



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

**CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE CAPRINO ADICIONADO CON
MELATONINA COMO ANTIOXIDANTE**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN INGENIERÍA AGRONÓMICA Y ZOOTECNIA

PRESENTA

AZUCENA HERNÁNDEZ CANCELADA

DIRECTOR DE TESIS

DR. EDGAR VALENCIA FRANCO

CODIRECTOR:

JOSE ALFREDO MEDRANO HERNANDEZ

TLATLAUQUITEPEC, PUEBLA, MÉXICO. MAYO DE 2024



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

**CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE CAPRINO ADICIONADO CON
MELATONINA COMO ANTIOXIDANTE**

**TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN INGENIERÍA AGRONÓMICA Y ZOOTECNIA**

**PRESENTA
AZUCENA HERNÁNDEZ CANCELADA**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. EDGAR VALENCIA FRANCO**

**CODIRECTOR
DR. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ**

**ASESORES
DRA. MARÍA DEL CARMEN ESPEJEL DEL MORAL
DR. NUMA P. CASTRO GONZÁLEZ**

TLATLAUQUITEPEC, PUEBLA, MÉXICO. MAYO DE 2024.

La presente tesis titulada: **CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE CAPRINO ADICIONADO CON MELATONINA COMO ANTIOXIDANTE** ha sido realizada por **AZUCENA HERNÁNDEZ CANCELADA**, ha sido revisada y aprobada por el siguiente consejo particular, para obtener el título de:

LICENCIADA EN INGENIERÍA AGRONÓMICA Y ZOOTECNIA

Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias

Consejo Particular Integrado por:

Firma

Director: Dr. Edgar Valencia Franco



Codirector: Dr. José Alfredo Medrano Hernández



Asesora: Dra. María Del Carmen Espejel Del Moral



Asesor: Dr. Numa P. Castro González



Tlatlauquitepec, Puebla, México. Mayo 2024

El presente trabajo forma parte del Cuerpo Académico dominado: BUAP-CA-182 Producción Pecuaria Integral y de la línea de investigación: Crioconservación de gametos y embriones de los animales domésticos. Dicho trabajo, fue financiado por la Universidad Nacional Autónoma De México, Facultad De Estudios Superiores Cuautitlán, Unidad De Investigación Multidisciplinaria Laboratorio 2.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, fuente de sabiduría y fortaleza por guardarme en este camino académico y brindarme la perseverancia necesaria para poder alcanzar esta meta el fue quien me ha bendecido con la capacidad de aprender y crecer a lo largo de mi trayectoria educativa.

Con profunda gratitud y amor dedico este logro a mis padres su inquebrantable apoyo de amor y fuerza que me mandaron desde el cielo por a pesar de no estar físicamente conmigo, siempre cuidaban de mi desde el cielo para darme la fuerza de continuar para concluir esta meta en mi vida y sé que a pesar de estar en el cielo están muy orgullosos de mí.



Quiero agradecerles a mis hermanos por brindarme su amor, apoyo, ánimo y comprensión han sido fundamentales y quienes creyeron siempre en mí. Los amo demasiado gracias por todo en verdad. Mayra Aurora Hernández Cancelada, Zuli Hernández Cancelada, Irma Gabriela Hernández Cancelada, Alfredo Hernández

Cancelada y Tomas Hernández Cancelada, por siempre estar al pendiente de mi por sus consejos, amor y por creer en mi gracias a ustedes cumplí esta meta.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle a la M.C Alicia Alcantar Rodríguez por todo el apoyo que me brindo durante este experimento y no dejarme sola y sobre todo confiar en que podía lograr mi objetivo por el cual vine, en verdad gracias doctora, durante este proceso llegue a estimarla demasiado y espero que esa esencia tan bonita que usted tiene siempre brille en usted.

Quiero agradecerle al Dr. José Alfredo Medrano Hernández por el apoyo y la confianza que me brindo durante el experimento, por creer en mí y darme en ciertos momentos esos consejos que yo necesitaba, espero que esa esencia tan agradable nunca la cambie y siempre siga siendo ese doctor tan aplicado y sobre todo esa energía tan agradable que transmite.

Quiero agradecerle a Daniel González Ruiz por haberme apoyado en el conocimiento y practica de mi trabajo y transmitirme otros conocimientos que necesitaba reforzar, gracias, Daniel por todo tu apoyo y sobre todo la paciencia que me tuviste al explicarme demasiadas cosas, mucha gracias y tu apoyo significa mucho para mí.

Agradecerle a la Dra. María Del Carmen Espejel Del Moral por todo su apoyo, amor y ánimos que me brindo durante mi estancia.

INDICE GENERAL

CONTENIDO	PAGINA
INDICE DE CUADROS	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRAC	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
III. HIPÓTESIS	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1 Caprinocultura en México.....	5
4.2 Características reproductivas del macho cabrío.....	5
4.3 Espermátogénesis en machos cabríos	6
4.4 Características del semen caprino	8
4.5 Inseminación artificial.....	8
4.6 Importancia de la crioconservación.....	9
4.7 Principal problema de la crioconservación	10
4.8 Importancia de la melatonina como antioxidante en espermatozoides	10
V. MATERIALES Y MÉTODOS	11
5.1. Ubicación	11
5.2 Ubicación geográfica de Cuautitlán Izcalli	11
5.2.1 Unidades experimentales.....	11
5.2.2 Tratamientos experimentales.....	11

5.3 Recolección de semen	12
5.3.1 Evaluación Microscópica de los Espermatozoides	12
5.4 Variables evaluadas	13
5.4.1 Motilidad Masal (MM).....	13
5.4.2 Concentración espermática	13
5.4.3 Motilidad progresiva lineal	14
5.4.4 Viabilidad	14
5.4.5 Morfoanomalias	15
5.4.6 Funcionalidad de la membrana plasmática	16
5.4.7 Integridad del acrosoma	16
5.5 Enfriado y tratamientos de melatonina (MLT)	17
5.6 Congelación.....	17
5.7 Descongelación de las pajillas.....	18
5.8 Análisis estadístico de los datos	18
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
6.1 Características del semen fresco	19
6.2 Características de los espermatozoides caprinos al descongelado adicionados con melatonina	21
6.3 Características de los tratamientos entre los machos	22
VII. CONCLUSION	23
VIII. LITERATURA CITADA	24

ÍNDICE DE CUADROS

CONTENIDO	PAGINA
Cuadro 1. Distribución de tratamientos experimentales	12
Cuadro 2. Escala de motilidad masal.....	13
Cuadro 3. Características del semen fresco.....	19
Cuadro 4. Características del semen fresco.....	20
Cuadro 5. Características de los espermatozoides caprinos al descongelado adicionado con melatonina.....	21
Cuadro 6. Características de los tratamientos entre machos.....	22

INDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PAGINA
Figura 1. Proceso de espermatogénesis ilustrando las etapas de espermatocitogénesis, meiosis, espermiogénesis y espermicion Saladin (2013)	7
Figura 2. Clasificación de los efectos morfológicos de los espermatozoides. Adaptación de Criterio de Kruger (2010)	15

RESUMEN

La crioconservación de semen es una importante biotecnología reproductiva, ya que busca promover la conservación de semen por tiempo indeterminado. Cuando esta biotecnología se asocia a la inseminación artificial, representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad. Por ello se han realizado investigaciones con la adición de melatonina, la cual funciona como un antioxidante y favorece a la criosupervivencia espermática. Por ello se recolectó el semen de 4 machos de la raza Saanen (5 eyaculados por macho), durante el verano en los meses de junio- septiembre. Los espermatozoides se diluyeron en un medio de Tris-yema de huevo que contenía glicerol (200 millones de células/ml, 4%), luego se tomaron alícuotas y se suplementaron con (i) 0.0 (ii)1.5 y (iii) 3.5 de MTL. Los espermatozoides diluidos se empaquetaron en pajillas de plástico y se congelaron, las pajillas se descongelaron en un baño maría a una temperatura de 37°C durante 30 segundos. Los espermatozoides fueron evaluados, antes y después de la criopreservación para el movimiento de onda (visual), motilidad progresiva (eosina-nigrosina), funcionalidad de la membrana plasmática (Host) y la integridad del acrosoma (con contraste de fase). Los datos se convirtieron en arcoseno para normalizarlas ante ANOVA. Después de la congelación y descongelación, no hubo diferencias significativas en ninguna de las variables en los tratamientos de MLT, excepto el movimiento de onda es mayor en 1.5 y 3.5 mM que, en el control, no hubo diferencias entre los machos individuales dentro de los tratamientos.

