN, SRT, WOB y ALH, tanto en semen fresco como en refrigerado. En una segunda fase, se utilizó la información de las cabras inseminadas, con variables de producción de leche (maxleche, LECHE PARTO, KG\_gra\_pro), el efecto cod\_partos, las variables de evaluación genética (VG\_LECHE, VG\_GRASA, VG\_PROTEÍNA, ICOT), el número de espermatozoides inseminados (SPZ), el procedimiento de refrigeración (R\_transporte) y la limpieza o no de la esponja (cod\_esponja). En una tercera fase se utilizó toda la información conjuntamente: calidad de semen e información de las hembras.

Los análisis de regresión logística se utilizan como criba inicial para distinguir efectos que tengan o no una relación explicativa con la variable binomial de interés

(ha parido o no). Como criterios estadísticos se utiliza el test chi-cuadrado de Wald, que testa si el valor del coeficiente estimado para el efecto es distinto de cero (una  $P < 0,05$  indica que es diferente de cero), y el criterio de información de Akaike (AIC) que informa sobre el ajuste del modelo (mejor ajuste a valor más pequeño). En todos estos análisis se utilizarán efectos numéricos y efectos fijos categóricos, que son transformados en variables dummy. En otros modelos, se utilizó también el BIC (Schwarz o Bayesian information criterion) como criterio de ajuste de modelos (mejor a valor más pequeño).

En los modelos de regresión logística con varios efectos numéricos y categóricos es posible hacer uso de utilidades de los paquetes estadísticos que permiten la selección de los mejores modelos añadiendo o rechazando efectos según criterios estadísticos (en SAS las opciones son STEPWISE, BACKWARD Y FORWARD).

El proceso utilizado ha sido:

- Análisis de regresión logística con un solo factor fijo o numérico.
- Análisis de regresión logística con varios factores fijos o numéricos y haciendo uso de procedimientos de selección de modelos.
- Análisis de regresión logística con diferentes modelos mixtos, utilizando las variables seleccionadas en procedimientos anteriores, testando varios modelos y seleccionando como 'mejor' el de menores valores de los criterios de ajuste.

Para todo ello, se utilizaron los paquetes estadísticos Statgraphics Centurion XVII y SAS Statistical Software versión 9.2.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Variables de calidad seminal

#### 4.1.1 Descriptivo

En la Tabla 3 y Tabla 4, se observan los valores medios de los parámetros de calidad de los eyaculados, valores máximos y mínimos, así como los coeficientes de variación, en semen fresco y en semen refrigerado. Los mayores coeficientes de variación aparecen en los porcentajes de espermatozoides vivos y los menores en el índice de rectitud y en el índice de oscilación (STR y WOB), tanto en fresco como en refrigerado.

Tabla 3. Análisis descriptivo de variables de calidad seminal en fresco en 62 eyaculados (N= número de inseminaciones)

Variable*	Media	Max.	Min.	CV (%)	N
VIVOS_F(%)	66,7	91,8	26,2	20,4	449
MT_F2 (%)	78,6	95	51	11,6	513
MP_F2 (%)	63,2	81	39	15,3	513
VCL_F ( $\mu\text{m/s}$ )	134	172,4	94,9	12,8	513
VSL_F ( $\mu\text{m/s}$ )	117	153,2	81,3	14,4	513
VAP_F ( $\mu\text{m/s}$ )	127	165,2	87,8	13,9	513
LIN_F (%)	84	91	74	5,2	513
STR_F (%)	89	94	82	3,2	513
WOB_F (%)	93	96	86	3,0	513
ALH_F ( $\mu\text{m}$ )	1,84	2,8	1,47	14,2	513
BCF_F (Hz)	10,7	12,3	8,9	7,6	513

\* El sufijo \_F o \_F2 indica que son valores de semen fresco. VIVOS: porcentaje de espermatozoides vivos; MT: porcentaje de espermatozoides móviles; MP: porcentaje de espermatozoides móviles progresivos; VCL: velocidad curvilínea; VAP: velocidad media del trayecto; VSL: velocidad lineal; STR: índice de rectitud; LIN: índice de linealidad; WOB: Índice de oscilación; ALH: amplitud del desplazamiento de la cabeza lateral; BCF: Frecuencia de batida de la cola.

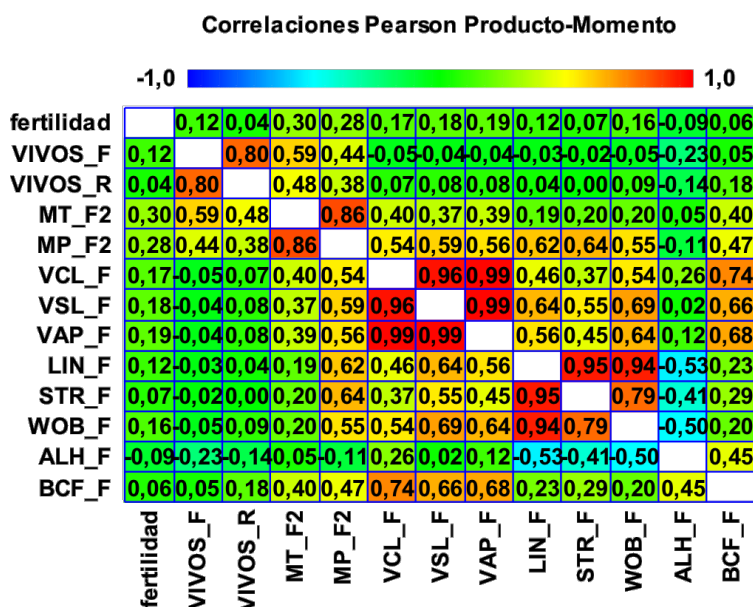
En la Figura 2 se presenta la matriz de correlaciones entre las variables de calidad en semen fresco. La correlación entre motilidad total y motilidad progresiva es alta (0,86). Se observa una correlación muy alta (0,96-0,99) entre las velocidades (VCL, VSL y VAP) en el semen fresco. También aparece correlación media-alta entre BCF y las velocidades (0,66-0,74). Además, el Índice de linealidad (LIN) está muy

correlacionado con el índice de rectitud (STR) y con el índice de oscilación (WOB) (0,79-0,95).

Tabla 4. Análisis descriptivo de variables de calidad en semen refrigerado en 62 eyaculados (N= número de inseminaciones)

Variable	Media	Max	Min	CV (%)	N
VIVOS_R(%)	54,9	83,9	16,9	25,6	449
MT_R2 (%)	76,6	94	59	10,4	513
MP_R2 (%)	61,6	82	36	13,8	513
VCL_R (µm/s)	142	180	109	11,2	513
VSL_R (µm/s)	121	155	87,2	12,8	513
VAP_R (µm/s)	134	172	95,5	12,6	513
LIN_R (%)	83	89	71	4,8	513
STR_R (%)	88	93	81	3	513
WOB_R (%)	93	96	84	2,9	513
ALH_R (µm)	2,06	3,02	1,60	12,5	513
BCF_R (Hz)	10,7	12,7	9,13	7,1	513

\* El sufijo \_R o \_R2 indica que son valores de semen refrigerado. VIVOS: porcentaje de espermatozoides vivos; MT: porcentaje de espermatozoides móviles; MP: porcentaje de espermatozoides móviles progresivos; VCL: velocidad curvilínea; VAP: velocidad media del trayecto; VSL: velocidad lineal; STR: índice de rectitud; LIN: índice de linealidad; WOB: Índice de oscilación; ALH: amplitud del desplazamiento de la cabeza lateral; BCF: Frecuencia de batida de la cola.



