

**UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE MONAGAS
ESCUELA DE ZOOTECNIA
MATURÍN - MONAGAS**



**COMPARACIÓN DE DOS DILUYENTES DE BASE TRIS
(Hidroximetilaminometano) SOBRE LA MOTILIDAD DEL SEMEN
CAPRINO CONGELADO-DESCONGELADO**

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO POR

**LUZARDO NAVA ADIRIMA DEL CARMEN
C.I: 4.516.911**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

Noviembre, 2010

ACTA DE APROBACION

COMPARACIÓN DE DOS DILUYENTES DE BASE TRIS
(Hidroximetilaminometano) SOBRE LA MOTILIDAD DEL SEMEN
CAPRINO CONGELADO-DESCONGELADO

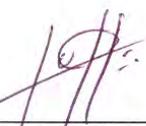
TRABAJO DE GRADO PRESENTADO POR:

ADÍRIMA DEL CARMEN LUZARDO NAVA

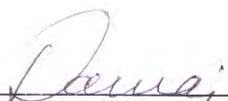
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE

INGENIERO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

APROBADO POR:



Prof. Luis Coronado
Asesor



Prof. Tomás Rodríguez
Jurado



Prof. Alejandro Correa
Jurado

DEDICATORIA

A mi madre

A esos dos soles que son mis hijos

A esa hermosa familia, mis 10 hermanos, y sus compañeros y compañeras de vida a mi tía

A toda esa constelación de sobrinos y primos bellos

A mi primo que nos fue arrebatado por la barbarie, quien seguirá viviendo dentro de nosotros

A la abuela paterna de mis hijos, a quien dios llamó a su lado

Para todas esas bellas personas que en el recorrido de la vida han conformado esa gama heterogénea que son mis amigos

AGRADECIMIENTO

Agradezco al CREADOR haber vivido para disfrutar este momento

A mis hijos y compañeros de estudio Orlando Antonio y María Benedicta que son mis mejores amigos y mi mayor apoyo en toda mi carrera y en la vida.

A la casa más alta, la UNIVERSIDAD DE ORIENTE núcleo Monagas, a todos sus profesores que tuvieron la paciencia y la entereza de enseñarme, a los técnicos de los laboratorios porque siempre tuvieron tiempo para atenderme, a las secretarías que en todo momento me atendieron con respeto y me escucharon, al personal de mantenimiento y limpieza a los choferes, a toda esa gente bella, en especial de la escuela de Zootecnia y agronomía con los que compartí y espero seguir compartiendo buenos momentos. A la coral universitaria que con sus voces nos trasladan a lo místico y sublime que tenemos dentro.

Agradezco a mi Asesor y a los profesores que son mi jurado, por su tiempo invertido para guiarme y consolidar mi trabajo de grado.

A todas esas bellas personas del Centro de Recría INIA Lara a su director, a las Caprilindas sin ellos no hubiese sido posible realizar esta investigación.

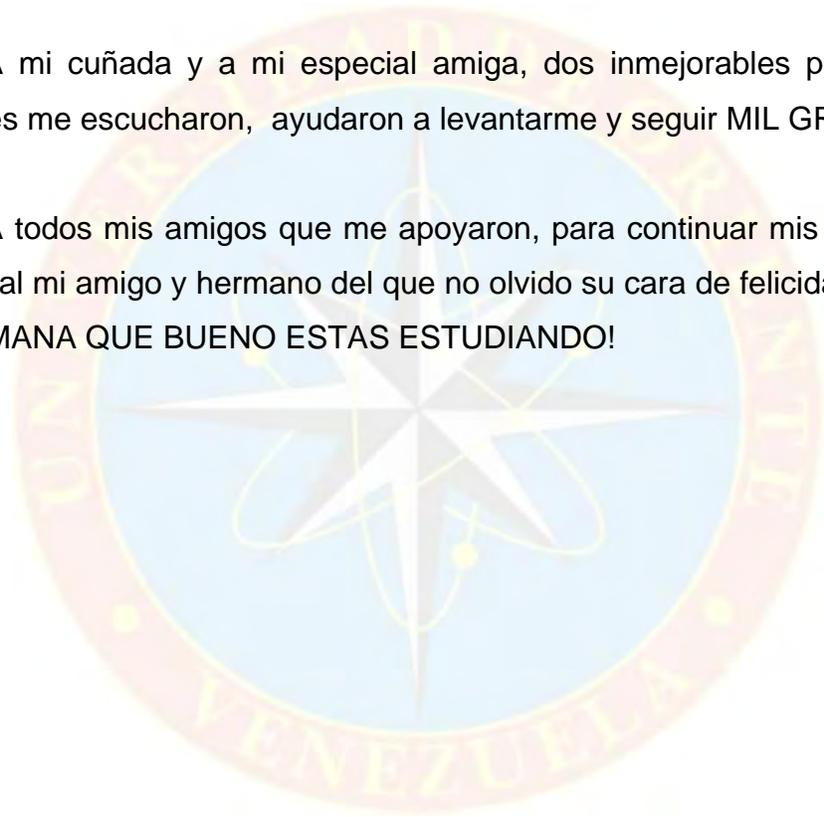
A las Hermanas Religiosas del Santo Ángel de Barquisimeto a mi amiga y hermana de siempre, gracias a todas por recibirme en su casa.

Un especial agradecimiento a TODOS LOS BACHILLERES con quien compartí las aulas de clase, con quienes nunca tuve barreras generacionales, siempre me hicieron sentir como uno de ellos, gracias MUCHACHOS DIOS ME LOS BENDIGA.

Al que fue mi compañero de vida

A mi cuñada y a mi especial amiga, dos inmejorables profesionales, quienes me escucharon, ayudaron a levantarme y seguir MIL GRACIAS

A todos mis amigos que me apoyaron, para continuar mis estudios, en especial mi amigo y hermano del que no olvido su cara de felicidad y su frase ¡HERMANA QUE BUENO ESTAS ESTUDIANDO!



ÍNDICE DE CONTENIDO

ACTA DE APROBACION	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS DEL TEXTO.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS DEL TEXTO.....	viii
RESUMEN.....	ix
SUMMARY	x
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
GENERAL	3
ESPECÍFICOS	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
BREVE RESEÑA HISTÓRICA DE LOS CAPRINOS EN VENEZUELA	4
INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.....	5
FACTORES DE VARIACIÓN DE LA PRODUCCIÓN ESPERMÁTICA EN CAPRINOS.....	8
MÉTODOS DE RECOLECCIÓN SEMINAL	9
MÉTODOS PARA CONGELAR SEMEN.....	16
PROCESO DE DESCOGELACIÓN DEL SEMEN.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS	19
ORIGEN Y MANEJO DE LOS MACHOS REPRODUCTORES	20
DISEÑO EXPERIMENTAL	28
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES FÍSICAS Y REPRODUCTIVAS DE LOS MACHOS CABRÍOS	29
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	34
CONCLUSIONES.....	34
RECOMENDACIONES	34
BIBLIOGRAFÍA	36
APÉNDICE	41
HOJAS METADATOS.....	46

ÍNDICE DE CUADROS DEL TEXTO

Cuadro N° 1. Evaluación preliminar de los machos cabríos.....	30
Cuadro N° 2. Valores de la evaluación espermática pre-congelación en machos cabríos (medias \pm DE).....	31



ÍNDICE DE FIGURAS DEL TEXTO

Figura 1. Morfología de un espermatozoide	8
Figura 2. Colecta de semen caprino con vagina artificial	25
Figura 3. Motilidad espermática individual post-congelación de semen caprino congelado con dos diluyentes en base TRIS.....	33



RESUMEN

El presente trabajo fue realizado con la finalidad de comparar el efecto de dos diluyentes de base TRIS (hidroximetilaminometano) Tris-yema (D1) y Triladyl® (D2) sobre la motilidad post-congelación, en la criopreservación de semen caprino. Se utilizaron 5 machos cabríos adultos, los cuales fueron evaluados con criterio zootécnico, a objeto de determinar sus aptitudes físicas y reproductivas para la recolección de semen. Los animales tenían condición corporal 3 y 4, la circunferencia escrotal varió desde 24,5 a 32cm. La recolección seminal se realizó con vagina artificial y se extrajeron tres muestras de semen no consecutivas por animal. Cada muestra de semen, fue evaluada antes de la congelación. De acuerdo a las evaluaciones realizadas, en el semen recolectado se observó coloraciones de blanco grisáceo y blanco amarillento, característicos de la especie, volúmenes de $1,1 \pm 0,7$ mL, porcentajes de motilidad individual de $83,6 \pm 8$ concentraciones espermáticas de $4.937,4 \pm 1.365,4 \times 10^6$ espz/mL. Cada muestra de semen fue dividida en dos partes iguales, para agregarles los diluyentes. Envasadas en pajuelas de 0,25mL, posteriormente fueron refrigeradas y congeladas en nitrógeno líquido. Antes de almacenarlas, se tomaron seis pajuelas por animal, tres por diluyente, se descongelaron a 37°C por 30 segundos. A las pajuelas descongeladas se les midió el porcentaje de motilidad individual post-congelación, a estos resultados se les calculó la media aritmética por diluyente, resultando 38,67% para D₁ y 35,33% para D₂. Se compararon por T-Student, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa entre los diluyentes.