Palabras claves: Crioconservación, Melatonina, Glicerol, Antioxidante.

ABSTRACT

The cryopreservation of semen is an important reproductive biotechnology, since it seeks to promote the conservation of semen for an indefinite time. When this biotechnology is associated with artificial insemination it represents an efficient mechanism for the promotion and dissemination of genetic material of excellent quality. Therefore, research has been done with the addition of melatonin, which works as an antioxidant and promotes cryopreservation in the sperm. Therefore the semen was collected from 4 males of the Saanen breed (five ejaculations per male), during the summer in the months of June-September. Sperm were diluted in a Tris-egg yolk medium containing glycerol (200 million cells/ml, 4%), then aliquots were taken and supplemented with (i) 0.0 (ii) 1.5 and (iii) 3.5 MTL. Diluted spermatozoa are packed in plastic straws and frozen, the straws thawed in a water bath at a temperature of 37°C for 30 seconds. The sperm were evaluated before and after cryopreservation for wave (visual) motion, progressive motility (eosin-nigrosin), plasma membrane functionality (hoast) and acrosome integrity (with phase contrast). The data became arcsine to normalize them before ANOVA. After freezing and thawing, there weren't significant differences in any of the variables in MLT treatments, except wave movement is greater at 1.5 and 3.5 mM than, in the control, there weren't differences between the individual males within the treatments.

Keyword: Cryopreservation, Melatonin, Glycerol, Antioxidant.

INTRODUCCIÓN

En México la población de caprinos está constituida por aproximadamente 8.7 millones de cabezas (SIAP 2021). Las entidades con mayor población caprina son: Puebla (15.4%), Oaxaca (12%); San Luis Potosí (10.5%); Guerrero (7.9%), y Zacatecas (6.1%) y las razas que se producen principalmente en México son: Alpina, Angora, Boer, Anglo,nubia, Saanen, Toggenburg y la Criolla. (SADER, 2023).

Por otra parte, la criopreservación es una importante biotecnología cuando se asocia a la inseminación artificial, que representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad. Además, proporciona una economía para el productor, así como reducir los costos de alimentación y transporte tanto los riesgos de transmisión de enfermedades sexuales (Castelo *et al.*, 2008).

Un problema frecuente en la conservación del semen es el estrés oxidativo en los espermatozoides, esto se refiere al daño que pueden sufrir estas células en su morfología y funcionalidad causado por la formación de altas cantidades de moléculas de radicales libres, llamadas ROS presentes durante la manipulación del procesamiento y criopreservación del semen (Kothari *et al.*, 2010). Las moléculas de radicales libres incluyen ROS, los cuales son metales de transición y especies de nitrógeno reactivo, pero las ROS son las más dañinas para las células (Aitken *et at.*,2014).

Como alternativa a esta problemática algunos investigadores han utilizado la melatonina como una molécula lipofílica derivada del triptófano, la cual está presente en vertebrados e invertebrados, bacterias, organismos unicelulares e incluso en plantas (Reiter *et al.*,2010). Funciona a nivel celular la melatonina como un antioxidante en base a su capacidad para secuestrar y neutralizar los radicales libres. El mecanismo directo es por donación de electrones (Tan *et al.*,2007). Por lo tanto, la melatonina debe estar cerca de los radicales libres para que estén en el momento que se forman; debido a su estructura lipofílica (Jang *et al.*, 2010).

La melatonina juega un papel protector en la conservación del esperma el cual se basa en sus propiedades antioxidantes y antiapoptóticas que pueden mantener y mejorar la calidad del esperma a lo largo del proceso (Reiter, 2007).

Sin embargo, se han reportado que altas dosis de melatonina pueden reducir el potencial de fertilización en los espermatozoides después de la crioconservación. Dado que la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) neutraliza en exceso, la fosforilación oxidativa puede inhibirse y, en consecuencia, se reduce la motilidad y viabilidad de los espermatozoides (Souza *et al.*, 2008).

Por lo analizado en este trabajo se evaluará la melatonina como un antioxidante, en la crioconservación de semen de caprino para mejorar la viabilidad espermática.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Evaluar la melatonina como un antioxidante, en la crioconservación de semen para mejorar la viabilidad espermática.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar el efecto de diferentes dosis de melatonina sobre la motilidad, viabilidad, funcionalidad de la membrana plasmática e integridad del acrosoma en espermatozoides descongelados.
- Comparar la criosupervivencia espermática de diferentes machos caprinos de la raza Saanen.

III. HIPÓTESIS

La adición de melatonina al diluyente de congelación mejorará la criosupervivencia de espermatozoides de caprino.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Caprinocultura en México

En Mexico la población de caprinos está constituida por aproximadamente 8.7 millones de cabezas (SIAP, 2021). Las entidades con mayor población caprina son: Puebla (15.4 %), Oaxaca (12 %); San Luis Potosí (10. 5%); Guerrero (7.9 %), y Zacatecas (6.1 %) y las razas que se producen principalmente en México son: Alpina, Angora, Boer, Anglo, Nubia, Saanen, Toggenburg y la Criolla (SADER,2023).

En nuestro país la producción de cabras está asociada a sistemas tradicionales extensivos, dependientes de las condiciones climáticas lo cual agrava la situación de las granjas. Asimismo, la situación socioeconómica de los productores no es la más eficiente, en este caso con lo que nos enfrentamos es aún círculo de la pobreza, deterioro ambiental y por ende baja producción caprina. La cabra es una de las especies zootécnica con mayor potencial y rentabilidad, sean demostrado con una excelente opción por su adaptación a las condiciones críticas en las que vivimos actualmente (Gómez *et al.*,2009).

4.2 Características reproductivas del macho cabrío

El semental caprino tiene un importante papel debido a su colaboración inexcusable en la reproducción, ya que tiene un valor genético de su capacidad productiva que permite que mejorare los índices reproductivos y productivos en consecuencia de incrementar la rentabilidad de la explotación caprina. La capacidad reproductiva de un semental está basada generalmente en el tamaño testicular, las características seminales y su capacidad para la monta. El cuerpo testicular se considera un buen indicador de la capacidad fecundante del macho ya que la producción espermática es proporcional al peso del testículo (Arrebola, 2012).