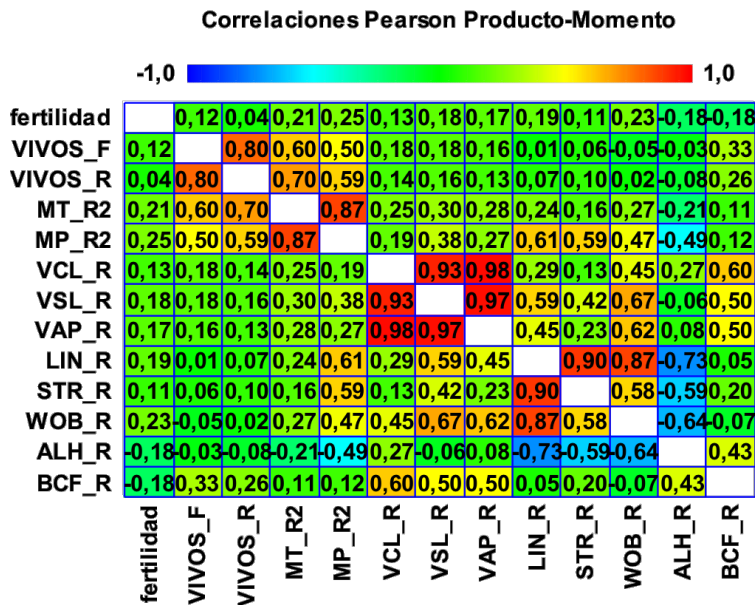
\* El sufijo \_F o \_F2 indica que son valores de semen fresco y el sufijo \_R de semen refrigerado. Fertilidad: número de hembras paridas respecto a las hembras inseminadas con un eyaculado; VIVOS: porcentaje de espermatozoides vivos; MT: porcentaje de espermatozoides móviles;

MP: porcentaje de espermatozoides móviles progresivos; VCL: velocidad curvilínea; VAP: velocidad media del trayecto; VSL: velocidad lineal; STR: índice de rectitud; LIN: índice de linealidad; WOB: Índice de oscilación; ALH: amplitud del desplazamiento de la cabeza lateral; BCF: Frecuencia de batida de la cola.

Figura 2. Correlaciones entre los parámetros de calidad del semen fresco

En la Figura 3, se muestran las correlaciones entre los parámetros de calidad del semen refrigerado. La correlación entre motilidad total y motilidad progresiva también fue alta (0,80), con valores inferiores de correlación entre éstas y el porcentaje de espermatozoides vivos (0,70 y 0,59). También se observó una correlación muy alta (0,93-0,98) entre las medidas de velocidad (VCL, VSL y VAP) en el semen refrigerado. De nuevo el Índice de linealidad (LIN) estaba muy correlacionado con el índice de rectitud (STR) y con el índice de oscilación (WOB) (0,58-0,90).

Aparecen correlaciones negativas entre ALH y los índices LIN, STR y WOB. Y en el caso de semen refrigerado, una correlación negativa de -0,49 con MP\_R2.



\* El sufijo \_R o \_R2 indica que son valores de semen refrigerado y el sufijo \_F de semen fresco. Fertilidad: número de hembras paridas respecto a las hembras inseminadas con un eyaculado; VIVOS: porcentaje de espermatozoides vivos; MT: porcentaje de espermatozoides móviles; MP: porcentaje de espermatozoides móviles

progresivos; VCL: velocidad curvilínea; VAP: velocidad media del trayecto; VSL: velocidad lineal; STR: índice de rectitud; LIN: índice de linealidad; WOB: Índice de oscilación; ALH: amplitud del desplazamiento de la cabeza lateral; BCF: Frecuencia de batida de la cola.

Figura 3. Correlaciones entre los parámetros de calidad del semen refrigerado

Tabla 5. Correlación entre medidas de semen fresco y refrigerado

<b>Variables*</b>	<b>Correlación</b>
VIVOS (%)	0,80
MT (%)	0,54
MP (%)	0,55
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	0,74
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	0,71
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	0,75
LIN (%)	0,55
STR (%)	0,42
WOB (%)	0,27
ALH ( $\mu\text{m}$ )	0,62
BCF (Hz)	0,69

\* VIVOS: porcentaje de espermatozoides vivos; MT: porcentaje de espermatozoides móviles; MP: porcentaje de espermatozoides móviles progresivos; VCL: velocidad curvilínea; VAP: velocidad media del trayecto; VSL: velocidad lineal; STR: índice de rectitud; LIN: índice de linealidad; WOB: Índice de oscilación; ALH: amplitud del desplazamiento de la cabeza lateral; BCF: Frecuencia de batida de la cola.

En la Tabla 5 podemos apreciar que hubo una correlación muy alta entre valores de espermatozoides vivos en semen fresco y refrigerado (0,80) mientras que sólo había una correlación media entre valores de motilidad (total y progresiva) en fresco y refrigerado de 0,54-0,55. Entre las otras variables CASA se observaron tres agrupaciones:

- las velocidades (VCL y VAP y VSL), con correlaciones altas, de 0,71 a 0,75
- los índices ALH, WOB y BCF, con menores correlaciones entre ellos, 0,55-0,69
- los índices STR y LIN, con las menores correlaciones (0,27 y 0,42)



#### 4.1.2 Regresiones logísticas con información de parámetros de calidad del eyaculado

##### 4.1.2.1 Con un solo efecto

En este primer análisis (Tabla 6) sólo aparecieron como variables explicativas significativas la sesión, y las motilidades total y progresiva en fresco más la motilidad progresiva en refrigerado.