Palabras clave: Semen caprino, diluyentes, motilidad

SUMMARY

This research was made with the purpose to compare the effect of two diluents of TRIS (hidroximetilaminometano) TRIS yema (D1) and Triladyl® (D2) on post freezing in the criopreservation of caprine semen. It was used 5 adults goats, which were evaluated by zotechnician criteria in order to determine its physical and reproductive aptitudes to semen gathering, these animals had a corporal condition 3 and 4, its scrotal circumference varied from 24.5 to 32 cms. The seminal gathering was made with artificial vagina and extracted three samples no consecutives by animal. Each sample of semen was evaluated before freezing. According to the made evaluation in the gathered semen it was observed colours from greyish white and yellowish white, characteristic of these species, volume of 1.1 ± 0.7 mL, percentages of individual motility of 83.6 ± 8 spermatic concentration of $4,937.4 \pm 1,365.4 \times 10^6$ spermatozoa/mL. Each semen sample was divided into equal parts to added the diluents. Then it was packed in straws of 0.25 mL. After that, these samples were frozen and stored in liquid nitrogen. Before, these samples were stored, it was taken six test straws by animal, three by diluents it was thawing by 37°C by 30 seconds to thawing tubes test were measured the percentage of post -thawing of individual motility. To these results it was calculated the arithmetic media by dilueyent, and a result 38.67% to D1 and 35.33% to D2. It was compared by T-Student method and the conclusion was there is no stadisticaly significant difference between both diluyents.

Keywords: caprine semen, diluyents motility.

INTRODUCCIÓN

La congelación de semen es una biotécnica difundida y utilizada en numerosas especies animales, conjuntamente con la inseminación artificial, ha contribuido al mejor aprovechamiento de los sementales y el mejoramiento genético de varias especies.

La utilización de semen congelado o criopreservado es una herramienta invaluable, ya que permite conservar por largo tiempo material de alto valor genético, trasladarlo de un lugar a otro de forma fácil y segura, lo que a su vez contribuye al intercambio de material reproductivo con regiones y países cercanos o distantes, dinamizando los cruces entre razas. Asimismo permite planificar la recolección de semen en la temporada de mayor actividad sexual.

La desventaja que ha tenido esta técnica es que en algunas especies se presentan dificultades para criopreservar el semen, como ocurre en los caprinos, debido a que sus líquidos seminales reaccionan con los diluyentes de congelación, y en consecuencia comprometen la viabilidad de los espermatozoides por el grado de toxicidad que alcanzan estas reacciones.

El caprino es una de las primeras especies animales domesticadas por el hombre. Su producción presenta ventajas socio-económicas para el criador, tales como: no competir con él en la alimentación, integra a la familia del productor para su manejo; gran capacidad de adaptación y desarrollo en zonas áridas y semiáridas, donde otras especies difícilmente sobrevivirían; produce leche, carne y piel a bajos costos. De allí la importancia de las

investigaciones para el logro de la congelación de semen caprino que permita el uso de tecnologías avanzadas en esta especie.

Investigaciones realizadas con semen caprino, utilizando diluyentes basados en sustancias amortiguadoras o Buffer, como el Tris (hidroximetilaminometano) y la yema de huevo, han permitido la congelación del semen de esta especie, con diversos resultados de fertilidad relacionados con la composición de los diluyentes, y las diferentes concentraciones de sus elementos. Cada macho cabrío tiene características particulares en sus componentes seminales, relacionadas con la raza, edad y especialmente el medio ambiente por lo que es necesario seguir investigando, para determinar el mejor diluyente de acuerdo a sus componentes y la proporción de cada uno de ellos.

La especie caprina en Venezuela está presente en casi todo el territorio nacional. La mayor cantidad de criadores están localizados en los estados Falcón, Zulia, Lara y Nueva Esparta. A nivel de productores se encuentran dos sistemas de producción: las explotaciones extensivas, con ausencia de tecnologías, y explotaciones semi-intensivas, manejadas con tecnología de avanzada, donde se encuentran animales de alta producción de leche y carne, de productores que cada día trabajan para mejorar su producción, y necesitan las investigaciones que dinamicen y modernicen sus sistemas de crías. Para satisfacer estas necesidades permanentes debido a lo dinámico de la producción, es ineludible el compromiso de las universidades. El objetivo de esta investigación es contribuir a establecer el diluyente de mayor viabilidad para la criopreservación del semen caprino, en relación a sus efectos sobre la motilidad post-congelación.

OBJETIVOS

GENERAL

Comparar el efecto de dos diluyentes de base TRIS (hidroximetilaminometano) sobre la motilidad del semen caprino congelado-descongelado.

ESPECÍFICOS

- Determinar las condiciones físicas y reproductivas de los machos cabríos para la recolección de semen.
- Establecer las características del semen caprino antes de la congelación.
- Evaluar el efecto de los diluyentes sobre la motilidad espermática post-congelación.

REVISIÓN DE LITERATURA

Los caprinos (*Caprahircus*) figuran entre las especies más antiguamente domesticadas por el hombre, encontrándose ampliamente difundidas en casi todo el mundo. Han logrado sobrevivir y prosperar en zonas particularmente difíciles, demostrando una alta capacidad de conversión alimenticia, rusticidad y mansedumbre. Todas estas cualidades los convierten en una de las especies domésticas de mayor potencial para abastecer de proteína animal a la población mundial (Padilla, 1989).

BREVE RESEÑA HISTÓRICA DE LOS CAPRINOS EN VENEZUELA

En Venezuela los caprinos fueron introducidos por los colonizadores. Estos animales procedían de dos troncos principales: uno de la Península Ibérica y el otro de África. De la península Ibérica trajeron las razas Murciana, Murciana Granadina y Andaluza. Del África vinieron animales de la raza Nubia. Estas razas se mezclaron dando origen a la cabra criolla, que ha sido capaz de sobrevivir, producir y reproducirse en ambientes inhóspitos, incluyendo campañas de erradicación en la década de los años 50 (Reverón, 1989).

Finalizando la década de los años 60, se retoma la ganadería caprina alcanzando una población de 1.270.453 cabezas (García y Castillo, 1972). Se financiaron programas que estimulaban a los productores a mejorar sus rebaños. El Estado Venezolano ha importado, desde entonces razas africanas, europeas y norteamericana que incluyen: Saanen, Nubia (Anglo-Nubia) Toggenburg, La Mancha, Alpino Francés, Alpino Americano y Boer. La raza Canaria es introducida como mascota por productores españoles

establecidos en Venezuela. La mayoría de estas razas son de producción lechera, excepto la Nubia que es doble propósito y la Boer que es para carne (Dickson y D' Aubeterre, 2007).

En Venezuela, la incorporación de nuevas razas a los rebaños estimuló la aplicación de nuevas técnicas de producción, siendo el aspecto de mayor relevancia la reproducción, el cual es un proceso complejo que conjuga todos los elementos de producción en una explotación: alimentación, sanidad, clima, raza, ambiente, cualquier trastorno en estos elementos se refleja en una baja eficiencia reproductiva y en consecuencia disminución en la producción (López, 2007).

Para la función de reproducción en las explotaciones caprinas se aplican diferentes modalidades: monta en libertad, monta controlada e inseminación artificial. Todas estas prácticas están muy relacionadas con el tipo de explotación y el nivel económico, social y cultural del productor agropecuario (León, 1962).

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

La inseminación artificial es la deposición del semen en el tracto reproductivo de la hembra por medio de instrumentos especiales. Puede realizarse con semen fresco, refrigerado o con semen congelado. La fertilidad en pequeños rumiantes utilizando inseminación artificial se ha estimado que alcanza, 75% con semen fresco, 65 % con semen refrigerado, 50% por inseminación artificial cervical con semen criopreservado, y 70 a 75% por inseminación artificial intrauterina (laparoscopia) con semen congelado - descongelado (Pariacote, 2006).

La aplicación de la inseminación artificial debe ser planificada, en rebaños bien manejados, con buena infraestructura, programas de alimentación, programas sanitarios, equipos, operadores experimentados, evaluación genética de machos y hembras involucrados, para que cumplan satisfactoriamente sus objetivos de costos y beneficios potenciales, tomando en cuenta que, como cualquier tecnología, su uso presenta ventajas y desventajas (González-Stagnaro, 1975).

Para Evans y Maxwell (1990), las principales ventajas de la inseminación artificial son: el mejoramiento genético de los rebaños en menor tiempo, aumento de la eficiencia reproductiva del macho, eliminación o reducción de sementales en algunas unidades de producción, prevención y control de enfermedades, mantenimiento de registros seguros, utilización de reproducción sincronizada en cualquier época del año. También mencionan desventajas como: los costos, siendo los más notables los de mano de obra, la cual debe ser especializada, el valor de los fármacos y hormonas, que se utilizan cuando se sincroniza celo.

La inseminación artificial permite multiplicar las características productivas deseables de reproductores de alto valor genético, en cualquier época del año a través del manejo del semen (Gibbonset *al.*, 2000).

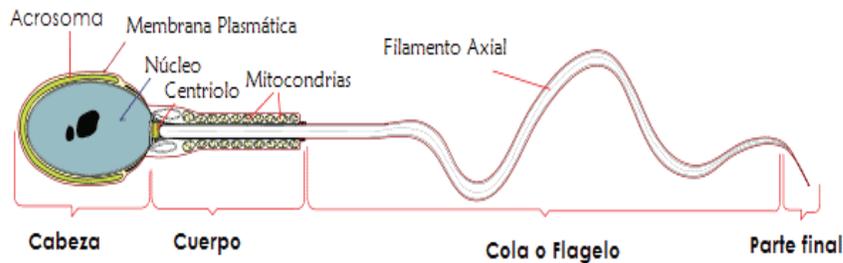
Semen: Es un líquido generativo del macho que contiene los gametos masculinos; lo forman el plasma seminal y los espermatozoides. El plasma seminal es producido por las glándulas sexuales accesorias, actúa como vehículo y proporciona un medio rico en nutrientes para los espermatozoides. Se compone de 75% de agua y 25% de sustancias orgánicas e inorgánicas (fructosa, ácido cítrico, ácido ascórbico, inositol y potasio). Los espermatozoides son los gametos masculinos que se producen en los

túbulos seminíferos de los testículos, su formación se inicia desde que el macho está en estado embrionario (espermatogonias troncales). Durante la pubertad, la hipófisis libera las hormonas gonadotrópicas al torrente circulatorio, que son la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH). La FSH interviene en la conformación de los espermatozoides y la LH estimula la producción de andrógenos (testosterona), y en forma conjunta promueven la maduración de los espermatozoides (Hafez y Hafez, 2002).