En la pubertad el macho cabrío inicia con la producción de los primeros espermatozoides a partir de los 4-6 meses de edad, aunque su madurez sexual no llega hasta los 7-8 meses. Por este motivo, no es recomendable la monta natural ni la colecta de eyaculados hasta ese momento. Por otro lado, los parámetros reproductivos del macho cabrío pueden depender de una serie de

factores intrínsecos (como raza y edad) y extrínsecos (como fotoperiodo, clima, método y ritmo de colectas o montas, grado de estimulación sexual, interacciones sociales y nutrición). La edad es otro de los puntos intrínsecos que afectan a las características reproductivas (Delgadillo *et al.*, 2004).

El tamaño testicular puede aumentar hasta alcanzar su máximo a la edad de siete años, observándose también variaciones significativas de las características seminales, siendo el volumen y la concentración que más vibran (Arrebola, 2012). Los sementales de capacidad lechera producen semen de buena calidad de manera uniforme entre los 7-9 meses y los 7 años la calidad seminal disminuye en gran medida. El desarrollo de la actividad sexual del macho cabrío presenta ciertas características propias que pueden ser modificadas por una serie de circunstancias que marcarán la eficacia de su función reproductiva. Así pues, el comportamiento sexual y la calidad seminal varían en función de la edad y de la raza, aunque la estación del año es lo que más influye en las zonas templadas, ya que se observa una disminución del número de montas durante el anestro estacional (Delgadillo *et al.*, 2009).

4.3 Espermatogénesis en machos cabríos

Este es un proceso donde comienza la formación de las células sexuales, desde las más inmaduras, hasta las más maduras para poder llegar a la formación de los espermatozoides. La espermatocitogénesis en los machos cabríos corresponde a la etapa donde se desarrollan las espermatogonias en el inicio de la pubertad, las espermatogonias tipo A crecen e inician un proceso de diferenciación hasta formar espermatogonias tipo B (Zhang *et al.*, 2009). Posteriormente se desarrolla la primera división meiótica, en la que se forman los espermatocitos primarios y tras la terminación de la meiosis I cada uno de los espermatocitos primarios ocasiona a dos espermatocitos secundarios con los que inicia la meiosis II y al finalizar esta segunda meiosis se obtienen cuatro espermátidas haploides necesarias para iniciar la siguiente fase del proceso. Las cuatro etapas en las que se desarrolla la espermatogénesis son: Espermatocitogénesis, meiosis, espermiogénesis y espermiación, las cuales están representadas en la Figura 1 (Saladin, 2013).

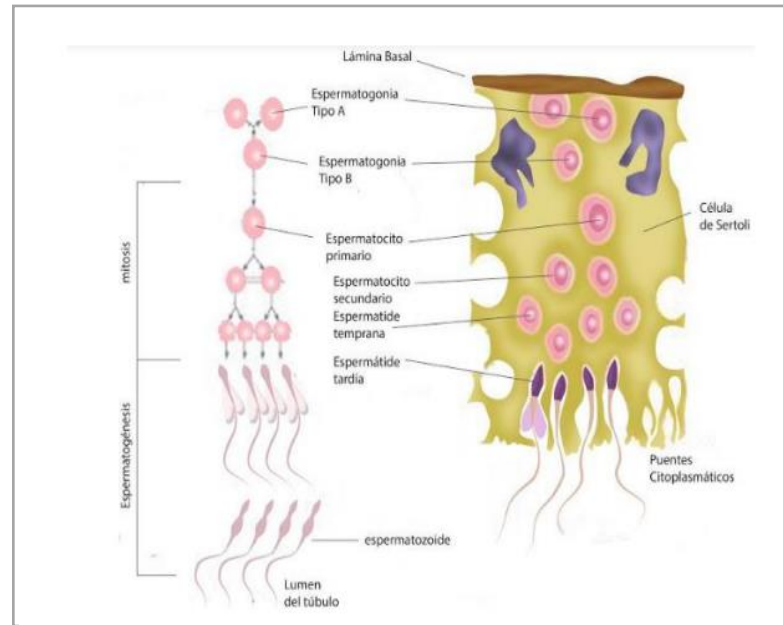


Figura 1. Proceso de espermatogénesis ilustrando las etapas de espermatocitogénesis, meiosis, espermiogénesis y espermicion (Saladin, 2013).

Al generar las espermátidas, mediante la espermiogénesis se producen una serie de cambios a nivel citológico, que resultan en la formación de espermatozoides. Entre ciertas modificaciones se destaca una condensación de la cromatina, la formación del flagelo y el condensamiento de las mitocondrias para poder finalizar el proceso con la espermiación. Los espermatozoides formados, pasan de los túbulos seminíferos al epidídimo para comenzar con su maduración. Se estima que un ciclo espermatogénico tiene una duración aproximada de 40 a 58 días en machos cabríos (Mclachlan *et al.*, 2002). En este proceso por el cual se regula el funcionamiento reproductivo depende también de la liberación de otras hormonas por parte del sistema endócrino como la FSH (Hormona foliculoestimulante) y la inhibina, manteniendo regulada la actividad mitótica (Mclachlan *et al.*, 2002). En vínculo con las células de Sertoli es la célula que sirve de soporte para el desarrollo de las espermatogonias en el testículo, otros factores regulatorios para su desarrollo proveen la señalización de procesos apoptóticos de los espermatocitos (Pino *et al.*, 2013).

4.4 Características del semen caprino

El semen en caprinos y otras especies como bovinos, cerdos, caballos y perros, se comenzaron a determinar a partir del interés en la inseminación artificial (IA) (Karagiannidis *et al.*, 2000). El semen de macho cabrío tiene un color blanco grisáceo o amarillento, ya que en ocasiones puede variar de un eyaculado a otro, aun así, siendo en el mismo semental. El semen del macho cabrío cuenta con un volumen promedio de eyaculado de 1.2 ml, aunque esto va dependiendo de la edad y condición que tenga el animal, también tiene una concentración espermática que va desde 3.5 hasta 6 millones de espermatozoides por mililitro y con una consistencia que varía desde clara-acuosa hasta cremosa espesa dependiendo de la relación de contenido entre sus dos constituyentes que son espermatozoides y plasma seminal (Arrebola, 2012).

Los parámetros que se manejan en el semen y que sean estudiado rutinariamente son: el volumen del eyaculado, el número total de espermatozoides por eyaculado, la motilidad espermática, la concentración espermática, el porcentaje de espermatozoides normales y no normales, el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto y dañado, el tiempo de sobrevivencia, el color, el olor, la consistencia y el pH (Karagiannidis *et al.*, 2000).

4.5 Inseminación artificial

La inseminación artificial (IA) son herramientas importantes de las biotecnologías reproductivas en caprinos como en otras especies domésticas, esta una herramienta que permite el aumento masivo del potencial productivo de los caprinos al multiplicar en forma considerable la capacidad reproductiva de los machos los cuales siempre deben tener ciertas características reproductivas sobresalientes como actividad sexual poliéstrica estacional, con varios celos y ovulación espontánea durante su época reproductiva entre otras , para inseminar se necesita obtener semen de machos donantes, que han sido preparados con anterioridad (Moreno, 2015).

En la mayoría de las especies la inseminación artificial es un instrumento fundamental para el progreso genético (Holt *et al.*, 2005), ya que también proporciona un medio para resolver los problemas de enfermedades de transmisión sexual Thomassen y Farstad (2009). Una alternativa es la criopreservación de semen ya que se utiliza principalmente para llevar a cabo programas de IA para guardar y transportar material genético para la conservación de varias especies animales como perros, caprinos, cerdos entre otras especies (Benson *et al.*, 2012). Entonces la inseminación puede definirse como la aplicación de semen en el tracto genital de una hembra en el momento efectivo para la fecundación (Mara *et al.*, 2004).