Tabla 6. Modelos logísticos con un solo efecto entre los factores de calidad de semen fresco (\_F o \_F2) y refrigerado (\_R o \_R2) (N=541 inseminaciones)

Efecto*	P-Wald	AIC	N	Efecto	P-Wald	AIC	N
Sesión	<0,0001	672,3	513	Macho	0,086	693,7	513
VIVOS_F(%)	0,082	593,6	449	VIVOS_R(%)	0,49	596,1	449
MT_F2 (%)	0,011	688,6	513	MT_R2 (%)	0,085	692,1	513
MP_F2 (%)	0,017	689,4	513	MP_R2 (%)	0,031	690,4	513
VCL_F (µm/s)	0,12	692,7	513	VCL_R (µm/s)	0,47	694,6	513
VSL_F (µm/s)	0,10	692,4	513	VSL_R (µm/s)	0,23	693,7	513
VAP_F (µm/s)	0,11	692,6	513	VAP_R (µm/s)	0,30	694,1	513
LIN_F (%)	0,56	694,8	513	LIN_R (%)	0,12	692,8	513
STR_F (%)	0,59	694,9	513	STR_R (%)	0,24	693,8	513
WOB_F (%)	0,59	694,9	513	WOB_R (%)	0,14	693,0	513
ALH_F (µm)	0,81	695,1	513	ALH_R (µm)	0,054	691,4	513
BCF_F (Hz)	0,38	694,4	513	BCF_R (Hz)	0,22	693,6	513

\* Sesión: jornadas de preparación de dosis; Macho: identificación del macho; VIVOS: porcentaje de espermatozoides vivos; MT: porcentaje de espermatozoides móviles; MP: porcentaje de espermatozoides móviles progresivos; VCL: velocidad curvilínea; VAP: velocidad media del trayecto; VSL: velocidad lineal; STR: índice de rectitud; LIN: índice de linealidad; WOB: Índice de oscilación; ALH: amplitud del desplazamiento de la cabeza lateral; BCF: Frecuencia de batida de la cola. \*\* P-Wald: Probabilidad del test chi-cuadrado de Wald. Valores menores de 0,05 indican que el coeficiente en el modelo es diferente de 0 con una probabilidad mayor del 95%; AIC: criterio de información de Akaike; N: número de inseminaciones consideradas.

##### 4.1.2.2 Con varios efectos

Haciendo uso de las opciones para regresiones logísticas, es posible incluir un listado de efectos y que utilice procedimientos para selección de modelos paso a paso (STEPWISE), añadiendo (FORWARD) o quitando (BACKWARD) efectos con criterios estadísticos. Se planteó un modelo que incluía los efectos de sesión, macho y varios parámetros de calidad. El resultado, con cualquiera de los procedimientos

de selección de modelos (Tabla 7), arrojó como mejor el modelo de efectos fijos para estudiar la variable 'fertilidad' del eyaculado era el que incluía: sesión y VCL\_F.

Tabla 7. Modelos logísticos con varios efectos entre los factores de calidad de semen fresco y refrigerado (N=513 inseminaciones)

Efecto*	P-Wald**	AIC
Sesión	<0,0001	659,7
VCL_F ( $\mu\text{m/s}$ )	0,0002	
Sesión	<0,0001	660,4
VAP_F ( $\mu\text{m/s}$ )	0,0003	

\* Sesión: jornada de preparación de dosis; Macho: identificación del macho; VCL-F: velocidad curvilínea del semen fresco. \*\* P-Wald: Probabilidad del test chi-cuadrado de Wald. Valores menores de 0,05 indican que el coeficiente en el modelo es diferente de 0 con una probabilidad mayor del 95%; AIC: criterio de información de Akaike.

#### 4.1.2.3 Con efectos aleatorios

Se intentó encontrar el mejor modelo de regresión logística utilizando efectos fijos y aleatorios, en particular partiendo de los efectos que mejor comportamiento habían manifestado en los modelos con un solo factor o con varios. Finalmente, el modelo que mejor ajustó fue con el efecto aleatorio sesión y con la variable de calidad VCL\_F.

Tabla 8. Modelos logísticos mixtos con varios efectos entre los factores de calidad de semen fresco y refrigerado (N=513 inseminaciones)

Efectos*	Covarianza**	
sesión – aleatorio	0,4243	0,4370
<b>P-Wald</b>		
VAP_F ( $\mu\text{m/s}$ )	0,0024	-
VCL_F ( $\mu\text{m/s}$ )	-	0,0020
<b>Criterios</b>		
AIC	184,3	183,8
BIC	184,9	184,4

\* Sesión: jornada de preparación de dosis; VCL\_F: velocidad curvilínea en semen fresco; VAP\_F: velocidad media del trayecto en semen fresco. \*\* Covarianza: estimación de la varianza asociada al efecto aleatorio; P-Wald: Probabilidad del test chi-

cuadrado de Wald. Valores menores de 0,05 indican que el coeficiente en el modelo es diferente de 0 con una probabilidad mayor del 95%; AIC: criterio de información de Akaike; BIC: criterio de información de Schwartz.

## 4.2 Variables con información de las hembras

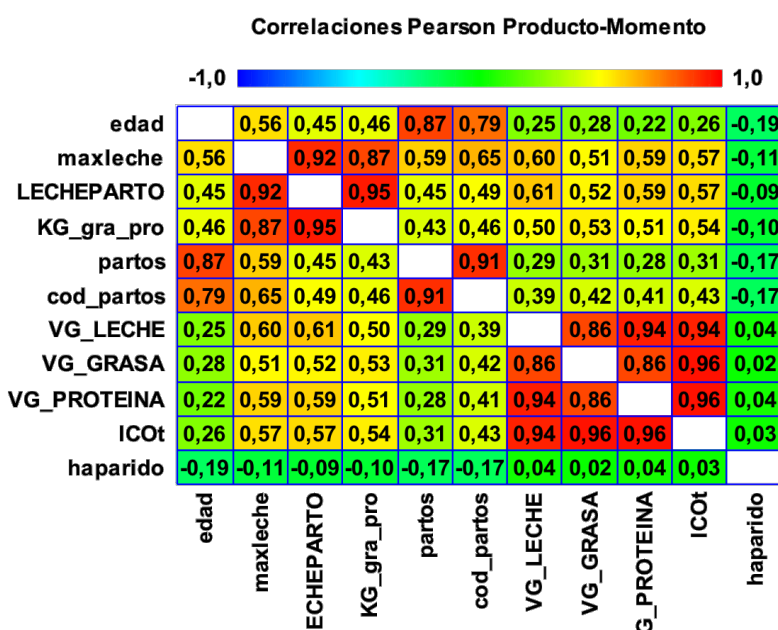
### 4.2.1 Descriptivo

Tabla 9. Análisis descriptivo de variables relacionadas con las hembras

Efectos*	Media	Max	Min	CV(%)	N
Edad (días)	1425	4372	252	45	541
Maxleche (kg leche)	604	1397	198	39	541
Lecheparto (kg leche)	483	1011	109	31	541
KG_gra_pro (kg)	41	80,4	10,5	32	541
VG_leche (kg leche)	34,6	175	-75,1	121	330
VG_grasa (kg grasa)	1,48	7,1	-3,9	124	330
VG_proteina (kg proteína)	1,23	5,3	-1,9	113	330
ICOt	9,47	40,8	-20,7	118	330

\* Edad: edad de la cabra al ser inseminada; maxleche: leche total en la mejor lactación de la cabra inseminada; LECHEPARTO: suma de la producción de las lactaciones de la cabra inseminada dividido por el número de lactaciones; KG\_gra\_pro: Suma de las producciones de Kg de grasa y proteína de las lactaciones de la cabra inseminada dividida entre el número de lactaciones en las que produjo); VG\_LECHE: valor genético de la hembra para producción de leche; VG\_GRASA: Valor genético para cantidad de grasa producida por lactación; VG\_PROTEÍNA: Valor genético para cantidad de proteína producida por lactación; ICOT: Índice de producción y morfología.