Al madurar, los espermatozoides son células terminales altamente especializadas. Son el producto final de procesos complejos de desarrollo y no pueden experimentar divisiones y diferenciaciones (Pariacote, 2006).

Están formados por tres partes principales: la cabeza, pieza intermedia o cuerpo y la cola (Figura 1). La cabeza está ocupada casi en su totalidad por el núcleo, formado por los cromosomas que contienen toda la información genética paterna. La parte anterior está envuelta por el acrosoma portador de las enzimas necesarias para la fertilización. La pieza intermedia ubicada entre la cabeza y la cola, en ella se encuentran las mitocondrias. La cola es el orgánulo locomotor de los espermatozoides. La pieza intermedia y la cola están unidas a la cabeza por un corto cuello conocido como la región de implantación (Evans y Maxwell, 1990; González, 2007).

Figura 1. Morfología de un espermatozoide



Fuente: Rodríguez y Valencia (2006).

FACTORES DE VARIACIÓN DE LA PRODUCCIÓN ESPERMÁTICA EN CAPRINOS

- **Edad del animal:** Los machos caprinos son animales precoces, a los 6 meses entran en la pubertad, inicialmente no deben ser usados con frecuencia como reproductores, porque puede afectar su crecimiento y su fertilidad. Alcanzan su madurez sexual plena entre los 18 y 24 meses, hasta una edad de 7 a 8 años, cuando comienzan sus declives como reproductores (González–Stagnaro, 1993).
- **Alimentación:** Es un factor determinante en la calidad y cantidad espermática, que además asegura el vigor, tamaño y longevidad de los machos reproductores, los cuales deben mantener una buena condición nutricional para evitar desgaste físico y problemas de fertilidad. Antes de comenzar la época de mayor actividad reproductiva, es recomendable una dieta a base de pasto, leguminosas arbustivas, suplemento mineral, agua abundante y sal ofrecida *ad-libitum* (García, 2007).
- **Manejo sanitario y ambiental:** Los machos pueden presentar subfertilidad transitoria como consecuencias de: exceso de calor o

humedad, cambio de ambiente, corte de pezuñas, molestias por las moscas y enfermedades infecciosas. La aplicación de los programas sanitarios deben ser 6 a 8 semanas antes de la temporada de monta o recolección de semen, así como el acondicionamiento o mantenimiento de las instalaciones (Evans y Maxwell, 1990).

- Estacionalidad: Los caprinos son animales de reproducción estacional. Aunque se observe capacidad de servicio durante todo el año, presentan variaciones en su libido y calidad seminal. Cuando las temperaturas son elevadas hay disminución en la actividad sexual. En las zonas templadas la mayor actividad se registra en otoño e invierno. En las zonas tropicales también se registra estacionalidad, aunque en menor grado. En Venezuela la mayor actividad se registra en los meses de Junio a Noviembre, cuando se tiene la mayor oferta forrajera (Díaz, 1978;Pariacote, 2006)
- Raza: Las comparaciones entre razas muestran diferencias de las características espermáticas, pero ellas, a menudo son enmascaradas por las grandes variaciones individuales (Padilla, 1989).

MÉTODOS DE RECOLECCIÓN SEMINAL

El semen puede ser obtenido por colecta de los machos según metodologías, bien concebidas y ampliamente utilizadas en la industria de la inseminación artificial (IA): por medio de una vagina artificial (VA), inventada por el italiano Amantea en 1914 (León, 1962), técnica preferida en la recolección de semen, o por electroeyaculación, reservada para casos excepcionales, porque disminuye la calidad del material espermático, y por razones de bienestar animal (Gibbons, 2002).

Evaluación Seminal

En la inseminación artificial, a cada recolección seminal se le aplica una valoración rutinaria de sus características macroscópicas (color y volumen) y microscópicas, o pruebas que valoran el grado de viabilidad del semen recogido (motilidad, concentración espermática, vitalidad y morfología) que son específicas en cada especie animal (Hafez y Hafez, 2002).

1.- Características Macroscópicas

Color y Volumen: Se observan inmediatamente después del eyaculado en el mismo recipiente (tubo graduado) donde se recibe el semen. El semen caprino presenta un color blanco cremoso o blanco grisáceo. Un tono rojo o marrón significa presencia de sangre fresca o hemolisada, en este caso la muestrase descarta. El volumen seminal en caprinos oscila de 0,50 a 1,5 mL (González, 2007).

2.-Características Microscópicas

Motilidad y Concentración Espermática: Permiten determinar la calidad de movimiento de los espermatozoides, tanto en masa (motilidad masal) como de forma individual (motilidad progresiva o individual) y la cantidad de dosis, que se pueden obtener por eyaculado .Para la motilidad masal (Cuadro 1 del Apéndice) se valora de 0 (no hay movimiento) a 5 (movimiento turbulento). La motilidad progresiva se valora en porcentajes, se consideran aceptables los que obtengan un porcentaje superior al 75% de espermatozoides con movimiento progresivo. La concentración espermática en semen caprino va desde 2000 a 5000x10⁶ espermatozoides/mL, y las dosis para inseminación deben tener de 150 a 200x10⁶

espermatozoides/dosis de acuerdo al método de inseminación artificial que se utilice (Vázquez *et al.*, 1998; Ballarales, 2007).

Vitalidad: Es la relación de espermatozoides vivos/muertos. Se considera que un valor medio adecuado de vitalidad debe situarse por encima del 80%. La importancia de este parámetro, es que los espermatozoides muertos provocan cambios químicos que alteran la calidad del eyaculado, los ácidos nucleicos cambian de forma importante el pH, pudiendo producir daños en las membranas de los vivos, y por consiguiente pérdida de la calidad seminal (Padilla, 1989).

Morfología: Morfológicamente, los espermatozoides requieren estar bien conformados para realizar una correcta fecundación. Por lo tanto, solo se aceptan eyaculados con hasta 20 a 25% de anomalías espermáticas. Éstas se clasifican según el lugar y el momento donde se formen: Primarias, las originadas durante la formación de los espermatozoides y secundarias, aquellas adquiridas durante el proceso de maduración espermática, las producidas por mal manejo del eyaculado se denominan terciarias (Pariacote, 2006).

Para valorar la morfología, tradicionalmente se ha utilizado la tinción de Eosina/Nigrosina. Otras tinciones son: Rosa de Bengala, Bromofenol Azul, Ácido Tánico y Azul Victoria. La introducción de los sistemas ComputerAssitedSpermAnalyzer (CASA) y Computer-AssistedSpermMorphology(CASM) al estudio integral de los espermatozoides, ha permitido realizar una evaluación objetiva, cualitativa y cuantitativa del eyaculado, en diversas especies y con menor margen de error (Cortés, 1997).

En la inseminación artificial, la manipulación del semen debe ser muy cuidadosa y lo más aséptica posible, para evitar daños o contaminación, en cualquier estado que se encuentre: fresco, refrigerado o congelado. Cuando se utiliza fresco, el semen puede usarse puro fraccionado, o diluido; si es refrigerado o congelado, siempre deben aplicarse diluyentes para mantener la calidad espermática (Evans y Maxwell, 1990).

Diluyente: Es una mezcla homogénea de sustancias nutritivas, protectoras y antibióticas que además de aumentar el volumen del eyaculado y nutrir a los espermatozoides, mantienen el pH, protegen las células espermáticas del choque térmico cuando son refrigeradas, congeladas, y descongeladas. Su función principal es mantener la viabilidad del semen para obtener preñeces por inseminación artificial con semen refrigerado o congelado (Hafez y Hafez, 2002).

Composición básica del diluyente

No existe un diluyente universal. Se han utilizado distintas soluciones, la mayoría son variaciones de fórmulas principales. La composición básica de un diluyente debe incluir lo siguiente:

- Agua bidestilada.
- Componente tampón o Buffer.
- Fuente energética.
- Crioprotector externo.
- Crioprotector interno.
- Antibióticos.

Cada componente cumple una función específica y necesaria dentro del diluyente (Gibbons, 2002; UCO, 2009).

Agua, componente tampón o buffer y componentes energéticos.-El agua es el solvente universal, se recomienda que tenga el mayor grado de pureza posible. La función del componente tampón o Bufferes mantener el pH cercano al neutro de 6,8 a 7,2; los más utilizados son: TRIS, HEPES, PIPES, BES, TES, Citrato de Sodio. Los componentes energéticos como la glucosa, la fructuosa y lactosa, proveen de energía a las células espermáticas durante el enfriamiento, además funcionan como crioprotectores no penetrantes desde el medio extracelular, al mantener la presión osmótica. Así, el agua intracelular tiene una salida lenta, minimizando los daños en la membrana (Vázquez *et al.*, 1998).