4.6 Importancia de la crioconservación

Una de las biotecnologías más sobresalientes en estos últimos años es la crioconservación de semen ya que busca promover la criopreservación de los espermatozoides por un tiempo indeterminado. Esta biotecnología, cuando se asocia a la inseminación artificial, representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad. La crioconservación de semen proporciona una economía para el productor, al reducir los costos de alimentación y transporte de los reproductores, así como los riesgos de transmisión de enfermedades sexualmente transmisibles (Castelo *et al.*, 2008).

Se han desarrollado diferentes protocolos para la criopreservación de espermatozoides. Pero embargo, la fertilidad obtenida por IA empleando los espermatozoides congelados-descongelados suele ser menor que la obtenida mediante apareamiento natural o IA utilizando espermatozoides frescos o enfriados Setiawan y Aryana (2023).

4.7 Principal problema de la crioconservación

Uno de los problemas más frecuentes en la crioconservación es la baja fertilidad que atribuye principalmente a las ROS que se desempeñan funciones importantes, como la señalización intra o intercelular (Aitken, 2012) excesiva de las llamadas especies reactivas de oxígeno conocidas como ROS (especies reactivas del oxígeno) presentes durante la manipulación, procesamiento y criopreservación del semen (Kothari *et al.*, 2010). Los ROS son alteraciones en la membrana plasmática de los espermatozoides esto provoca dificultad para que se pueda fecundar el óvulo de la hembra. Estos efectos perjudiciales de los ROS en los espermatozoides incluyen la peroxidación de lípidos, las lesiones del acrosoma, las alteraciones metabólicas, la desnaturalización del ADN y la pérdida de la capacidad de fertilización, por ello para reducir la cantidad de especies reactivas de oxígeno se han realizado protocolos de antioxidantes como la melatonina para disminuir los ROS (Benson *et al.*, 2012).

4.8 Importancia de la melatonina como antioxidante en espermatozoides

Los antioxidantes cumplen una función muy importante en las sustancias ya que son capaces de retardar o prevenir la oxidación de cualquier sustrato oxidante. Se han utilizado diferentes compuestos para lograr ese papel. Uno de tantos antioxidantes es la hormona llamada melatonina que participa en varios pasos de la fisiología del espermatozoide y que ha mejorado la viabilidad y la fertilidad del espermatozoide cuando se agrega a los espermatozoides a nivel celular la melatonina tiene un papel importante como antioxidante basado en la capacidad para secuestrar y neutralizar los radicales libres conocidas también como (ROS) el mecanismo directo es por donación de electrones (Tan *et al.*, 2007). Por ello, la melatonina debe estar cerca de los radicales libres en el momento en que se forman; debido a su estructura lipofílica que tiene, la melatonina puede funcionar de manera eficiente en varios compartimentos celulares (Tan *et al.*, 2013).

Por ello en el espermatozoide la melatonina reduce el daño oxidativo en las mitocondrias, la fragmentación del ADN, la peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática y los marcadores apoptóticos al mejorar la actividad antioxidante de los sistemas enzimáticos y reducir los niveles de ROS (Henkel, 2011).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Ubicación

La presente investigación se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4 (FESC C-4), Universidad Autónoma de México (UNAM), en el laboratorio 2 de reproducción animal (L2) de la unidad de investigación multidisciplinaria (UIM) y en el área de Posgrado de la FES Cuautitlán (UNAM), localizado en la ubicación del km 2.5 de la carretera Cuautitlán-Teoloyucan Municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México (INEGI,2020).

5.2 Ubicación geográfica de Cuautitlán Izcalli

La cabecera municipal Cuautitlán Izcalli se localiza en las coordenadas geográficas 99°12'41" O de longitud y 19°38'46" N de latitud. Que se encuentra a una altitud de 2,281 msnm, cuenta con un clima templado subhúmedo con lluvias de verano (INEGI, 2020).

5.2.1 Unidades experimentales

En el siguiente trabajo se utilizaron 4 machos cabríos de la raza Saanen de una edad de 3 a 4 años del área de Posgrado de la FES Cuautitlán (UNAM), estos animales fueron alojados en los corrales del área de posgrado de la FES Cuautitlán, UNAM; los animales llevaron una dieta de una mezcla de alfalfa henoificada y concentrado comercial (10% PC y 1.91 Mcal/Kg de EM), aproximadamente 2 kg por animal por día y agua de *ad libitum*.

5.2.2 Tratamientos experimentales

Se hizo una recolección de semen para valorar el uso de un antioxidante en este caso la melatonina como supervivencia en la crioconservación para la mejorar la viabilidad espermática y se probaron 3 tratamientos los cuales están representados en el cuadro 1:

Cuadro 1. Distribución de tratamientos experimentales

Tx	PBS + DMSO	MLT
T1 0	131.25 ml	0
T2 1.5 mM	75 ml	56.25 ml
T3 3.5 mM	0 ml	131.25 ml

Tx= T1:0 de melatonina, T2: 1.5 mM de melatonina, T3: 3.5 mM de melatonina, PBS: disolución salina tamponada con fosfato + DMSO: dimetilsulfóxido y MLT= Melatonina.

5.3 Recolección de semen

Se colectó el semen de los machos cabríos durante los meses de junio a septiembre utilizando una vagina artificial a cada macho se le extrajo 5 muestras. A cada eyaculado se le agrego un medio de transporte de acuerdo con la metodología descrita por (Sánchez- Partida, 1998) que menciona que está compuesto por Tris, Glucosa, Acido Crítico, Penicilina, Estreptomina en una proporción 1/1 (v/v). Una vez recolectado el semen se hizo una evaluación macroscópica que comprende volumen, color, consistencia (cremoso, lechoso, acuoso) y presencia de partículas extrañas (sangre, paja, excremento, tierra, etc.) después de hacer la detección el semen fue transportado al laboratorio de Reproducción Animal (L2) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, en una caja térmica a una temperatura promedio de 34°C.

5.3.1 Evaluación Microscópica de los Espermatozoides

Al llegar al laboratorio el semen colectado la cual comprende de motilidad masal, motilidad progresiva lineal, viabilidad y morfoanomalías (tinción Eosina/Nigrosina), funcionalidad de la membrana plasmática (prueba del hinchamiento hiposmótico – HOST), integridad del acrosoma (microscopia de contraste de fases), y la concentración espermática (cámara de Neubauer).

La evaluación microscópica, excepto la motilidad masal ya que se observa al llegar al laboratorio con el semen fresco, después de observarlo se realizó una dilución 1:100 (100 µL semen entero: 9.9 ml solución salina fisiológica 0.9% NaCl).

El resto de los eyaculados se procesó de acuerdo a la técnica de Cabrera (2005) que consiste en centrifugado a 700 g por 15 minutos para remover el plasma seminal y el medio de transporte, el botón de células será resuspendido en 1.0 ml de medio de congelación Tris-Yema de huevo sin glicerol (Tris 250 mM, glucosa 28 mM, ácido cítrico 104 mM, estreptomicina 0.05% y penicilina 500 UI, más yema de huevo 12 %; se estimó la concentración para ajustar a 400 millones células/ml agregando la cantidad necesaria de medio de congelación Tris-Yema de huevo sin glicerol. Cada eyaculado se evaluó y proceso por separado.

5.4 Variables evaluadas

5.4.1 Motilidad Masal (MM)

Para esta prueba se colocó una gota de semen entero (fresco) en el centro de un portaobjetos, atemperado a 37°C en una platina térmica, y se observó en el microscopio con el objetivo de 10 x; la observación se hizo en los bordes de la gota.