En la Tabla 9 se presenta una descripción de los datos de las hembras que se van a utilizar para intentar relacionarlas con su fertilidad a la inseminación. Como se puede observar, las hembras inseminadas son muy diversas, por ejemplo las edades incluyen desde hembras con menos de una año hasta animales de 12 años (del parto 1 al 11). También se observan variaciones importantes en producciones (por ejemplo entre 101 y 1011 kg de leche de promedio por lactación). También hay diferencias en los valores genéticos, con rangos de 250 kg de leche, 11 kg de grasa y 7,2 kg de proteína por lactación. Aparentemente estos valores son mucho más variables que el resto, pero ello es debido a la manera de calcular el CV, que da problemas cuando las variables tienen valores medios cercanos a cero.



\* Edad: edad de la cabra al ser inseminada; maxleche: leche total en la mejor lactación de la cabra inseminada; LECHEPARTO: suma de la producción de las lactaciones de la cabra inseminada dividido por el número de lactaciones; KG\_gra\_pro: Suma de las producciones de Kg de grasa y proteína de las lactaciones de la cabra inseminada dividida entre el número de lactaciones en las que produjo; partos: número de parto de la hembra inseminada; cod\_partos: efecto codificado de número de parto (se codificó como (1, 2, 3 y más de 3); VG\_LECHE: valor genético de la hembra para producción de leche; VG\_GRASA: Valor genético para cantidad de grasa producida por lactación; VG\_PROTEÍNA: Valor genético para cantidad de proteína producida por lactación; ICOT: Índice de producción y morfología; haparido: valores 1 y 0 en función de si parió o no la cabra inseminada.

Figura 4. Correlación entre las variables con información de las hembras

Se observaron correlaciones altas (0,79-0,87), lógicas, entre edad y número de partos (o valor codificado de partos, cod\_partos). Aparecieron correlaciones elevadas entre las variables de dos grupos:

- Relacionadas con la producción: maxleche, LECHEPARTO y KG\_gra\_pro (0,87-0,95).
- Evaluaciones genéticas: VG\_LECHE, VG\_GRASA, VG\_PROTEINA (0,86-0,96), puesto que cantidad de grasa y proteína se relacionan con cantidad total de leche y para calcular la variable ICOT se utilizan las anteriores variables linealmente.

## 4.2.2 Regresiones logísticas con factores de información de las hembras

### 4.2.2.1 Con un solo efecto

De acuerdo con los resultados de la Tabla 10, aparecieron como variables explicativas cuando se incluyeron aisladamente y de una en una, la sesión, la edad, el número de partos (o el codificado cod\_partos) y los efectos relacionados con producción (Maxleche, LECHEPARTO, KG\_gra\_pro). Sin embargo, no parece que los efectos relacionados con la evaluación genética expliquen las observaciones de fertilidad.

Tabla 10. Modelos logísticos con un solo efecto con información de las hembras

<b>Efecto incluido*</b>	<b>P-Wald**</b>	<b>AIC</b>	<b>N</b>
Sesión	<0,0001	<b>706,0</b>	541
Macho	0,048	731,3	541
Edad (días)	<0,0001	715,9	541
Maxleche (kg leche)	0,011	728,5	541
LECHEPARTO (kg leche)	0,031	730,3	541
KG_gra_pro (kg leche)	0,023	729,8	541
Partos	0,0001	719,4	541
cod_partos	0,0003	719,1	541
R_transporte	0,42	734,3	541
SPZ	0,88	735,0	541
Cod_esponja	0,20	733,4	541
VG_LECHE (kg leche)	0,52	459,6	330
VG_GRASA (kg grasa)	0,77	459,9	330
VG_PROTEINA (kg proteína)	0,44	459,4	330
ICOt	0,58	459,7	330

\* Sesión: jornadas de preparación de dosis; Macho: identificación del macho; Edad: edad de la cabra al ser inseminada; maxleche: leche total en la mejor lactación de la cabra inseminada; LECHEPARTO: suma de la producción de las lactaciones de la cabra inseminada dividido por el número de lactaciones; KG\_gra\_pro: Suma de las producciones de Kg de grasa y proteína de las lactaciones de la cabra inseminada dividida entre el número de lactaciones en las que produjo; partos: número de parto de la hembra inseminada; cod\_partos: efecto codificado de número de parto (se codificó como (1, 2, 3 y más de 3));R-transporte: sistema de refrigeración (en laboraotrio o in itinere); SPZ: cantidad de espermatozoides, 140 o 280 millones de espermatozoides; Cod\_esponja: efecto con dos niveles relativos a limpieza o no de la esponja de progestágeno en el momento de su retirada; VG\_LECHE: valor genético de la hembra para producción de leche; VG\_GRASA: Valor genético para cantidad de grasa producida por lactación; VG\_PROTEÍNA: Valor genético para cantidad de proteína producida por lactación; ICOT: Índice de producción y morfología. \*\* P-Wald: Probabilidad del test chi-cuadrado de Wald. Valores menores de 0,05 indican que el coeficiente en el modelo es diferente de 0 con una probabilidad mayor del 95%; AIC: criterio de información de Akaike.

Tampoco se observó efecto ni del método de refrigeración (baño programable frente a refrigeración in itinere) ni de la cantidad de espermatozoides por pajueta

(140 frente a 280 millones de espermatozoides inseminados), ni de la limpieza o no de la esponja.

#### 4.2.2.2 Con varios efectos

Haciendo uso de las opciones de los programas estadísticos para regresiones logísticas con variables numéricas y efectos fijos, es posible incluir un listado de efectos y que se ejecute la selección de los mejores modelos paso a paso (STEPWISE), añadiendo (FORWARD) o quitando (BACKWARD) efectos con criterios estadísticos. Se planteó un modelo que incluía los efectos: sesión, macho, edad, cod\_partos y maxleche (no se incluyó LECHEPARTO y KG\_gra\_pro por su alta correlación con maxleche y porque maxleche era el efecto que explicaba más de los tres en los modelos con un solo factor). El resultado (Tabla 11), con cualquiera de los procedimientos de selección de modelos arrojó como mejor el modelo de efectos fijos para estudiar la variable ‘haparido’ el que incluía: sesión, macho y edad.

Tabla 11. Modelos logísticos con varios factores de información de las hembras

Efecto*	P-Wald**	AIC	N
SESSION	<0,0001	699,85	541
edad	0,021		
MACHO	0,042		

\* Sesión: jornadas de preparación de dosis; Macho: identificación del macho; Edad: edad de la cabra al ser inseminada \*\* P-Wald: Probabilidad del test chi-cuadrado de Wald. Valores menores de 0,05 indican que el coeficiente en el modelo es diferente de 0 con una probabilidad mayor del 95%; AIC: criterio de información de Akaike.