Crioprotectores externos o no penetrantes.- Deben prevenir o atenuar el shock por frío. Al ser incorporados en el medio de dilución, recubren la membrana plasmática del espermatozoide protegiendo su estructura. En ningún momento atraviesan la membrana, al igual que los azúcares. La leche descremada y la yema de huevo son los más utilizados para este fin, tomando en cuenta que los huevos deben ser frescos de 4 a 5 días de postura. Se han hecho investigaciones para comprobar que sustancias de origen vegetal puedan sustituir la yema de huevo y la leche de vaca en los diluyentes (Purdy; 2006; Beltran-Breña *et al.*, 2009).

Para la adición de yema de huevo y leche en los diluyentes para semen de caprinos, debe tomarse en cuenta que el plasma seminal de esta especie, contiene fosfolipasa o lecitinasa, producida por las glándulas bulbouretrales, que hidroliza la lecitina de la yema de huevo, produciendo lisolectina que destruye la membrana plasmática y causa la muerte espermática. Otra

fracción proteica de las mismas glándulas, BU-III interactúa con la leche e inhibe la motilidad espermática, induciendo la reacción acrosómica. Estos efectos se han minimizado o eliminado, con el doble lavado del plasma seminal por centrifugación, utilización de bajos porcentajes de yema de huevo en los diluyentes, y con altas tasas de dilución para atenuar el efecto del plasma seminal (González –Stagnaro, 1993).

Crioprotectores internos o penetrantes.- Realizan su función entrando a las células de manera uniforme, para evitar el estrés osmótico, sustituyen el agua intracelular para que no forme cristales de hielo y amortiguan el incremento de la concentración de solutos del medio extracelular. Por sus características solo se incorporan a los diluyentes en caso de congelación. Los más utilizados son: el glicerol, dimetil-sulfóxido (DMSO), propilenglicol y etilenglicol. Cuando el semen es refrigerado no se agrega crioprotectores internos (Vázquez *et al.*, 1998).

La concentración de glicerol en los diluyentes está estrechamente relacionada con la velocidad de enfriamiento del semen y la especie animal. En los caprinos se ha utilizado con buenos resultados una concentración que va de 6 al 8% en procesos de congelación. Se ha manejado la temperatura a que debe agregarse. Si se hace a temperatura ambiente, se obtiene mayor penetración a las células, pero ocasiona mayor toxicidad. Agregarlo cuando el semen tiene una temperatura de 5°C, resulta menos tóxico, pero protege menos. Su toxicidad consiste en desestabilizar la membrana plasmática, lo que induce reacción acrosómica afectando las células espermáticas (Almmlid y Jhonson, 1988; Grajales *et al.*, 2007).

Antibióticos.- Son adicionados al diluyente para controlar el crecimiento bacteriano sin ser tóxicos para los espermatozoides, los más

utilizados son penicilina, gentamicina, neomicina, lincomicina y estreptomina. El uso de antibióticos en los diluyentes es opcional (Gibbons, 2002).

Entre los diluyentes utilizados en semen caprino están:

- Tris-fructosa o glucosa-yema de huevo-glicerol.
- Tris –ácido cítrico-fructosa-yema de huevo- glicerol.
- Glucosa-leche descremada-glicerol.
- Citrato de sodio-glucosa-yema de huevo-glicerol.
- Citrato de sodio-agua de coco-yema de huevo-glicerol.

(Cueto *et al.*, 2000; Clemente, 2003).

La aplicación de los diluyentes al semen para refrigerarlo fue un paso importante en la inseminación artificial, y permitió avanzar hacia la criopreservación del semen (congelación). El uso de semen congelado produjo un gran impacto en el mejoramiento genético mundial, al acelerar el flujo de material genético de cualidades superiores hacia sectores de inferiores característica productivas, mantener reservas de material genético en cualquier época del año, facilitar el intercambio internacional de semen, evitando el costoso traslado de animales, disminuyendo riesgos sanitarios y preservando material genético de especies en riesgo de extinción (bancos de genomas). En pequeños rumiantes la expansión inicial de esta tecnología fue tan rápida como la de bovinos (González –Stagnaro, 1993).

Congelación o criopreservación del semen

Según Pariacote (2006) consiste en someter al semen a muy bajas temperaturas para detener las funciones metabólicas de las células espermáticas, manteniendo su potencial genético por largo tiempo. Los primeros trabajos en congelación de semen caprino se realizaron en la década de los años 50, en base al proceso utilizado en los bovinos. Los resultados de fertilidad fueron muy variables (León, 1962).

MÉTODOS PARA CONGELAR SEMEN

El método de congelación involucra el proceso de envasado y la congelación, el primero da nombre al método y puede ser en pajuelas o en pellets. Los procesos de congelación pueden hacerse en nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C y en ultracongeladores a temperatura de -152°C (Niño, 2006).

Envasado del semen en pajuelas para la congelación: Es el más usado por su practicidad. Según su capacidad, hay pajuelas de 0,25mL y de 0,50mL, siendo la más comúnmente utilizada en caprinos la de 0,25mL. Las pajuelas o pajillas deben ser identificadas con tinta indeleble, resistente a bajas temperaturas señalando el laboratorio, la especie e identidad del animal, raza, fecha de envasado de la pajuela y las iniciales de la unidad de producción. Con el semen previamente diluído se llenan y sellan con alcohol polivinílico o con ultrasonido, dejando un pequeño espacio de aire para evitar rompimiento al congelarse (Evans y Maxwell, 1990).

Método de pellets: También conocido como método de pastilla. Se requiere un bloque de hielo seco agujereado para formar pellets. Estos

agujeros son llenados por goteo, para ello se utiliza una pipeta fría. El semen permanecerá en el bloque de dos a tres minutos, después será sumergido en nitrógeno líquido. Se colocan en globets identificados y se almacenan en termos de nitrógeno (Gibbons *et al.*, 2000).

PROCESO DE DESCOGELACIÓN DEL SEMEN

Descongelación del semen envasado en pajuelas.- Generalmente, las pajuelas deben descongelarse en baño de maría, con particular atención a la temperatura y tiempo de permanencia en bañomaría. Se ha descongelado con temperaturas de 37 a 39°C por 15 ó 30 segundos, y de 30 a 35°C por 30 segundos, con el criterio de cuanto más rápido sea la descongelación, mas sincronizada es la descongelación del medio extracelular con la del intracelular (Deka y Roa, 1987).

Vázquez *et al.* (1998) recomiendan descongelar las pajuelas en forma rápida en baño maría, a una temperatura de 60°C durante 6 segundos y dejarlas a temperatura ambiente, para que adquieran los últimos grados de recuperación, del cambio de estado en forma suave.

Descongelación del semen en pellets.- Se descongela en tubos secos, colocando de 2 a 4 pellets por tubo de acuerdo al tamaño, manteniéndolos en baño maría con temperatura de 37°C, agitando suavemente los tubos para una descongelación uniforme. Este es el método usado en descongelación de semen caprino. Debe utilizarse rápidamente, ya que tiene menor resistencia que el conservado en pajuelas (Evans y Maxwell, 1990).

La viabilidad de las dosis descongeladas va a ser el resultado de los procesos de dilución, refrigeración, congelación y descongelación, en cuyo

producto final se observan los daños que sufren los espermatozoides de motilidad, vitalidad, en el acrosoma, permeabilidad de la membrana, morfoanomalías y por consiguiente de la fertilidad. Por lo general, los parámetros que se evalúan para determinar localidad seminal post-congelación en semen caprino son la motilidad y vitalidad (Pariacote, 2006).



MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro de Recría de Ovinos y Caprinos, en la Estación Experimental Lara del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), ubicado en el Km. 7 de la vía Barquisimeto-Duaca, caserío "EL CUJÍ", Parroquia Catedral, Municipio Iribarren del estado Lara, Venezuela. Su ubicación geográfica es $10^{\circ} 9'$ de Latitud Norte y $69^{\circ} 18'$ de Longitud Oeste, a 580 msnm. El clima es de transición de Bosque Seco Premontano a Monte Espinoso Premontano con precipitaciones de 500 a 600 mm y temperatura media de 18 a 24°C (Ewelet *et al.*, 1976).

Los linderos del área que ocupa la Estación Experimental Lara son: *Norte*: caserío El Cují; *Sur*: Polígono de tiros; *Este*: Zona montañosa El Cují; *Oeste*: Carretera nacional Barquisimeto-Duaca. La vialidad interna está conformada por 600 m de vía asfaltada y 5 km de caminos engrazonados que comunican con potreros y corrales.

La Estación tiene una extensión de 99 ha de las cuales 78 ha están destinadas al Centro de Recría para la producción de ovinos-caprinos, 6 ha para la investigación vegetal, 10 ha de terrenos baldíos y 5 ha con infraestructuras. El área ocupada por El Centro de Recría de ovinos y caprinos se compone de edificaciones donde funcionan las oficinas y laboratorio de biotecnología, corrales techados, corral para aislamiento o cuarentena, espacios abiertos cercados con malla ciclón y potreros cercados con cerca tradicional (alambre de púas).

En este Centro de Recría, los ovinos y caprinos son manejados en un sistema de producción intensiva, para la investigación científica y obtención de machos reproductores utilizados en programas de inseminación artificial, para mejoramiento genético que ofrece la institución a los productores de la zona, en su mayoría pequeños productores.

ORIGEN Y MANEJO DE LOS MACHOS REPRODUCTORES

En el Centro de Recría se trabaja con reproductores caprinos de las razas Alpino Francés, Criolla, Boer, que son propiedad del Centro y con otras razas (Canaria y Toggenburg) obtenidos por intercambio con productores de la zona. Para identificar a los animales se coloca la primera letra de la raza y después el número, a los Criollos se les coloca la letra “D” para diferenciarlos de los animales de la raza Canaria.