Para esta evaluación se consideraron los siguientes criterios que se muestran en el cuadro 2:

Cuadro 2. Escala de motilidad masal.

Valor	Características
3	Movimiento rápido, formación de ondas vigorosas
2	Movimiento lento, formación de ondas, pero con poco vigor
1	Movimiento individual de algunos espermatozoides, no se forman ondas
0	Ondas inexistentes, espermatozoides inmóviles

Modificado de Baril *et al.*, (1993).

5.4.2 Concentración espermática

Para esta prueba se utilizó un tubo de ensayo al cual se le agregó 1990 µL de solución salina formolada al 3% (v/v) y se agregó 10 µL del semen diluido (1:100) para finalmente tener una dilución de 1:200; ambas soluciones se mezclaron, posteriormente se llenó la cámara de Neubauer y se dejó reposar por 5 minutos para que se sedimentaran las células y se pudieran observar en el microscopio óptico con objetivo de 40 x. El conteo se realizó de la siguiente manera: se localizó la cuadrícula central de la cámara que está dividida en 25 cuadros,

subdivididos en 16 cuadros cada uno; se realizó el conteo de los espermatozoides (cabezas) contenidos en 5 de los 25 cuadros; el número resultante se multiplica por 10 millones para obtener la concentración de espermatozoides por mililitro (ml) de semen.

5.4.3 Motilidad progresiva lineal

Para esta prueba se tomó una gota del semen diluido 1:100, que se encontraba en el baño maría a una temperatura de 32 °C y se colocó una gota en un portaobjetos, se colocó un cubreobjetos encima de la gota y se observó en el microscopio con el objetivo 10 x y 20 x. Se enfocó el lente del microscopio en el centro de la gota, se estimó la proporción de espermatozoides con movimiento progresivo y rectilíneo asignándole algún valor entre 0 – 100 expresado en porcentaje.

5.4.4 Viabilidad

Para esta prueba se añadió una gota del semen diluido 1:100 que se encontraba en el baño maría en el portaobjetos atemperado a 37°C en la platina térmica, junto a la gota de la semen diluido se añadió otra gota de tinción Eosina-Nigrosina a una temperatura de 32°C; se mezclaron ambas gotas y se realizó un frotis, se colocó rápidamente bajo un ventilador para que se pudiera secar rápido, después de 10 minutos se observó al microscopio con el objetivo de 100 x y aceite de inmersión, contando 200 células en total para posteriormente expresarlo en porcentaje. Los espermatozoides vivos no se tiñen, se observan de color blanco, en cambio los muertos se tiñen y se ven de color rosa-morado lo menciona Barth y Oko (1989).

5.4.5 Morfoanomalias

La técnica para evaluar morfoanomalias descrita por Barth y Oko (1989) utiliza el frotis usado para la viabilidad con un conteo de 200 células en total y expresado el resultado de cada tipo en porcentaje. Para la clasificación se realizó como se muestra en la figura 2. Kruger (2010).

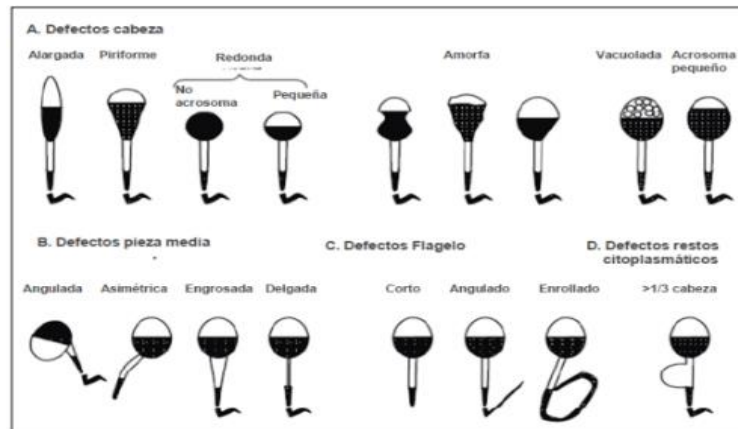


Figura 2. Clasificación de los defectos morfológicos de los espermatozoides. adaptación del criterio de (Kruger y Coetzee,2010).

La clasificación adaptada por el criterio (Kruger y Coetzee,2010) consta por 3 puntos:

1. Normales: Se considera espermatozoides morfológicamente normales a aquellos integrantes de una subpoblación de espermatozoides potencialmente fertilizadores seleccionados naturalmente en el moco cervical.
2. Anormalidades primarias: Poseen una anchura de 2 a 3.5 μm , pueden presentar anormalidades ligeras en la forma de la cabeza, pero el acrosoma debe ser normal, y no tener defecto en el cuello, pieza intermedia o cola.

3. Anormalidades secundarias: Son aquellos que presentan defectos tanto en la cabeza, cuello, pieza intermedia y cola.

5.4.6 Funcionalidad de la membrana plasmática

Se colocaron 100 μL de una solución hiposmótica (60 mOsm kg^{-1}) y 100 μL de semen diluido 1:100, ambas a 32°C , en un tubo de ensaye, y se mezclaron, esta suspensión se mantuvo en un baño maría por 30 minutos (Cano-Suarez, 2012). Al finalizar este tiempo, se agregó una gota de solución de glutaraldehído al 0.4%, se colocó una gota de esta mezcla en un portaobjetos, y un cubreobjetos arriba de la gota y se observó en el microscopio óptico con el objetivo de 100x y aceite de inmersión, se contaron 200 células en total, el resultado de cada tipo se expresó en porcentaje. El criterio para determinar si la membrana es funcional fue que los espermatozoides presentaran algún enroscamiento de la cola (hinchazón) si fue así entonces tienen membrana funcional, al contrario, aquellos cuya cola es recta no tienen membrana plasmática funcional (Jeyendran *et al.*, 1984).

En esta prueba se realizó una modificación ya que los espermatozoides con esta dilución no mostraron enroscamiento en la cola, así que se realizó la siguiente dilución 1:5 en agua destilada, se deja 5 minutos y se agrega una gota de glutaraldehído al 0.4% (Partyka *et al.*, 2012).

5.4.7 Integridad del acrosoma

Para esta prueba se empleó la técnica Barth y Oko, (1989) que consiste en la fijación en glutaraldehído y la microscopía de contraste de fases para poder observar el acrosoma. Se mezclaron 100 μL del semen diluido 1:100 con 100 μL de glutaraldehído al 0.4%, en un tubo eppendorf posteriormente se colocó una gota de esta mezcla en un portaobjetos y encima un

cubreobjetos; se observó en un microscopio de contraste de fases con el objetivo de 100x y aceite de inmersión. Se realizó un conteo de 200 células considerando que las que tengan un borde apical liso y bien definido se consideraron células con acrosoma intacto, las que presenten el borde apical rugoso, incompleto, ausente o con formaciones tipo cráter, se considerarán células con acrosoma dañado, la cantidad de cada tipo se expresó en porcentaje.

5.5 Enfriado y tratamientos de melatonina (MLT)

En esta parte comenzamos con la primera dilución, la cual se adicionó el diluyente de congelación Tris-Yema de huevo con glicerol (8%) en una proporción 1:1 (v/v) lentamente y cada 10 minutos en pequeñas fracciones para minimizar el estrés osmótico; la concentración final de espermatozoides y glicerol será 200×10^6 células/ml y 4% de glicerol. En este momento se agregaron los tratamientos de melatonina (MLT), los cuales se probaron 3 tratamientos: i) 0, ii) 1.5 y iii) 3.5 mM; pasados 10 minutos de la adición de MLT se revisó la motilidad progresiva para asegurarse de que los espermatozoides permanecen viables hasta este momento de la agregación de melatonina.