#### 4.2.2.3 Con efectos aleatorios

Sin embargo, tiene mucho más sentido plantear que los efectos de SESSION y MACHO sean considerados aleatorios. Al expresar los datos individualmente por hembra, hay un efecto repetido de macho dentro de sesión, además de macho entre sesiones. Se testaron diferentes modelos mixtos con sesión y macho dentro de sesión como aleatorios (ver anexo Tablas 1.1 y 1.2 ). Los modelos con mejor ajuste combinando efectos aleatorios y efectos fijos edad o cod\_partos se muestran

en la Tabla 12, resultando mejor con el efecto aleatorio sesión y con el efecto cod\_partos.

Tabla 12. Dos modelos logísticos mixtos con información de las hembras (N=541)

<b>Efecto *</b>	<b>Covarianza*</b>	
sesión-aleatorio	0,0131	0,0132
residual	0,2209	0,2228
<b>P Wald</b>		
Edad (días)	0,0008	-
cod_partos	-	0,037
<b>Criterios</b>		
AIC	759,9	755,7
BIC	761,1	756,9

\* Sesión: jornadas de preparación de dosis, considerado como efecto aleatorio; \*\* Covarianza: estimación de la varianza asociada al efecto aleatorio; P-Wald: Probabilidad del test chi-cuadrado de Wald. Valores menores de 0,05 indican que el coeficiente en el modelo es diferente de 0 con una probabilidad mayor del 95%; AIC: criterio de información de Akaike; BIC: criterio de información de Schwartz.

### 4.3 ANALISIS CONJUNTO

Se realizaron análisis con la información conjunta, tanto la obtenida en el laboratorio para evaluar la calidad seminal como los datos correspondientes a las hembras inseminadas. Se combinaron efectos aleatorios (sesión, macho y macho dentro de sesión) y otros efectos que participaban en los mejores modelos anteriormente ajustados, ya sea información de calidad de semen (VCL\_F y VAP\_F), o información relacionada con las hembras inseminadas (edad y cod\_partos).

Finalmente, los mejores ajustes se obtuvieron con un modelos parsimonioso, sencillo, con un solo efecto aleatorio, la sesión, y un solo efecto numérico, la velocidad curvilínea del semen fresco (VCL\_F) (ver Tabla 13). En el anexo (Tabla 1.3) se presentan también otros modelos.

Tabla 13. Cuatro modelos mixtos de regresión logística con varios factores de información, tanto de la calidad del eyaculado como de las hembras inseminadas, con efectos numéricos (VCL\_F o VAP\_F) y aleatorios (sesión y macho dentro de sesión) con parámetros de ajuste (AIC y BIC) (N=502 registros)

<b>Efecto</b>	<b>Covarianzas</b>			
Sesion	0,0229	0,0223	0,0232	0,0228
Macho(sesión)	0,0020	0,0029	-	-
Residual	0,2154	0,2149	0,2169	0,2171
<b>P-Wald</b>				
VCL_F	0,0038	-	0,0025	-
VAP_F	-	0,0048	-	0,0028
<b>Criterios</b>				
AIC	697,4	697,6	695,5	695,8
BIC	699,1	699,3	696,6	696,9

\* Sesión: jornadas de preparación de dosis; Macho: identificación del macho; VCL\_F: velocidad curvilínea en semen fresco; VAP\_F: velocidad media del trayecto en semen fresco. \*\* Covarianza: estimación de la varianza asociada al efecto aleatorio; P-Wald: Probabilidad del test chi-cuadrado de Wald. Valores menores de 0,05 indican que el coeficiente en el modelo es diferente de 0 con una probabilidad mayor del 95%; AIC: criterio de información de Akaike; BIC: criterio de información de Schwartz



## 5. DISCUSIÓN

Una de las bases en las que descansa un programa de mejoramiento genético en caprinos lecheros es la IA, siendo su uso limitado, ya que se estima que en el ganado caprino lechero sólo se insemina el 1% de la cabaña total a nivel nacional (López-Sebastián, 2014), llegando al 5% del censo en el seno de las asociaciones (Arrébola, 2013). Este uso tan limitado de la IA ralentiza y compromete el avance de los programas de mejora genética, debido a que se retrasa la obtención de la evaluación genética de los machos que se encuentran en prueba. Por este motivo, es necesario incrementar el uso de la IA en el caprino lechero, hecho que repercutirá positivamente en el avance de los programas de mejora genética, en la productividad de las explotaciones y en la calidad de los productos obtenidos, garantizando la sostenibilidad del sector.

La calidad del semen fresco y de las dosis de semen refrigerado utilizadas en este estudio es elevada y la fertilidad obtenida fue del 59,3%, valor próximo a los valores medios de 2017 en las asociaciones nacional y española (MURCIGRAN (2018), comunicación personal). Con respecto a los porcentajes de espermatozoides móviles totales y móviles progresivos obtenidos para el semen fresco y refrigerado, los resultados son similares a los observados en trabajos previos para esta especie (Barbas et al., 2018; Konyali et al., 2013; Lopera-Vásquez, 2009; Santiago-Moreno et al., 2017; Xu et al., 2009). Por otra parte no hay demasiados trabajos en caprino donde se hayan estudiado los parámetros cinéticos. En este caso, nuestros resultados para algunos de los parámetros cinéticos del semen fresco son inferiores (VCL, VAP y ALH) y para el resto de parámetros son superiores a los observados por Barbas et al. (2018) en raza Serrana Portuguesa. Por otra parte, los parámetros cinéticos observados en nuestro estudio para el semen refrigerado son en general superiores a los observados en un trabajo previo en raza caprina Malagueña (Santiago-Moreno et al., 2017). Estas diferencias entre trabajos pueden ser debidas a diferencias en el protocolo seguido para evaluar la motilidad (concentración de espermatozoides, diluyente o cámara de recuento celular utilizados), diferencias en

el software utilizado o diferencias entre razas, ya que todos estos factores influyen en las medidas obtenidas (Yeste et al., 2018).

Similarmente a lo observado en estudios previos realizados con la misma raza, el mismo diluyente y el mismo protocolo de preparación de dosis de inseminación, el porcentaje de espermatozoides vivos resultó mas bajo que el de espermatozoides móviles totales (Lopera-Vásquez, 2009). Este resultado podría deberse al efecto negativo de las lipasas del plasma seminal puesto que estos enzimas hidrolizan triglicéridos presentes en la leche y producen algunos metabolitos (como el ácido oleico) tóxicos para los espermatozoides de caprino (Pellicer-Rubio y Combarous, 1998). Aunque no se demoró en exceso el análisis del semen fresco una vez que el semen había sido diluido con el SM1 (tiempo transcurrido próximo a 1 h), a la temperatura de conservación de estas dosis (22-25 °C) sigue existiendo actividad enzimática. Es posible que la membrana plasmática sea más vulnerable a estos efectos tóxicos que la motilidad, hecho que explicaría la diferencia existente entre ambos parámetros. Por otra parte, en el caso del semen refrigerado esta diferencia entre espermatozoides móviles totales y vivos puede también deberse al efecto perjudicial que tiene la disminución de la temperatura sobre la estructura y la funcionalidad de la membrana plasmática (revisado por Mocé et al., 2010). En este sentido, algunos autores indicaron que las membranas plasmáticas y acrosómicas son más vulnerables al proceso de enfriamiento que la motilidad, lo que explicaría esta diferencia entre ambos parámetros (revisado por Konyali et al., 2013).