Manejo alimenticio: La alimentación se basa en raciones de pasto Bufel (*Cenchrusciliaris*) repicado fresco, raciones de heno de pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*) y pasto Estrella (*Cynodon lemfuensis*) sin límite de oferta, alimento balanceado con 18% de proteína cruda a razón de 1kg/animal/día, además de sal y minerales *ad libitum*. Los programas alimenticios se modifican de acuerdo a la época del año, y la temporada de recolección de semen más activa. A los machos reproductores no se les permite pastorear.

Manejo sanitario: Los planes sanitarios son elaborados de acuerdo a las frecuencias enzoóticas de la zona, y se ejecutan cada año con pocas modificaciones. Se aplica de la forma siguiente: cada animal a partir de los cuatro meses, inmediatamente después del destete, es desparasitado por vía oral con Albendazol. Se practican análisis sanguíneos tres veces al año, para

monitorear la salud del rebaño. En la época de lluvia suele presentarse incidencia de piojos, en estos casos se aplican baños con productos a base de Amitraz.

Manejo reproductivo: A los machos cabríos generalmente se les recolecta semen para congelarlo en pajuelas. Utilizando monta natural solo en cabritonas (hembras de primer servicio) y en las cabras que no queden preñadas después de la inseminación y presenten cualidades de buena habilidad materna, buena producción lechera o cortos intervalos entre partos.

En el Centro de Recría estaban disponibles siete machos cabríos para la recolección de semen y realización de esta investigación clasificados de la siguiente manera:

- Tres de la raza Alpino Francés traídos del estado Nueva Esparta.
- Tres de la raza Criolla procreados en el mismo Centro.
- Uno de la raza Canaria que pertenece a un productor de la zona.

Los reproductores del Centro de Recría son manejados y evaluados por un grupo técnico que incluye médicos veterinarios, quienes realizan las evaluaciones andrológicas y físicas de estos reproductores. Sin embargo, para esta investigación, los animales fueron evaluados (Cuadro1) con criterio zootécnico para determinar:

- Edad: La edad de los animales se conoció a través de los registros del Centro de Recría.

- **Peso:** Cada animal fue pesado en una balanza con capacidad para 200kg, marca Detector.
- **Condición corporal:** Se determinó observando cada animal por la parte posterior, y se calificó de manera subjetiva, de acuerdo a los valores para calificar la condición corporal, desde condición uno (1caquéctico) a condición cinco (5 obeso), siendo deseable que un reproductor tenga condición corporal de tres (3) a cuatro (4) según lo señalado por Dickson y D´Aubeterre (2007).
- **Simetría testicular y torsión testicular:** Se observó desde la parte posterior a los animales, se tomaron los testículos y se hicieron descender al saco escrotal, verificándose que ambos eran del mismo tamaño y presentaban una posición perpendicular al cuerpo, características de un buen reproductor (Vilhar Filho, 1986 ; González-Stagnaro, 1993).
- **Circunferencia escrotal:** Se midieron los testículos en su parte más ancha; en los caprinos reproductores esta circunferencia debe ser de 28 a 32 cm, aunque en Venezuela se aceptan por debajo de este rango. La circunferencia escrotal tiene una alta correlación con el peso y volumen de los testículos, que a la vez están relacionados con la producción espermática (Ballarales, 2001).
- **Consistencia testicular:** Se realizó presionando suavemente los testículos determinándose que la consistencia era suave, esponjosa, sin grumos o nódulos endurecidos. Se comprobó que los testículos se desplazaban en el escroto sin adherencias, esto permite que el animal controle su temperatura testicular (Portolano, 1990).
- **Aplomos:** Los animales fueron observados, cuando caminaban hacia el sitio de acondicionamiento, verificándose que se apoyaban en sus

cuatro patas, sin presentar claudicación, por problemas de pezuñas mal formadas o cualquier otra patología. Cuando los animales pueden caminar o pararse sin dificultad, tienen estabilidad y seguridad al momento de la monta facilitando la recolección de semen (Evans y Maxwell, 1990)

- Libido: Cada macho cabrío por separado, era trasladado al área donde estaba atada una hembra en celo, para observar su respuesta y disposición a la monta en el día de recolección.

Preparación de los machos cabríos

Después de la evaluación, a los machos se les cortó el exceso de pubescencia del prepucio y se limpió el área externa del mismo para evitar la contaminación del semen. Al lavar el interior del prepucio, se utilizó una pipeta con agua destilada la cual se introdujo a la entrada del mismo y se aplicaron pequeñas porciones de agua para eliminar restos de orina, finalmente se secó el área lavada con papel absorbente.

Recolección de semen

La recolección de semen se realizó en tres sesiones no consecutivas, por cada animal por el método de la vagina artificial, en un lapso de 42 días.

Se utilizaron dos vaginas artificiales para dinamizar el trabajo. Después de limpiarlas, se les agregó agua a 50°C por la válvula externa hasta alcanzar 2/3 de su capacidad, completando el llenado con aire para obtener un diámetro interno aproximado de 1cm. Se les colocó un cono plástico y un tubo de recolección aforado previamente esterilizado.

La vagina artificiales preparada, para ofrecer al macho los estímulos de presión (1cm), suavidad (lubricante) y temperatura(40 a 41°C), imitando los genitales de la hembra. La temperatura interna de cada vagina artificial se midió momentos antes de la recolección, cuando bajaba de 40°C se intercambiaba el agua para mantener esta temperatura.

El macho pasaba al área donde estaba la hembra en celo, atada a una estructura metálica en forma de silla, él podía tocarla y estimularse, al montarla se desviaba el pene, para introducirlo dentro de la vagina artificial y recolectar el semen (Figura2).

Manejo y evaluación del semen pre-congelación.

El semen recolectado se mantuvo a una temperatura de 37°C (terno de baño maría con temperatura regulada), mientras se realizaron las evaluaciones necesarias, para su dilución y posterior congelación. Se determinaron los siguientes parámetros:

Color del semen: Se observó a través del tubo aforado de vidrio, anexo a la vagina para la recolección.

Volumen: Al igual que el color se observó del tubo aforado de recolección.



Figura 2. Colecta de semen caprino con vagina artificial

Motilidad masal: Se estableció colocando una gota de semen sin diluir, sobre porta objeto y observándola en un microscopio óptico, con oculares de 10X marca Olympus /B X 51 modelo U-LH00HG/ en objetivo 10X, utilizando una escala de clasificación de 0 (cero) a 5 (cinco) según lo indicado por Ballarales (2007) (Cuadro 1 del Apéndice). Solo se tomaron los eyaculados con valores de 3 a 5.

Motilidad individual: Se determinó colocando una muestra en el porta objeto, se colocó un cubre objeto (laminillas) y se observó a 40X, valorándose subjetivamente el semen. Se procesaron solamente las muestras con valores de $\geq 65\%$ de espermatozoides con movimiento

rectilíneo progresivo. Por debajo de esos valores el semen no es viable para la criopreservación.

Concentración espermática: Se obtuvo utilizando un espectrofotómetro (Marca Minitube, modelo SDM5, Germano) en una dilución 1:500 empleando solución fisiológica. En el laboratorio donde se realizó el ensayo, este equipo está calibrado para determinar la concentración espermática, calcular el número de dosis con una concentración de 180 millones de espermatozoides por cada pajuela de 0,25mL y en consecuencia la cantidad de diluyente que debía aplicarse para obtener esas concentraciones.

Preparación de los diluyentes

Para la dilución del semen, se prepararon y utilizaron dos diluyentes en base Tris: El Tris-yema (D1) de preparación artesanal. Las porciones establecidas para cada componente de este diluyente (Cuadro 2 del Apéndice), son parte del protocolo de congelación aplicado por la Dra. Cristina Clemente de Mello (2003) del Brasil. El segundo diluyente utilizado fue Triladyl® (nombre comercial), compuesto por una solución madre preparada de forma industrial, identificado en esta investigación como D2. En la preparación solo se le agrega agua destilada y yema de huevo en porcentajes, de acuerdo a la especie animal en la que se vaya a utilizar. En la dilución para el semen caprino con este diluyente, se agregó 5,88% de yema de huevo de acuerdo al instructivo del producto (Cuadro 3 del Apéndice).

Los diluyentes se prepararon 18 horas antes de la recolección. Después de recolectar el semen y evaluarlo, se separaba en dos porciones iguales para aplicar un diluyente a cada una. La cantidad de diluyente para cada

porción se aplicó en base a los resultados del espectrofotómetro y verificación por observación del semen diluido en el microscopio.

Llenado de pajuelas y congelación

El semen diluido se envasó con un empajuelador automático IMV, modelo IS4 en pajuelas de 0,25mL, rotuladas con el nombre de la institución (INIA-Lara), identificación del animal (especie, N° del animal y raza) y fecha. Al llenar las pajuelas se les dejó un espacio con aire para evitar que se exploten al congelarse y descongelarse. Fueron selladas con alcohol polivinílico y ultrasonido colocadas horizontalmente en una rejilla. Se llenaron 757 pajuelas, de las cuales 387 con tris-yema y 370 con Triladyl®.

Antes de la congelación las pajuelas fueron sometidas a un período de enfriamiento y estabilización del semen, que consiste en refrigerarlas durante 4 horas, a una temperatura de 5°C. Inmediatamente después se expusieron a vapores de nitrógeno, a 4cm de altura de la fase líquida, a una temperatura de -80 a -100°C aproximadamente, durante 20 minutos. Finalmente fueron sumergidas en nitrógeno, a -196°C de temperatura. Se organizaron en globets plásticos, colocados en escalerillas para almacenarlas en los termos de nitrógeno.