Enseguida, los espermatozoides diluidos fueron empacados en pajillas de plástico de 0.25 ml, las pajillas (previamente identificadas con fecha y el número de macho) fueron selladas con alcohol polivinílico (PVA), y se dejaron 5 minutos en agua para que se formara el tapón. Las pajillas fueron transferidas a un recipiente especial con agua, en el que cada pajilla se colocó dentro de un cilindro en posición vertical, de tal forma que las pajillas se mantienen separadas unas de otras, secas y a la temperatura del recipiente con agua. Toda esta etapa se realizó a una temperatura de cuarto 24°C aproximadamente (Jiménez *et al.*, 2015).

5.6 Congelación

Inmediatamente después, el recipiente con las pajillas fue introducido en un refrigerador común; a una temperatura de enfriado a 5°C se el cual se llevó a cabo en un periodo de 2-3

horas. Cuando las pajillas se encontraban a una temperatura de 5°C, fueron expuestas a vapores de nitrógeno durante unos 15 minutos, posteriormente fueron sumergidas en nitrógeno líquido y almacenadas en un tanque de nitrógeno (mínimo un mes) hasta su descongelación. Se congelaron 3 pajillas de cada tratamiento de MLT (Vázquez *et al.*,2001).

5.7 Descongelación de las pajillas

Las pajillas fueron extraídas del tanque de nitrógeno e inmediatamente después fueron sumergidas en un baño maría a una temperatura de 37°C por 30 segundos, el contenido de cada pajilla fue depositado en un tubo de ensayo vacío en el baño maría; 10 minutos después se realizó una dilución 1:10 de solución salina fisiológica (espermatozoides descongelados: SSF) para evaluar las variables descritas anteriormente (Corredor *et al.*, 2014).

5.8 Análisis estadístico de los datos

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS v15.0 (Chicago, 2006).

Los datos fueron analizados mediante ANOVA y prueba de Tukey, las cuales ayudan a comparar la varianza entre las medias de diferentes grupos y de ser el caso, comparar entre estas medias que difieren, previamente, los datos fueron transformados al arcoseno para normalizarlos.

Los resultados fueron expresados con la media \pm error estándar de la media. El nivel de significancia fue establecido en $P < 0.05$.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Características del semen fresco

Las muestras de espermatozoides frescos presentaron resultados inferiores a ($P > 0.05$) en los parámetros de volumen de 2.3 ± 0.20 , motilidad masal de 3.0 ± 0.0 el porcentaje de motilidad progresiva fue 87.5 ± 1.17 con el porcentaje morfoanomalias normales de 85.2 ± 1.11 , se muestran los resultados en el Cuadro 3.

Uno de los principales lugares donde se almacenan los espermatozoides es en la cola del epidídimo, esto permite que las células permanezcan viables y móviles por varias semanas Alberts *et al.*, (2006).

García (2015) menciona que el obtuvo resultados inferiores en el análisis del semen fresco, teniendo un volumen (ml) de 0.9 ± 0.3 analizando este trabajo se obtuvo un volumen superior de 2.3 ± 0.20 , él tuvo una motilidad masal de 2.3 ± 0.3 en este trabajo se obtuvo superior motilidad masal de 3.0 ± 0.0 , el obtuvo una motilidad progresiva de 40.6 ± 2.3 y en este trabajo se obtuvo un resultado superior de 87.5 ± 1.17 .

Llivi (2015) menciona que él tuvo un porcentaje de morfoanomalias normales de 89 % y en este trabajo se obtuvo un resultado menor el cual fue de 85.2% de morfoanomalias normales.

Cuadro 3. Características del semen fresco

Macho	Volumen (ml)	Motilidad masal	Motilidad progresiva (%)	Morfoanomalias Normales (%)	Morfoanomalias Primarias (%)	Morfoanomalias Secundarias (%)
1	2.9 ± 0.68	3.0 ± 0.0 a	88.0 ± 3.00 a	85.3 ± 1.41 a	8.56 ± 1.62 a	6.1 ± 1.57 a
2	1.8 ± 0.12	3.0 ± 0.0 a	86 ± 2.45 a	80.3 ± 2.74 a	13.5 ± 2.54 a	5.4 ± 0.84 a
3	2.4 ± 0.24	3.0 ± 0.0 a	89 ± 1.87 a	87.4 ± 2.05 a	9 ± 1.19 a	3.5 ± 1.08 a
4	2.9 ± 0.29	3.0 ± 0.0 a	87 ± 2.55 a	88.1 ± 0.76 a	8.6 ± 1.12 a	3.2 ± 0.81 a
Media General	2.5 ± 0.20	3.0 ± 0.0 a	87.5 ± 1.17 a	85.2 ± 1.11 a	9.9 ± 0.92 a	4.55 ± 0.58 a

Valores con diferentes letras dentro de la misma columna difieren estadísticamente ($P > 0.05$).

Respecto a la calidad inicial del semen utilizado (media \pm error estándar) para la realización del presente análisis seminal se obtuvieron 20 muestras, se obtuvo una integridad del acrosoma en porcentaje de 43.8 ± 2.47 con una concentración espermática $\times 10^6/\text{ml}$ de 5478.1 ± 398.70 con un porcentaje de viabilidad E/N de 80 ± 1.06 y con un porcentaje de funcionalidad de la membrana plasmática tras la prueba de Host de 72.22 ± 4.18 , se muestran los resultados en el cuadro 4.

García (2015) menciona que obtuvo un resultado mayor el cual fue de 67.9 ± 3.1 y en este trabajo se obtuvo un resultado menor de 43.8 ± 2.47 el obtuvo una viabilidad de E/N menor de 68.1 ± 1.6 , sin embargo, en este trabajo se obtuvo una viabilidad de E/N favorable de 80 ± 1.06 y por último una funcionalidad de la membrana plasmática obtuvo un promedio bajo el cual fue de 67.9 ± 3.1 y en este presente trabajo que se realizó se obtuvo un resultado mayor el cual fue de 72.22 ± 9.18 .

Cuadro 4. Características del semen fresco

Macho	Volumen	Integridad del Acrosoma	Concentración espermática $\times 10^6/\text{ml}$	Viabilidad E/N (%)	Funcionalidad de la membrana plasmática Host (%)
1	2.9 \pm 0.68	52.0 \pm 8.74 a	6153.33 \pm 899.07 a	81.6 \pm 2.00 a	78.0 \pm 4.87 a
2	1.8 \pm 0.12	36.8 \pm 2.11 a	6130 \pm 1049.20 a	77.3 \pm 1.68 a	60.3 \pm 15.3 a
3	2.4 \pm 0.24	42 \pm 1.17 a	4668 \pm 681.64 a	78.3 \pm 2.42 a	73.3 \pm 3.75 a
4	2.9 \pm 0.29	43.9 \pm 1.30 a	5492 \pm 757.59 a	83.2 \pm 1.76 a	77.3 \pm 3.75 a
Media General	2.5 \pm 0.20	43.8 \pm 2.47 a	5478.1 \pm 398.70 a	80.1 \pm 1.06 a	72.22 \pm 4.18 a

Valores con diferentes letras adentro de la misma columna difieren estadísticamente ($P > 0.05$).