La motilidad es una de las características más importantes asociadas con la capacidad de fecundación de los espermatozoides (Kathiravan et al., 2011; Nagy et al., 2015) y por ese motivo es importante su evaluación. En nuestro estudio, observamos una correlación media en la motilidad (total y progresiva) y algunos parámetros cinéticos (BCF, LIN, STR o WOB) entre el semen fresco y refrigerado. Esto posiblemente sea debido a que algunos eyaculados soportan mejor el proceso de refrigeración que otros como ya fue demostrado por otros autores (Holt, 2000; Lopera-Vásquez, 2009), y esto se refleja tanto en el porcentaje de espermatozoides que resisten el proceso (móviles totales) como en la calidad del movimiento de los

espermatozoides supervivientes. Por otra parte, también podría deberse a diferencias entre eyaculados en la concentración de lipasas en el plasma seminal, que determinarían una mayor o menor producción de metabolitos tóxicos para los espermatozoides (Hartwig et al., 2014) y, por tanto, una mayor o menor calidad de las dosis de semen ya que estos metabolitos provocan una disminución de la motilidad y deterioro de la calidad de ese movimiento.

Los valores medios de producción lechera de las cabras inseminadas en este estudio (LECHEPARTO de 483 kg por lactación) son similares a las medias de producción que aparecen en las páginas del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2018), para cabras de raza Murciano Granadina, y de la Asociación Española de Criadores de la Cabra Murciano-Granadina (ACRIMUR, 2018), cuando se expresan conjuntamente para primíparas y múltiparas.

En nuestro trabajo, varios efectos relacionados con las cabras presentaron un efecto significativo sobre la fertilidad al ser estudiados por separado. El efecto sesión incluye muchos factores que no se pueden distinguir por separado tales como la granja, el estado y manejo de las cabras antes, durante y después de la inseminación, la calidad de la sincronización de los celos o la calidad del proceso de inseminación, entre otros. Es lógico que este factor presente un efecto muy significativo sobre la fertilidad puesto que en la fertilidad no sólo influye el macho y la calidad de los espermatozoides, sino que en ella también influyen factores relacionados con las hembras y con el manejo que tienen la misma o mayor importancia (Graham y Mocé, 2005).

Por otra parte, en nuestro trabajo también se observa que el macho influye sobre la fertilidad de las hembras, lo que corrobora observaciones previas (para una revisión, ver Amann et al., 2018). La edad de las cabras también influye sobre la fertilidad, la fertilidad es mas alta en cabras de 3 a 6 años (Arrébola et al., 2007), así como el número de partos o algunas variables de producción de leche (máximo de leche, producción de leche por parto o los kg de grasa producidos). Estos resultados son similares a los obtenidos en un estudio previo con raza caprina Payoya (Arrébola et

al., 2007), en el que se observó que la edad, número de parto y producción de leche (entre otros factores) están correlacionados con la fertilidad.

Por otra parte, algunos factores no tuvieron un efecto sobre la fertilidad. Así, el tipo de refrigeración realizado (en baño o *in itinere*) no influye sobre la fertilidad obtenida. Este resultado es lógico considerando que la calidad de las dosis seminales es muy similar entre ambos sistemas (64,5% y 72,3% móviles totales, 43,2% y 45% móviles progresivos y 48,7% y 64,3% espermatozoides vivos para las dosis refrigeradas en el baño programable y las refrigeradas *in itinere*, respectivamente; Mocé et al., 2018, comunicación personal).

Por otra parte, el número de espermatozoides inseminados no tuvo efecto sobre la fertilidad. Este resultado puede parecer sorprendente considerando que existen diferencias entre machos en cuanto al número mínimo de espermatozoides necesarios para obtener una fertilidad máxima (revisado por Amann et al., 2018). No obstante, también se ha demostrado en varias especies que, si bien es cierto que el número de espermatozoides inseminados afecta a la fertilidad y que la fertilidad es directamente proporcional al número de espermatozoides inseminados, existe un número máximo de espermatozoides por encima del cual no aumenta más la fertilidad porque ha llegado a su límite (Amann et al., 2018). Posiblemente a la dosis de  $140 \times 10^6$  espermatozoides utilizada en nuestro trabajo ya se ha alcanzado la fertilidad máxima y por este motivo no se observa un efecto beneficioso al duplicar la dosis de inseminación por hembra.

Con respecto al estado de la esponja, posiblemente no influyó sobre los resultados de fertilidad porque, en general, no hayan provocado procesos infecciosos graves a nivel reproductivo (vaginitis). Por otra parte, la eliminación del moco cervical antes de la IA puede ser otro factor determinante en la salud del tracto reproductivo femenino ya que este moco acumula productos bacterianos e inflamatorios que pueden afectar a la viabilidad espermática (Manes y Ungerfeld, 2015). Se ha observado que el moco cervical afecta de manera negativa la fertilidad de los espermatozoides (revisado por Muzaffer et al., 2007).

Muchos autores han resaltado la dificultad que representa encontrar o desarrollar un análisis de laboratorio con capacidad de predecir la capacidad fecundante de las dosis debido al gran número de factores que influyen sobre este parámetro (para una revisión, ver Graham y Mocé, 2005; Amann y Hammerstedt, 2002). Así, el hecho de que las dosis comerciales incluyan un número de espermatozoides elevado garantiza que la fertilidad sea elevada en las granjas pero también enmascara aquellos eyaculados o machos subfértiles lo que supone un problema cuando se quiere analizar la fertilidad individual de los machos (Lavara et al., 2005). Por otra parte, con la preselección de los eyaculados se consigue que los resultados de fertilidad sean más homogéneos, pero nuevamente esta selección provoca un sesgo que complica la determinación del efecto de la calidad del semen sobre la fertilidad, debido a que la calidad de los eyaculados que se inseminan es poco variable.

Por ello, no es extraño que los modelos y los efectos que más influyen sobre el carácter fertilidad sean también distintos entre los trabajos. Generalmente en todos los trabajos se observan correlaciones entre alguna de las velocidades y la fertilidad. De todos los modelos estudiados, los mejores ajustes en este trabajo se obtuvieron con un modelo con un solo efecto aleatorio, la sesión, y un solo efecto numérico, la velocidad curvilínea (VCL) del semen fresco. También en otras especies, VCL (en ovino, Santolaria et al., 2015) o VCL junto con el porcentaje de espermatozoides móviles totales y móviles progresivos (en porcino, Broekhuijse et al., 2011) son las variables con mayor capacidad predictiva de la fertilidad. No obstante, otros autores han observado que es la velocidad media (VAP) la que más se correlaciona con la fertilidad del semen crioconservado en caprino (Furstoss et al., 2010) y vacuno (Nagy et al., 2015) o en semen refrigerado en ovino (Vicente-Fiel et al., 2014).