Motilidad individual del semen post-congelación

La evaluación de motilidad individual se realizó antes de almacenar las pajuelas de forma definitiva en los termos de nitrógeno. Se tomaron 3 pajuelas por cada tratamiento (D1, D2) para un total de 6 pajuelas por cada animal. Luego se introdujeron en baño maría a 37°C por 30 segundos, para descongelarlas. Posteriormente se secaron con papel absorbente y se colocó

una gota de semen sobre un porta objeto y cubierta con un cubre objeto o laminilla para observar el semen descongelado en el microscopio, a 10X y 40X. Finalizada la evaluación se almacenaron solamente aquellas pajuelas con motilidad progresiva post-congelación $\geq 25\%$, que son utilizadas en el proceso de inseminación artificial, como lo señala UCO (2009).

DISEÑO EXPERIMENTAL

La adjudicación de los tratamientos a las porciones de semen se realizó al azar empleándose un diseño completamente aleatorizado. Los tratamientos fueron los diluyentes de base TRIS: Tris yema (D1) y Triladyl® (D2). La variable estudiada fue la motilidad progresiva post-congelación. La recolección de semen se hizo de cinco machos cabríos adultos. El semen recolectado en cada animal se dividió en partes iguales, para aplicarles los diluyentes y se evaluaron un total de 45 pajuelas por cada tratamiento.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados a través de la T-Student con nivel de significancia al 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES FÍSICAS Y REPRODUCTIVAS DE LOS MACHOS CABRÍOS

En la evaluación física que se les practicó a los machos disponibles para esta investigación (Cuadro1), se obtuvo lo siguiente: El grupo quedó conformado por 5 animales de las razas: Alpina (2), Canaria (1) y Criolla (2). La edad de los animales estuvo comprendida desde 18 meses hasta 51 meses, lo que significa que todos los machos se consideraron adultos de acuerdo al criterio de González-Stagnaro (1993), quien explica que los machos cabríos alcanzan su madurez sexual a los 18 meses. Los reproductores tenían condición corporal 3y 4 siguiendo las recomendaciones de Ballarales (2007), considerando que animales con condición corporal inferior a3, no es conveniente extraerles semen o llevarlos a monta, por su deterioro físico (Cuadro 8 del apéndice).

El peso corporal de los animales estaba dentro del rango exigido en función de la raza, incluyendo el animal más joven de 18 meses de la raza Alpino Francés con 41kg que representa el 60% del peso adulto que es lo recomendable para su edad, el macho Canario, con 80kg es un adulto consolidado, y los dos machos Criollos tenían peso vivo superior a lo establecido de 40kg para la raza de acuerdo a Dickson y D'Aubeterre (2007).

Así mismo, la circunferencia escrotal y el peso corporal se encontraban dentro del rango reportado por De La Vega *et al.* (2001); Mushtaquet *al.* (2007), para machos cabríos en edad reproductiva (Cuadro 1), quienes

indican que es necesario tomar en cuenta la circunferencia escrotal, por estar relacionada con el rendimiento reproductivo y fecundante del reproductor.

Cuadro N° 1. Evaluación preliminar de los machos cabríos

Identificación	Edad (meses)	Peso (kg)	Condición corporal	Circunferencia Escrotal (cm)
A-30 descartado	18	35	2	21
A-31	18	41	3	24,5
A-878	51	61	3	31
C-010	36	80	4	32
D-02 descartado	48	42	2	29,5
D-04	48	66,5	3	31,5
D-16	36	45	3	25,5

Los animales, presentaron testículos de consistencia suave sin nódulos, ni adherencias, con capacidad para bajar al escroto y controlar la temperatura testicular. En cada jornada de recolección los machos mostraron deseos de monta, lo que se consideró buena capacidad de servicio o líbido.

Estos dos aspectos, temperatura testicular y capacidad de servicio, son de gran importancia en el manejo de los reproductores. En los animales la temperatura testicular igual a la temperatura corporal afecta a los espermatozoides, y la capacidad de servicio o libino indican buen nivel hormonal como lo señalan Cueto *et al.* (2000).

Evaluación del semen caprino antes de la congelación

Durante la recolección de semen se observó el color de los eyaculados, el cual varió de blanco grisáceo a blanco amarillento, característico de la especie caprina de acuerdo a lo descrito por González (2007).

En las evaluaciones del semen pre-congelación (Cuadro 2), los valores promedios de volumen, motilidad individual o progresiva y concentración espermática se encontraron dentro del rango necesario para considerarlo apto para el proceso de criopreservación, según Mushtaq *et al.*, (2007), quienes reportan los siguientes promedios: 1 mL de volumen, 80% de motilidad progresiva y 4000×10^6 concentración espermática.

Cuadro N° 2. Valores de la evaluación espermática pre-congelación en machos cabríos (medias \pm DE)

Observación (Eyaculado)	Volumen (mL)	Motilidad Masal	Motilidad Individual (%)	Concentración (10^6 esp/mL)
3 x 5	1,1 \pm 0,7	4,6 \pm 0,6	83,6 \pm 8	4937,4 \pm 1365,4

Estos promedios obtenidos de volumen (1,1 \pm 0,7 mL) y de concentración espermática (4937,4 \pm 1365,4 millones de espz/mL) son superiores a los reportados por Gibbons (2000) de 0,77 \pm 0,22 mL de volumen y 4.390 \pm 730 millones espz/mL de concentración espermática. Cabe señalar que el mencionado autor, realizó la recolección de semen en la temporada de monta, cuando los reproductores presentan mayor actividad sexual, a diferencia de la recolección de semen para esta investigación que fue, pasada la temporada de monta.

Los valores de motilidad individual, alcanzados por los machos cabríos de la raza Majorera de 81 ± 5 reportados por Niño (2006), se encuentran por debajo de lo señalado en este estudio, donde se alcanzó un promedio de $83,6 \pm 8$, con animales de tres razas diferentes.

Efecto de los diluyentes sobre la motilidad espermática post-congelación.

La motilidad individual, es uno de los parámetros más tomado en cuenta y más simple, para determinar la calidad espermática post-congelación, cuando los espermatozoides están en movimiento y además, este movimiento es progresivo, se infiere que ese semen puede ser utilizado para inseminar, según lo señalado por Evans y Maxwell (1990). Los porcentajes de motilidad del semen post-congelación, en cada evaluación, pueden observarse en los Cuadros 4; 5 y 6 del Apéndice.

Los resultados de la motilidad post-congelación, analizados mediante las pruebas paramétricas de T-Student, (Figura 3) demostraron, que no existió diferencias estadísticamente significativa entre los diluyentes, (Cuadro 7 del Apéndice).

Esto puede ser resultado de que ambos diluyentes tienen una formulación parecida, por lo que su efecto sobre la motilidad espermática post-descongelación también sería similar. Resultados semejantes a los encontrados en esta investigación fueron reportados por Akthenet *al.* (2010), quienes compararon la motilidad espermática post-congelación de semen de búfalo diluido en un diluyente comercial, afín al Triladyl, y con Tris-yema de huevo, concluyendo que ambos diluyentes son eficientes para la criopreservación del semen de búfalo.

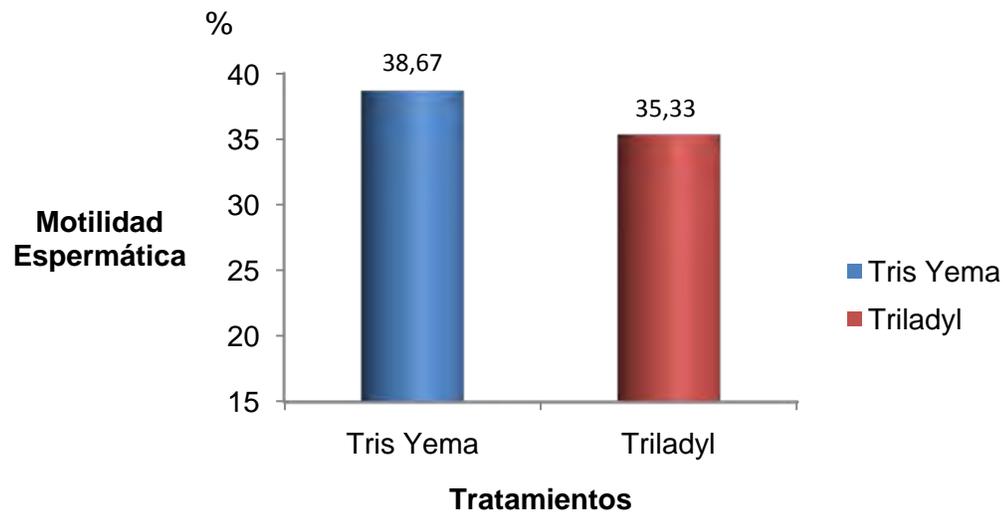


Figura 3. Motilidad espermática individual post-congelación de semen caprino congelado con dos diluyentes en base TRIS

Así mismo, Garde *et al.* (2003), trabajando con semen de gacela, no encontraron diferencias significativas entre la motilidad espermática post-descongelación del semen congelado utilizando Triladyl y Tris-yema de huevo como diluyentes de congelación, reportando 27 y 30% de motilidad respectivamente. Por su parte, Eket *et al.* (2009), en congelación de semen ovino indican que no existen diferencias en la motilidad post-descongelación de los espermatozoides cuando estos fueron congelados utilizando Triladyl y otro diluyente en base TRIS, los autores atribuyen ésta semejanza, en sus resultados, a la analogía de los componentes de ambos diluyentes.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Los 5 machos cabríos seleccionados, de acuerdo a la evaluación preliminar, estaban en buen estado físico para recolectarles semen.
- Las características del semen pre-congelación señalaron, que era apto para someterlo al proceso de congelación.
- No se encontró diferencia estadísticamente significativa en los resultados de la motilidad del semen caprino congelado-descongelado con 2 diluyentes de base TRIS.