E-N= Eosina Nigrosina, ML= Mililitros, Host= Prueba hiposmotica

6.2 Características de los espermatozoides caprinos al descongelado adicionados con melatonina.

La calidad espermática de espermatozoides caprinos de la raza Saanen al descongelado adicionados con melatonina (media \pm error estándar), se contemplaron 3 tratamientos , T1 0.0 de melatonina que es el testigo, T2 1.5 de melatonina, T3 3.5 de melatonina, en el (cuadro 5) se muestra que hubo una tendencia en el T2 en la variable de motilidad masal 1.4 ± 0.29 y T3 en la variable motilidad masal 1.5 ± 0.21 , en las demás variables se muestran los valores obtenidos en la descongelación y observamos que no hubo diferencias significativas ($P < 0.05$).

Cuando el semen es sometido a un proceso de congelación presenta un abatimiento de calidad espermática, que se manifiesta principalmente en una disminución de la motilidad masal como lo menciona Galián *et al.* (2021) ya que el obtuvo un resultado de 3.5 ± 0.2 en la motilidad masal en cuanto a este estudio del T2 y T3 el resultado fue superior al de él con 1.2 ± 0.29 y 1.2 ± 0.21 .

Como se observa en el cuadro 5, no hubo diferencias significativas por lo cual se puede observar que la melatonina no tuvo una reacción en los 3 tratamientos de las siguientes variables: Motilidad progresiva, viabilidad, funcionalidad de la membrana plasmática y la integridad del acrosoma (Casao *et al.*, 2010) menciona que la membrana plasmática no parece ser afectada.

Cuadro 5. Características de los espermatozoides caprinos al descongelado adicionado con melatonina

Tratamiento de Melatonina (mM)	Motilidad Masal	Motilidad Progresiva (%)	Viabilidad E/N (%)	Funcionalidad De la membrana Plasmática HOST (%)	Integridad del acrosoma MCF (%)
0.0	1.28 ± 0.03 a	36.5 ± 1.37 a	50.2 ± 2.04 a	52.7 ± 1.49 a	71.1 ± 1.65 a
1.5	1.4 ± 0.29 b	40.2 ± 10.65 a	49.5 ± 15.25 a	52.2 ± 13.3 a	70.3 ± 10.8 a
3.5	1.5 ± 0.21 b	40.4 ± 8.86 a	48.7 ± 15.20 a	52.1 ± 12.4 a	71.3 ± 9.85 a

Valores con diferentes letras dentro de la misma columna difieren estadísticamente ($P > 0.05$).

E/N= Eosina Nigrosina, Host= Prueba de hinchamiento hiposmótico, MCF= Microscopio con contraste de fases, mM= Milimolar.

6.3 Características de los tratamientos entre los machos

Tras el análisis de los distintos tratamientos de melatonina al descongelado se observó que no hubo diferencias en los tratamientos entre machos, en cambio hubo una tendencia ($P= 0.07$) en la integridad del acrosoma en el tratamiento 2, lo cual quiere decir que el antioxidante en este caso la melatonina favoreció al tratamiento 2 del macho 2. Por otra parte, el T1 y T3 no se mostró alguna diferencia significativa lo cual pudo deberse al proceso del descongelamiento y los espermatozoides debieron a ver sufrido un choque térmico, los datos son promedios \pm error estándar de la media.

García (2015) menciona que el obtuvo una integridad del acrosoma al descongelar mayor que al de nuestro análisis con una integridad de 83.6 por otra parte nosotros obtuvimos un análisis menor que al del 76.06.

Cuadro 6. Características de los tratamientos entre machos

Tratamiento De melatonina (mM)	Macho	Motilidad Masal	Motilidad Progresiva (%)	Viabilidad E-N (%)	Funcionalidad De la Membrana Plasmática (%)	Integridad Del Acrosoma MCF (%)
1	1	1.40 a	33.0 a	46.6 a	47.6 a	76.4 a
1	2	1.26 a	34.0 a	47.7 a	52.8 a	76.3 a
1	3	1.20 a	39.3 a	49.6 a	58.6 a	65.2 a
1	4	1.20a	40.0 a	56.9 a	51.8 a	64.4 a
2	1	1.63 a	39.0 a	45.5 a	45.8 a	74.6 a
2	2	1.36 a	35.8 a	46.4 a	46.6 a	76.06 b
2	3	1.40 a	42.0 a	48.3 a	59.6 a	65.2 a
2	4	1.50 a	44.0 a	57.7 a	57.0 a	65.4 a
3	1	1.63 a	37.6 a	42.8 a	44.9 a	71.8 a
3	2	1.40 a	36.8 a	49.1 a	50.8 a	78.3 a
3	3	1.50 a	42.6 a	48.2 a	57.0 a	65.3 a
3	4	1.40 a	44.6 a	54.5 a	55.8 a	69.8 a

Valores con diferentes letras dentro de la misma columna difieren estadísticamente ($P>0.05$).

Mm=Milimolar, E/N=Eosina Nigrosina, MCF= Microscopio con contraste de fases.

VII. CONCLUSIÓN

Las diferentes concentraciones de melatonina utilizadas en esta investigación (0, 1.5, 3.5 μM) no tuvieron ningún efecto al utilizarse como antioxidante en la crioconservación de semen de macho caprino, sin embargo, hubo una tendencia de $P=0.07$ en el T2 en la variable de integridad del acrosoma con un valor de 76.06 %. Por ello no se descarta que el uso de melatonina favorece como aditivo del diluyente de congelación. Por lo tanto, es necesario realizar más estudios para conocer la concentración ideal de melatonina, que permita aumentar los porcentajes de la motilidad, viabilidad, funcionalidad de la membrana plasmática e integridad del acrosoma en espermatozoides descongelados.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aitken R.J., Smith TB, Jobling MS, Baker MA. 2014. De Iulius GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl* 16(1): 31-38.
- Albers A. María I., Barrios A.D. R.2006. Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros postmortem obtenidos mediante lavado retrógrado. *Zootecnia Tropical* 24(3), 267-280.
- Aitken R.J. 2012. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:659-668.
- Arrebola R.C. 2012. Macho cabrío. Manejo de datos específicos. *In: Gestión integral del macho: en las explotaciones de ovinos y caprinos.* Ferre MLM, ramos AJJ, Lacasta LD. España pp:150-166.
- Baril G., Leboeuf B., y Saumande J .1993. Synchronization of estrus in goats: the relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology* 40(3):621-628.
- Barth A. D., y Oko R. J. 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press. pp:123.127.
- Benson J.D., Woods E.J., Walters E.M., Critser J.K.2012. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology* 78(8): 1682-1699.
- Cano-Suarez P.C. 2012. Conservación de semen de carnero en refrigeración a 5°C en un diluyente adicionado con melatonina como antioxidante. Tesis Especialización en Ovinos y Caprinos. FES Cuautitlán, UNAM. 42 pp.