Por último, es necesario destacar que en muchos estudios no se considera la sesión como efecto. Sin embargo, en este trabajo es evidente que el efecto sesión es el factor que más influye sobre la fertilidad. Éste es un efecto ambiental que es difícil de controlar porque incluye múltiples factores, tal y como ha sido previamente

expuesto. El predominio del efecto sesión, complica todavía más el encontrar un análisis de laboratorio con capacidad predictiva de la fertilidad de las dosis de semen en granja.

## **7. CONCLUSIONES**

1.- Aparentemente, algunos parámetros de calidad se relacionan con la fertilidad cuando se estudian aisladamente: motilidad total en fresco y motilidad progresiva en fresco y en refrigerado. Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides vivos no era significativo, en nuestras condiciones. Al incluir varios efectos conjuntamente en los modelos de análisis, en especial macho o sesión, desaparece ese efecto de los parámetros anteriores, siendo sustituidos por las velocidades curvilínea (VCL\_F) y media (VAP\_F) del semen fresco.

2.- El mejor de los modelos utilizando parámetros de calidad fue el que incluyó el efecto sesión como aleatorio y la velocidad curvilínea.

3.- Asimismo, varios de los factores relativos a las características de las hembras se relacionan con la fertilidad cuando se estudian aisladamente: edad, número de parto y producción de leche, grasa y proteína. No obstante, en nuestras condiciones, no se observó efecto del número total de espermatozoides inseminados, ni del sistema de refrigeración, ni de los valores genéticos para los diferentes caracteres. Al incluir varios efectos, en especial sesión y macho, sólo permanecen como explicativos los efectos de edad y partos.

4.- El mejor de los modelos con información de las hembras incluyó el efecto aleatorio sesión y el efecto fijo partos, codificado con cuatro niveles.

5.- Al utilizar toda la información, tanto de parámetros de calidad del semen como de características de las hembras, el mejor modelo incluyó sesión como efecto aleatorio y la velocidad curvilínea del semen fresco.

6.- Pese a todo ello, los modelos explicativos de la fertilidad no son satisfactorios, puesto que hay mucha variación que no queda explicada pese a todos los efectos considerados en este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS:**

A Dios por la fuerza que nos da para superar con fortaleza las metas que nos proponemos.

A mi familia, por el apoyo incondicional que me han brindado.

A mi Directores: Eva Mocé Cervera y Ernesto A. Gómez, por su dedicación, paciencia y enseñanza a lo largo de este proyecto.

A todas aquellas personas que han contribuido a lo largo de mi formación.

El autor agradece a los ganaderos y al personal técnico (muy especialmente a Carlos Vicente y a Salvador A. Lozano Palazón) de las asociaciones AMURVAL y ACRIMUR por suministrar los animales de la raza Murciano-Granadina y los datos relativos a las hembras, la ayuda de José Bernácer, Mar Martínez y Antonio Escrig en las extracciones de semen, la preparación de las dosis seminales y la evaluación de la calidad seminal de las dosis y la financiación recibida por el INIA co-financiado con fondos FEDER (RTA2013-0107-C03-01 y RTA2017-00049-C02-01, Madrid, España).



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- ACRIMUR. 2018 (Asociación Española de Criadores de la Cabra Murciano-Granadina). Acceso <http://www.acrimur.es> en septiembre 2018.
- Amann R.P., Hammerstedt RH. 2002. Detection of differences in fertility. *J. Androl.* 23: 317-325.
- Arrébola F., González, O, Torres, R, Forcada. F y Abecia. J.A. FACTORES QUE AFECTAN LA FERTILIDAD TRAS INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN LA RAZA CAPRINA PAYOYA. AIDA (2011), XIV Jornadas sobre Producción Animal, Tomo I, 341-343.
- Arrébola F.A. 2013. Reproducción asistida en ganado caprino, En: Foro INIA sobre “Manejo de caprino rentable”. Acceso <http://wwwsp.inia.es/Investigacion/OtrasUni/TransferenciaTecnologia/Foro/sINIA/Mcaprino/Lists/Ponencias/Attachments/4/04%20Francisco%20A%20A%20rrebola.pdf> en septiembre 2018.
- Barbas J.P., Leahy T, Horta AE, García-Herreros M. 2018. Sperm kinematics and subpopulational responses during the cryopreservation process in caprine ejaculates. *Cryobiology* 82: 137-147.
- Broekhuijse M. L. W. J., E. Ssosstaricc, H. Feitsma, and B. M. Gadella. 2012. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *J. Anim. Sci.* 90:779–789.
- Brun J.M., Theau-Clément M., Bolet G. 2002. The relationship between rabbit semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 70:139–149.
- DeJarnette J. M., R. G. Saacke, J. Bame, and C. J. Vogler. 1992. Accessory Sperm: Their Importance to Fertility and Embryo Quality, and Attempts to Alter Their Numbers in Artificially Inseminated Cattle. Department of Dairy Science, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg 24061. *J. Anim. Sci.* 70:484-491.
- Dorado J., D. Acha, I. Ortiz, M.J. Gálvez, J.J. Carrasco, B. Díaz, V. Gómez-Arrones, R. Calero-Carretero, M. Hidalgo. 2013. Relationship between conventional semen characteristics, sperm motility patterns and fertility of Andalusian

- donkeys (*Equus asinus*). *Animal Reproduction Science* 143: 64–71.
- Furstoss V., Borderes Y., Forgerit, P. Guillouet, B. Leboeuf. 2010. The value of the percentage of motile sperm in predicting a significant portion of the fertility variation of frozen-thawed buck semen. *Science Direct Theriogenology* 74:1197–1206.
- Graham J.K., Mocé E. 2005. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* 64:492–504.
- Graham J.K. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science* 68:239–247.
- Hartwig F.P., F.P. Lisboa , F.P. Hartwig , G.A. Monteiro , R.R.D. Maziero, C.P. Freitas-Dell'Aqua , M.A. Alvarenga , F.O. Papa, J.A. Dell Aqua Jr. 2014. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology* 81:340–346.
- Holt W.V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53:47-58.
- Kathiravan P., J Kalatharan, G Karthikeya, K Rengarajan and G Kadirvel. 2011. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System-A Review. *Reprod. Dom. Anim.* 46:165–172.
- Kohnke D., Lagriffou, Praud, Plouarboué, Degond, Druart, 2015. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Animal Reproduction Science* 161:75–81.
- Konyali C., Tomás C., Blanch E., Gómez E.A., Graham J.K., Mocé E. 2013. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology* 67:124-131.
- Leboeuf B., B. Restall, S. Salamon. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62:113–141.
- Leboeuf B., Delgadillo J.A., Manfredi E., Piacère A., Clement V., Martin P., Pellicer-Rubio M.T., Boué P., de Cremoux R. 2008. Place de la maîtrise de la reproduction dans les schémas de sélection en chèvres laitières. *INRA Prod. Anim.* 21: 391-402.