RECOMENDACIONES

- Continuar esta investigación con mayor número de animales, conformar grupos etarios en diferentes ambientes que permitan profundizar el conocimiento, sobre el manejo de los diluyentes en la criopreservación.
- Evaluar el efecto raza y factores ambientales, en el uso de los dos diluyentes Tris-yema y Triladyl® en la criopreservación de semen caprino.
- Mantener una línea investigativa en caprinos, donde se involucren la Universidad de Oriente, el Centro de Fomento y Producción de Ovinos y Caprinos(CEFOPROCA) y productores, para impulsar la alternativa viable, que representa para el país la producción caprina (leche – carne) haciéndola cada día sustentable y sostenible en el tiempo.

- Impulsar el establecimiento de un Centro de Recría, previo estudio de su mejor ubicación, para ofrecer a los productores del estado Monagas y a los estados vecinos, la posibilidad de adquirir semen congelado o reproductores de alto valor genético.



BIBLIOGRAFÍA

- ALMLID, T. and JHONSON, L.1988.Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperatura of gliceroladition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws.J. Anim. Sci. 66:2899-2905.
- AKTHEN, S., ANARI,M., RAKHA,B., ADRABI, S., IGBAL, S. and ULLAH, N.2010.Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell® extender.Theriogenolgy 74:951-955.
- ANUARIO ESTADÍSTICO DE VENEZUELA. 2002.Instituto Nacional de Estadística. República Bolivariana de Venezuela. p. 653.
- BALLARALES, P. 2001. Evaluación ultrasonográfica de tractoreproductivo del carnero en relación con la estación reproductiva. Tesis M.Sc. mención Reproducción Animal. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.pp: 35-40.
- BALLARALES, P. 2007. Evaluación de la capacidad reproductiva del macho ovino y caprino. Manual de Producción de Ovinos y Caprinos. INIA. Centro de Investigaciones Agropecuarias del estado Lara. Barquisimeto, Venezuela. pp: 247-250.
- BELTRAN-BREÑA, P., DE LA FUENTE,J. y PALASZ,A. 2009. Efecto de los diferentes métodos de preparación de liposomas de soja para el almacenamiento en frío y la congelación de semen de toro. Ponencias del VII congreso de la Asociación Nacional de Especialistas en Medicina Bovina de España. Documento en línea. [Disponible en]:<http://anembe.com/congresos/indice.cgi?folder=2009&next=16>
- [Consultado] 18/12/2009.
- CLEMENTE,C.2003.Evaluación de diferentes diluyentes en la congelación de semen caprino. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España. Facultad de Veterinaria. p.196

- CORTÉS, S.1997.Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid España. Facultad de Ciencias Biológicas. p. 200.
- CUETO, M., GIBBONS, A., y ABAD, M.2000. Reproducción en Caprinos Documento en línea. [Disponible en]: <http://www.inta.gov.ar/bariloche/info/documentos/animal/reproduc/pa396.pdf>. [Consultado]26/05/2008.
- DE LA VEGA, A., RUÍZ, R.y OSCAR,W. 2001.Relación de la circunferencia escrotal con algunos parámetros de calidad seminal caprina en caprinos criollos de la provincia de Tucumán, Argentina. Zootecnia Tropical19(3):455-463
- DEKA, B. and ROA, A.1987. Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semen. Ind. Vet. J. 64: 591-594.
- DÍAZ, M. 1978. La Cabra. Guía Práctica para el productor caprino. Mundi-Prensa.Madrid, España. pp: 63-66.
- DICKSON, L. y D'AUBETERRE, R.2007.Razas caprinas para la producción en Venezuela. Manual de producción de caprinos y ovinos. Centro de Investigaciones Agrícolas del estado Lara. Barquisimeto, Venezuela.pp:1- 8.
- DORADO, J.,RODRÍGUEZ, I. and HIDALGO, M.2007.Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two freezing extenders based on postthaw sperm quality and fertility rates alter artificial insemination. Theriogenology, 68(2): 168-177.
- EK, J., AKÉ, R. y SILVA, C. 2009. Efecto de dos diluyentes sobre la viabilidad del semen congelado de ovinos de pelo. Bioagrocencias. 2: 4-12.
- EVANS,G.y MAXWELL, W. 1990.Inseminación Artificial de ovejas y cabras. Texto Publicado en Español por: Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, España. pp: 19- 169.

- EWEL, J., MADRIZ, A. y TOSI, J.1976. Zonas de vida de Venezuela. Memoria explicativa sobre el mapa ecológico. Ministerio de Agricultura y Cría. Caracas, Venezuela.pp:43-123.
- GARCÍA, O. y CASTILLO, J.1972. Situación de la ganadería caprina en Venezuela. *Agronomía Tropical*. Venezuela.22 (3):239-250.
- GARCÍA, M.2007. Alimentación del Caprino. Manual de producción caprinos y ovinos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas del estado Lara. Barquisimeto, Venezuela. pp: 47-66.
- GARDE, J., SOLER, A., CASSINELLO, J., CRESPO, C., MALO, A., ESPESO, G., GOMENDIO, M. and ROLDAN, E.2003. Sperm cryopreservation in three species. Of end agered gazelles (*Gazellacuvieri*, *G danomhorr* and *G dorasneglecta*). *Biol. Reprod.* 69(2):602-611.
- GIBBONS, A., CUETO, M. and WOLFF, M.2000. Inseminacion artificial en la especie caprina. Documento en línea. [Disponible en]:<http://www.inta.gov.ar/bariloche/info/documentos/animal/reproduc/Ct-235%20Manual%20IA%20caprina.pdf>[Consultado]23/05/2008].
- GIBBONS, A. 2002. Inseminación artificial con semen congelado en cabras angora. Documento en línea. [Disponible en]:<http://www.inta.gov.ar/bariloche/info/documentos/animal.pdf>. [Consultado] 09/10/2007-
- GONZÁLEZ, R. 2007. Contrastación Seminal. Documento en línea [Disponible en]:
www.conejosyalgom.com.ar/articulos023.asp.ookey=255&ootest
[Consultado] 08/11/2007.
- GONZÁLEZ-STAGNARO, C. 1975. Inseminación artificial en cabras con semen congelado. *Revista Científica. Facultad de Ciencias Veterinaria. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.* 5: 10-12.
- GONZÁLEZ-STAGNARO, C. 1993. Comportamiento reproductivo de ovejas y cabras tropicales. *Revista Científica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.* 3: 173-196.

- GRAJALES,H., LUNA, N. y MARTÍNEZ, R. 2007. Congelación de semen caprino utilizando diferentes concentraciones de glicerol. Ciencias Pecuarias. Bogotá, Colombia. pp:668-669.
- HAFEZ, E. y HAFEZ, B.2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Reproductive Health Center IVF/ Andrology International Kiawah Island, South Carolina, USA. pp: 375-45.
- LEÓN, A. 1962.Técnicas de la Producción Animal e Industrias Zoogenas. Manual de Agricultura.Salvat.Madrid, España. pp:3309-3360.
- LÓPEZ, G. 2007.Anatomía y Fisiología Reproductiva en Ovinos y Caprinos.Manual de Producción de Caprinos y Ovinos. Centro de Investigaciones Agropecuarias de Lara. Barquisimeto, Venezuela. pp: 229-243.
- MUSHTAQ, A., MEMON, W.,DUANE, M. and HARI, G. 2007.Examination of the reproductive tract and evaluation of potential breeding soundness in the buck.Saunders Elsevier. Missouri, USA. Current Therapy in large Animal Theriogenology.Pp: 515- 518.
- NIÑO, G. 2006. Congelación y conservación de semen en la especie caprina mediante utilización de ultracongeladores de -152°C: Tasa de fertilidad tras inseminación con semen congelado por diferentes protocolos de crioconservación. Facultad de Veterinaria. Gran Canaria, España.pp:59-66.
- PADILLA, E. 1989. El Caprino. América. Caracas, Venezuela. pp: 141-154.
- PARIACOTE, F. 2006. Curso de tecnología seminal en la especie caprina. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Coro, Venezuela.pp: 15-44.
- PORTOLANO, N. 1990. Explotación de Ganado Ovino Caprino. Versión en Español por Prof. GALLEGO, J. Departamento de Producción Animal.Madrid, España. pp: 107 – 112.
- PURDY, P. 2006. A review on goat sperm cryopreservation.Small Ruminant Research.63: 215 – 225.
- REVERON, A. 1989. Ovinos y Caprinos.AméricaChacaito-Caracas, Venezuela. pp:299-305.

- RITAR, A. and SALOMÓN, S. 1982. Effects of seminal plasma and of removal and of egg yolk in the diluents on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* 35:305-312.
- RODRÍGUEZ, A. y VALENCIA, E. 2006. El sistema reproductor de la cabra. *Ruminantia. Puerto Rico.* 2:2
- SANTIAGO, J., TOLEDANO, A., PULIDO, A., DORADO, J., GÓMEZ, A. and LÓPEZ, A. 2006. Effect of egg yolk concentration on cryopreserving spanish ibex (*Capra pirenaica*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology.* 66 (5):1219-1226
- UCO. UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA. 2009. Inseminación Artificial. Documento en línea [Disponible en]: www.uco.es/zootecniaygestion/menu.php?tema=120 [Consultado] 02/08/2009.
- VÁZQUEZ, I., CORTÉS, S. y BORQUE, C. 1998. Conservación de semen de macho cabrío. XXIII Congreso de Producción Ovina y Caprina. Madrid, España. 2:31-36.
- VILHAR FILHO, A. 1986. Estudo das características externas dos testículos e do semen de caprinos criados na região semi-árida do estado da Paraíba. Thesis. Universidade de Sao Paulo, Brasil. p. 87.