- Casao A., Abecia J.A., Cebrián P. J.A., Muiño B. T., Vázquez M.I., Forcada F. 2010. The effects of melatonin on in vitro oocyte competence and embryo development in sheep. Spanish Journal of Agricultural Reserch 8(1): 35-41.
- Castelo T.S., Frota T.R., Silva A.R. 2008. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. Acta Vet Bras 2:67-75.
- Corredor L. H., Dorado J., Moreno A. Q., Ortiz I., Buzón A., Corzo M., y Hidalgo M. 2014. Efecto de dos diluyentes a base de lecitina de soya sobre parámetros morfométricos en semen caprino. Revista Senova: Revista del Sistema de Ciencia, Tecnología e Innovación 1(1):30-43.
- Chicago. 2006. Programa de Demonstrations, millions of people rallied and marched in protests in various cities. En línea: <https://normasapa.in/estilo-chicago/>.consultado. 23/05/23
- Delgadillo J. A., Cortez M. E., Duarte G., Chemineau P. y Malpaux B. 2004. Evidence that the photoperiod controls the annual changes in testosterone secretion, testicular and body weight in subtropical male goats. Reproduction, nutrition, development, 44(3):183–193.
- García. S. 2015. Un complemento alimenticio incrementa el nivel de glucosa en sangre y la tasa ovulatoria en cabras expuestas al efecto macho. Tesis Especializada en glucosa. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.
- Gómez G.A., Pinos R. J. M., Aguirre R. J. R. 2009. Manual de producción Caprina, en línea <https://repositorio.una.edu.ni/4336/1/tnl53g216.pdf>. Consultado:24/03/23.
- González-Arto M, Hamilton T. R, Gallego M., Gaspar-Torrubia E., Aguilar D. Serrano-Blesa E., Abecia J. A, Pérez-Pé R., Muiño-Blanco T., Cebrián-Pérez J.A., Casao A., J.G. 2007.Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos: Biotecnología Pecuaria (4): 1-7.

- Galián S., Peinado B., Poto A., Almela L. 2020. Effect of Seminal Centrifugation with Iodixanol on the Sperm Quality of Goat Semen. *J Anim Sci Res* 4(1). En línea: https://www.researchgate.net/publication/343029844_Effect_of_Seminal_Centrifugation_with_Iodixanol_on_the_Sperm_Quality_of_Goat_Semen. Consultado: 24/05/23
- Henkel R.R. 2012 Leukocytes and oxidative stress: Dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J Androl* 13(1): 43-52.
- Holt W.V Medrano A., Thurston L.M, Watson P.F. 2005 The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm Cryopreservation: insight from the Cryomicroscope. *Theriogenology* 63:370-382.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 2020. Indicadores sociodemográficos y económicos por área geográfica nacional, entidad federativa, municipio o demarcación territorial y localidades. En línea https://www.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/panol/bvinegi/productos/geografia/imagen_cartografica/map_top_municipal/794551061541_geo.pdf. Consultado: 23/01/2020.
- Jiménez S. M., Pérez R. P, Pérez J. Á. C. 2015. Estudio de la posible acción protectora de la melatonina frente al daño por frío en espermatozoides ovinos. *Reproductive health. Asian J Androl* 8(1):73-82.
- Jang H.Y, Kim Y.H, Kim B.W., Park I.C., Cheong H.T., Kim J.T., 2010. Reproducción animal en caprinos. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 8(1)241-246.
- Jeyendran R.S., Van der Ven H.H., Perez-Pelaez M., Crabo B.G., Zaneveld L.J. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil.* Jan 70(1):219-28

- Karagiannidis A., Varsakelis A., Amarantidis I.C. 2000. Seasonal variation in semen characteristics of chios and Friesian rams in Greece. *Small Rum Res* 37:125-130.
- Kothari S., Thompson A., Agarwal A., du Plessis S.S. 2010 Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol* 48(5): 425-435.
- Kruger T.F., Coetzee K. 2010. The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Human Reproduction Update* 5 172-178.
- Llivi M. 2015 Comparación de la fertilidad de semen fresco y semen crioconservado de cabras saanen, usando inseminación artificial, mediante el porcentaje de concepción. Tesis de Maestría. Universidad Central Del Ecuador. Ecuador
- Mara K.D. Vincenzi A. Majolo . Volken de Souza, C. Mareco G. 2004. Inseminación intrauterina transcervical de cabras Cyberbiblioteca. Tesis de Mestria. Universidad Central Del Ecuador. Ecuador.
- McLachlan R.I., O'Donnel L., Meachem S. J., Stanton P.G., De Kretser D.M., Pratis K. y Robertson D.M. 2002. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys and man. *Endoc. Soc.* 149 -178.
- Moreno M. M. 2015. Sincronización de la ovulación y el ciclo inducido por el “efecto macho” mediante la administración de progesterona por vía intravaginal en cabras en periodo de anestro estacional. En línea: <http://eprints.ucm.es/38805/1/T37628.pdf>. Consultado: 21/06/23.
- Pino J.A., Osses N., Oyarzun D., Farias J.G., Moreno R.D. y Reyes J.G. 2013. Differential effects of temperature on reactive oxygen/nitrogen species production in rat pachytene spermatocytes and round spermatids. *Reproduction* 145:203-212.

- Partyka A., Nizanski W., Ochota M. 2012. Methods of assessment of cryopreserved semen. In: katko II (ed) Current Frontiers in Cryobiology. *In: Methods of assessment of cryopreserved semen*. TechOpen Access Publisher, Rijeka, Croatia. pp: 547-574.
- Reiter R.J., Tan D.X, Terron M. P, Flores L.J y Czarnocki Z. 2007. La melatonina y sus metabolitos: nuevos hallazgos sobre su producción y sus acciones de eliminación de radicales. *Acta Biochimica Polonica*. En línea: https://doi.org/10.18388/abp.2007_3264. Consultado:13/05/23.
- Reiter R.J., Tan DX, Fuentes-Broto L. 2010. Melatonin: A multitasking molecule. *Prog Brain Res*; 181: 127-151.
- SADER (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2023. Caprinocultura en México. En línea: <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/la-capricultura-en-mexico>. Consultado: 23/01/ 2023.
- Saladin K. S. 2013. Anatomía y fisiología: La unidad entre forma y función / Kenneth S. Saladin. McGraw-Hill, México D.F. p.1036.
- Sánchez-Partida L.G, Setchell B.P. Maxwell W.M.C. 1998. Effect of compatible solutes and diluent composition on the post-thaw motility of ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev* 10:347-357.
- Setiawan C. R., Aryana I. 2023. Seleção de enxerto entre autoenxerto e aloenxerto de tendão na reconstrução do ligamento cruzado anterior com base na perspectiva histológica: uma metanálise. *Revista Brasileira de Ortopedia* 58: 388-396.
- SIAP (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2021. Caprinos y Ovinos. En línea: <https://www.gob.mx/siap/articulos/caprinos-o-chivos>. Consultado:23/01/ 2023.

- Souza C.E., Moura A.A., Monaco E., Killian G.J. 2008. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 k Da and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Anim Reprod Sci.* 105:72:72-89.
- Tan D.X, Manchester L.C., Liu X., Rosales-Corral S.A., Acuna-Castroviejo D., Reiter R.J. 2013. Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: A hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *J Pineal Res* 54(2): 127-138.
- Tan D.X. Manchester L.C. Terron M.P. 2007. One molecule, many derivatives a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *J pineal Res* 42:28-42.
- Thomassen R., Farstad W. 2009. Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation. *Theriogenology* 71(1): 190-19.
- Vázquez I., Tapia A., Herrera J., Serrano M. A., Sánchez B., Fischer P. 2001. Efecto de un método de congelación espermática sobre los resultados de viabilidad de los espermatozoides de caprino (*Murciano-Granadina*). In: *Congresos y Jornadas. Serie Ganadería Ovino-Caprino-Junta de Andalucía (España)*.
- Zhang S.S. Hu J.H. Li Q.W. Jian. W.L. Zhang X.Y. 2009. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *Africam, Journal of Biotechnology* 8 (22):6476-6480.