- Lopera Vásquez R. 2009. Estudio de factores que influyen en la fecundación in vitro heteróloga entre espermatozoides de caprino y oocitos de vacuno madurados in vitro. Tesis de Máster, Universidad Politécnica de Valencia.
- López-Gatius F. 2012. Factors of a noninfectious nature affecting fertility after artificial insemination in lactating dairy cows. A review. *Theriogenology* 77:1029–1041.
- Manes J., Ungerfeld R. 2015. Estrous synchronization with intravaginal devices in sheep and goats : alterations in vaginal environment and its relation with fertility. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 39:104-108.
- MAPAMA. 2018 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). Acceso a [https://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/autoctona-fomento/caprino/murciano-granadina/datos\\_productivos.aspx](https://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/autoctona-fomento/caprino/murciano-granadina/datos_productivos.aspx) en septiembre 2018.
- Martínez-Pastor F., E. Tizado, J. Garde, A. de Paz. 2010 Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Science Direct Theriogenology* 75:783–795.
- Menchaca A., Rubianes E. 2007. Pregnancy rate obtained with short-term protocol for timed artificial insemination in goats. *Reprod. Domest. Anim.* 42:590-593.
- Mocé E., Graham J.K. 2006. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *J. Anim. Sci.* 84:826-833.
- Mocé E., J.K. Graham. 2008. *In vitro* evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science* 105:104–118.
- Mocé E., Blanch E, Tomás C, Graham JK. 2010. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reprod. Domest. Anim.* 45:57-66.
- Muzaffer T., Suleyman Bacinoglu, U mu t Cirit, O zen Banu O zdas , Kemal Ak. 2007. Relationship between bovine fertility and the number of spermatozoa penetrating the cervical mucus within straws. *Animal Reproduction Science* 101:18–27.
- Nagy A., Tassos Polichronopoulos, András Gáspárdy, László Solti and Sándor Cseh. 2015. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters

- generated by computer-assisted semen analysis. *Acta Veterinaria Hungarica* 63(3):370–381.
- Pellicer M.T. -Rubio, Combarrous Y. 1998. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *J. Reprod. Fertil.* 112:95 – 103.
- Petrunkina A.M., Harrison R.A.P. 2010. Systematic misestimation of cell populations by flow cytometry: a mathematical analysis. *Theriogenology* 73:839-847.
- Petrunkina A.M., Waberski D., Bollwein H., Sieme H. 2010. Identifying non-sperm particles during flow cytometric physiological assessment: a simple approach. *Theriogenology* 73:995-1000.
- Rupert P., Amann, Richard G. Saacke, Guy F. Barbato, and Dagmar Waberski. 2018. Measuring Male-to-Male Differences in Fertility or Effects of Semen Treatments. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 6(5):1–32.
- Santiago-Moreno J., Estes MC, Castaño C, Toledano-Díaz A, Delgadillo JA, López-Sebastián A. 2017. Seminal plasma removal by density-gradient centrifugation is superior for goat sperm preservation compared with classical sperm washing. *Animal Reproduction Science* 181:141-150.
- Santolaria P., S. Vicente-Fiel, I. Palacín, E. Fantova, M.E. Blasco, M.A. Silvestre, J.L. Yániz. 2015. Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction Science* 163:82–88.
- Sharon T., Mortimer. 2000. CASA—Practical Aspects. *Journal of Andrology.* July/August 2000.
- Silvestre M.A., Salvador I., Sánchez J.P., Gómez E.A. 2004, Effect of changing female stimulus on intensive semen collection in young Murciano-Granadina male goats. *J. Anim. Sci.* 82:1641-1645.
- Vicente-Fiel S., I. Palacín, P. Santolaria, E. Fantova, F.J. Quintín-Casorrán, E. Sevilla-Mur, J.L. Yániz. 2014. In vitro assessment of sperm quality from rams of high and low field fertility. *Animal Reproduction Science* 146:15–20.
- Yeste M., Bonet S, Rodríguez-Gil JE, Rivera del Álamo MM. 2018. Evaluation of sperm motility with CASA-Mot: which factors may influence our measurements? *Reprod. Fertil. Dev.* 30:789-798.

ANEXO

Tabla 1.1 Seis modelos logísticos mixtos combinando efectos aleatorios y la edad de la hembra (N=541)

Efecto		Covarianza				
sesión-aleatorio	0,0131	0,0124	0,0135	0,0127	-	-
macho-aleatorio	-	-	0,0016	0,0005	-	0,0005
macho(sesión)-aleatorio	-	0,0028	-	0,0023	0,0166	-
residual	0,2209	0,2188	0,2197	0,2188	0,2176	0,2333
P Wald						
Edad	0,0008	0,0011	0,0014	0,0013	0,0005	<0.0001
Criterios						
AIC	759,9	761,65	761,72	763,6	766,7	775,5
BIC	761,1	763,57	763,64	766,2	771,1	776,6

Tabla 1.2 Seis modelos logísticos mixtos combinando efectos aleatorios y cod\_partos de la hembra (N=541)

Efectos		Covarianzas				
sesión-aleatorio	<b>0,0132</b>	0,0138	0,0129	0,0135	-	-
macho-aleatorio	-	0,0018	-	0,0014	-	0,0003
macho(sesión)-aleatorio	-	-	0,0021	0,0008	0,0145	-
residual	<b>0,2228</b>	0,2214	0,2212	0,2210	0,2210	0,2341
P-Wald						
cod_partos	<b>0,037</b>	0,059	0,047	0,0596	0,019	0,0003
Criterios						
AIC	<b>755,7</b>	757,5	757,6	759,5	762,8	768,3
BIC	<b>756,9</b>	759,4	759,5	762,0	767,2	769,4

Tabla 11. Ocho modelos logísticos mixtos con varios factores de información, tanto de la calidad del eyaculado como de las hembras inseminadas (N=502)

Efectos		Covarianzas						
sesion	0,0179	0,0173	0,0180	0,0175	0,0190	0,0183	0,0190	0,0184
macho(sesión)	0,0005	0,0014	-	-	0,00002	0,009	-	-
residual	0,2155	0,2150	0,2159	0,2161	0,2170	0,2166	0,2171	0,2173
P-Wald								
cod_partos	-	-	-	-	0,19	0,21	0,19	0,20
edad	0,015	0,016	0,015	0,014	-	-	-	-
VCL_F	0,010	-	0,009	-	0,010	-	0,0096	-
VAP_F	-	0,013	-	0,011	-	0,013	-	0,011
Criterios								
AIC	710,2	710,4	708,2	708,5	704,4	704,7	702,4	702,7
BIC	711,9	712,1	709,4	709,6	706,1	706,4	703,5	703,9