APÉNDICE

Cuadro 1. Valores de motilidad masal

0	No hay movimiento
1	Hay movimiento sin olas
2	Olas escasas o lentas
3	Olas abundantes
4	Olas y remolinos
5	Olas y remolinos turbulentos

Fuente: Ballarales, (2007)

Cuadro 2. Composición del diluyente TRIS-Yema (D1)

Componente	Cantidad adicionada
Agua destilada	100 mL
Trisma	2,88 g
Fructosa	0,78 g
Ac. Cítrico monohidratado	1,62
Fluvicina	0,05 g
Glicerol	6 mL
Yema de huevo	16 mL

Cuadro 3. Composición del diluyente Triladyl ® (D2)

Componente	Cantidad adicionada
Triladyl ®	100mL
Agua destilada	300 mL
Yema de huevo	25 mL

Cuadro 4: Primera evaluación de semen post-congelación

Identificación	Raza	Motilidad Individual %(D1)	Motilidad Individual%(D2)
A-31	Alpina Francés	40	55
A-878	Alpina Francés	45	30
C-010	Canaria	35	15
D-04	Criolla	25	30
D-16	Criolla	45	70

Cuadro 5: Segunda evaluación de semen post-congelación

Identificación	Raza	Motilidad Individual D1 (%)	Motilidad Individual D2 (%)
A-31	Alpina Francés	35	35
A-878	Alpina Francés	35	40
C-010	Canaria	35	25
D-04	Criolla	30	30
D-16	Criolla	35	45

Cuadro6: Terceraevaluación de semen post-congelación

Identificacion	Raza	Motilidad Individual D1 (%)	Motilidad IndividualD2(%)
A-31	Alpina Francés	35	40
A-878	Alpina Francés	50	40
C-010	Canaria	40	15
D-04	Criolla	50	25
D-16	Criolla	45	35

Cuadro 7. Análisis de t-Student.

	Motilidad post-congelación	
Diluyente	D1	D2
Medias aritméticas	38,67	35,33
Desviación estándar	7,19	14,33
Número de muestras	45	45

Cuadro 8. Condición corporal en caprinos.

Condición corporal	Características
1	Espina dorsal muy visible formando canto continuo, flancos huecos, todas las costillas visibles, vértebras lumbares pueden ser tocadas, sin músculos, solo piel y huesos
2	Espina dorsal todavía visible con canto continuo, pelvis prominente, las vértebras lumbares pueden ser agarradas, pero ya presentan tejido, las costillas anteriores no son visibles.
3	Espina dorsal no prominente, pelvis cubierta, el tejido muscular cubre parcialmente las vértebras lumbares
4	Espina dorsal cubierta, vértebras lumbares cubiertas de tejido.
5	No se distingue la espina dorsal, está totalmente cubierta, ligeramente arqueada en forma cóncava, las vértebras lumbares cubiertas

Ballarales, 2007

HOJAS METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso - 1/5

Título	COMPARACIÓN DE DOS DILUYENTES DE BASE TRIS (Hidroximetilaminometano) SOBRE LA MOTILIDAD DEL SEMEN CAPRINO CONGELADO-DESCONGELADO
Subtítulo	

El título es requerido. El subtítulo o título alternativo es opcional.

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
LUZARDO N. ADIRIMA del C.	CVLAC	05084700
	e-mail	luzardoadirima@yahoo.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Se requiere por lo menos los apellidos y nombres de un autor. El formato para escribir los apellidos y nombres es: "Apellido1 InicialApellido2., Nombre1 InicialNombre2". Si el autor está registrado en el sistema CVLAC, se anota el código respectivo (para ciudadanos venezolanos dicho código coincide con el número de la Cedula de Identidad). El campo e-mail es completamente opcional y depende de la voluntad de los autores.

Palabras o frases claves:

Semen Caprino
Diluyentes
Motilidad

El representante de la subcomisión de tesis solicitará a los miembros del jurado la lista de las palabras claves. Deben indicarse por lo menos cuatro (4) palabras clave.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso - 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Sub-área
Ciencias del Agro y el Mar	Producción Animal
	Ingeniería en Producción Animal

Debe indicarse por lo menos una línea o área de investigación y por cada área por lo menos un subárea. El representante de la subcomisión solicitará esta información a los miembros del jurado.

Resumen (Abstract):

El presente trabajo fue realizado con la finalidad de comparar el efecto de dos diluyentes de base TRIS (hidroximetilaminometano) Tris-yema (D1) y Triladyl® (D2) sobre la motilidad post-congelación, en la criopreservación de semen caprino. Se utilizaron 5 machos cabríos adultos, los cuales fueron evaluados con criterio zootécnico, a objeto de determinar sus aptitudes físicas y reproductivas para la recolección de semen. Los animales tenían condición corporal 3 y 4, la circunferencia escrotal varió desde 24,5 a 32cm. La recolección seminal se realizó con vagina artificial y se extrajeron tres muestras de semen no consecutivas por animal. Cada muestra de semen, fue evaluada antes de la congelación. De acuerdo a las evaluaciones realizadas, en el semen recolectado se observó coloraciones de blanco grisáceo y blanco amarillento, característicos de la especie, volúmenes de $1,1 \pm 07$ mL, porcentajes de motilidad individual de $83,6 \pm 8$ concentraciones espermáticas de $4.937,4 \pm 1.365,4 \times 10^6$ espz/mL. Cada muestra de semen fue dividida en dos partes iguales, para agregarles los diluyentes. Envasadas en pajuelas de 0,25mL, posteriormente fueron refrigeradas y congeladas en nitrógeno líquido. Antes de almacenarlas, se tomaron seis pajuelas por animal, tres por diluyente, se descongelaron a 37°C por 30 segundos. A las pajuelas descongeladas se les midió el porcentaje de motilidad individual post-congelación, a estos resultados se les calculó la media aritmética por diluyente, resultando 38,67% para D1 y 35,33% para D2. Se compararon por T-Student, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa entre los diluyentes.

Si el funcionario de SIBIUDO encargado de transcribir los metadatos encuentra este campo en blanco, debe copiarlo de la versión digital del texto del trabajo mediante “copiar y pegar”.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso - 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Coronado A. Luis F.	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
Rodríguez H. Tomás R.	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	10.516.528
	e-mail	carmencordova@hotmail.com
	e-mail	
Correa M. Alejandro E.	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	ROL	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Se requiere por lo menos los apellidos y nombres del tutor y los otros dos (2) jurados. El formato para escribir los apellidos y nombres es: "Apellido1 InicialApellido2., Nombre1 InicialNombre2". Si el autor esta registrado en el sistema CVLAC, se anota el código respectivo (para ciudadanos venezolanos dicho código coincide con el numero de la Cedula de Identidad). El campo e-mail es completamente opcional y depende de la voluntad de los autores. La codificación del Rol es: CA = Coautor, AS = Asesor, TU = Tutor, JU = Jurado.

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2010	11	05

Fecha en formato ISO (AAAA-MM-DD). Ej: 2005-03-18. El dato fecha es requerido.

Lenguaje: spa

Requerido. Lenguaje del texto discutido y aprobado, codificado usando ISO 639-2. El código para español o castellano es spa. El código para ingles en. Si el lenguaje se especifica, se asume que es el inglés (en).

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso - 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis_caprinos_lara.doc	OFFICCE 2003 (Word)

Caracteres permitidos en los nombres de los archivos: **A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 _ - .**

Alcance:

Espacial: _____ (opcional)

Temporal: _____ (opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Ingeniero en Producción Animal

Dato requerido. Ejemplo: Licenciado en Matemáticas, Magister Scientiarum en Biología Pesquera, Profesor Asociado, Administrativo III, etc

Nivel Asociado con el trabajo: Ingeniero

Dato requerido. Ejs: Licenciatura, Magister, Doctorado, Postdoctorado, etc.

Área de Estudio:

Producción Animal

Usualmente es el nombre del programa o departamento.

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente Núcleo Monagas

Si como producto de convenciones, otras instituciones además de la Universidad de Oriente, avalan el título o grado obtenido, el nombre de estas instituciones debe incluirse aquí.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso - 5/5

Derechos:

Los autores garantizamos en forma permanente a la Universidad de Oriente el derecho de archivar y difundir, por cualquier medio, el contenido de esta tesis. Esta difusión será con fines estrictamente científicos y educativos, pudiendo cobrar la Universidad de Oriente una suma a recuperar parcialmente los costos involucrados. Los autores nos reservamos los derechos de propiedad intelectual así como todos los derechos que pudieran derivarse de patentes industriales o comerciales.

Condiciones bajo las cuales los autores aceptan que el trabajo sea distribuido. La idea es dar la máxima distribución posible a las ideas contenidas en el trabajo, salvaguardarlo al mismo tiempo los derechos de propiedad intelectual de los realizadores del trabajo, y los beneficios para los autores y/o la Universidad de Oriente que pudieran derivarse de patentes comerciales o industriales.

Autor		
AUTOR	<i>Adirima</i> <u>ADÍRIMA DEL CARMEN</u> <u>LUZARDO NAVA</u> AUTOR	AUTOR
<i>Luis Coronado</i> <u>Prof. Luis Coronado</u> TUTOR	<i>Tomás Rodríguez</i> <u>Prof. Tomás Rodríguez</u> JURADO	<i>Alejandro Correa</i> <u>Prof. Alejandro Correa</u> JURADO
<i>Mayra Alfaro</i> <u>Profa. Mayra Alfaro</u> POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:		