

1-1-2017

Criopreservacion de semen caprino utilizando diferentes concentraciones de glicerol en el diluyente

Daniel Alejandro Trujillo García
Universidad de La Salle

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/zootecnia>

Citación recomendada

Trujillo García, D. A. (2017). Criopreservacion de semen caprino utilizando diferentes concentraciones de glicerol en el diluyente. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/zootecnia/358>

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias Agropecuarias at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Zootecnia by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.



**CRIOPRESERVACION DE SEMEN CAPRINO UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES
DE GLICEROL EN EL DILUYENTE**

Daniel Alejandro Trujillo García

**Universidad de La Salle
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Programa de Zootecnia
Bogota, D.C., Colombia
2017**

**CRIO PRESERVACIÓN DE SEMEN CAPRINO UTILIZANDO DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE GLICEROL EN EL DILUYENTE**

Daniel Alejandro Trujillo García

**Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al
título de Zootecnista**

Director:

MSc., PhD (e) Nestor Isaías Tovío Luna

Línea de Investigación: Producción Animal

**Universidad de La Salle
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Programa de Zootecnia
Bogotá, D.C., Colombia
2017**

DIRECTIVOS

Rector:	Hno. Alberto Prada San Miguel
Vicerrectora Académica:	Dra. Carmen Amalia Camacho
Vicerrector de Promoción y Desarrollo Humano:	Hno. Diego Andrés Mora
Vicerrector de Investigación y Transferencia:	Dr. Luis Fernando Ramírez
Vicerrector Administrativo:	Dr. Eduardo Ángel Reyes
Secretaría General de la Universidad de La Salle:	Dra. Saray Yaneht Moreno
Decano Facultad de Ciencias Agropecuarias:	Hno. Dr. Ariosto Ardila
Secretario Académico:	Dr. Alejandro Tobón
Director programa de Zootecnia:	Dr. Abelardo Conde Pulgarin
Asistente académico programa de Zootecnia:	Dra. María Camila Corredor

APROBACIÓN

DIRECTOR DE PROGRAMA

Dr. Abelardo Conde Pulgarín

ASISTENTE ACADEMICO

Dra. María Camila Corredor

DIRECTOR TRABAJO

Dr. Nestor Isaías Tovío Luna

JURADO

Dr. Cesar Gómez

DEDICATORIA

PRINCIPALMENTE A DIOS POR PERMITIRNOS LLEGAR A ESTE MOMENTO TAN ESPECIAL.

A NUESTROS PADRES PORQUE SON LA RAZÓN DE NUESTRA VIDA, POR TODO SU AMOR, APOYO Y ENTREGA, POR CADA CONSEJO QUE NOS HICIERON MEJORES PERSONAS, FORMÁNDONOS CON BUENOS SENTIMIENTOS, HÁBITOS Y VALORES.

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD DE LA SALLE POR HACERNOS PARTE DE ESTA COMUNIDAD, POR TODOS LOS CONOCIMIENTOS BRINDADO QUE NOS HICIERON EXCELENTES PROFESIONALES. A CADA UNO DE NUESTROS PROFESORES POR TODO EL APORTE DEL CONOCIMIENTO QUE NOS BRINDARON COMO PERSONAS Y PROFESIONALES.

A NUESTRO DIRECTOR DE TRABAJO DE GRADO NESTOR ISAÍAS TOVÍO LUNA POR SU CONTRIBUCIÓN EN NUESTRA FORMACIÓN PROFESIONAL Y COMO HUMANOS, POR SU DEDICACIÓN Y SU ETERNA PACIENCIA POR ESTE PROYECTO.

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL POR PERMITIR LA VINCULACIÓN EN UN PROYECTO INVESTIGATIVO.

RESUMEN

Se evalúa el efecto de la aplicación de glicerol al 6, 7 y 8% en diluyente para criopreservación de semen caprino sobre los porcentajes de recuperación de la motilidad progresiva individual, vivos y anomalías espermáticas pos descongelación. Para esto se utilizó semen de 3 machos adultos de la raza Saanen en el trópico alto colombiano. En total se congelaron 27 pajillas para cada uno de los tratamientos (Glicerol al 6, 7, y 8%); es decir, en total se congelaron 81 muestras. Se presentó efecto ($P < 0.05$) del glicerol al 7% sobre el porcentaje de la recuperación de la motilidad progresiva individual siendo esta mayor frente al glicerol al 6 y 8%. Se presentó efecto ($P < 0.05$) del glicerol al 7% sobre el porcentaje de vivos siendo esta mayor en estas variables frente al glicerol al 6 y 8%. No se presentó efecto ($P > 0.05$) del glicerol sobre el porcentaje de anomalías primarias, pero este efecto sí se evidenció ($P < 0.05$) en las anomalías secundarias y totales observándose menores porcentajes de estas variables cuando el glicerol se utilizó al 7% frente al glicerol al 6 y 8%. De acuerdo a lo evidenciado el glicerol afecta el porcentaje de la recuperación de la motilidad progresiva individual, el porcentaje de espermatozoides vivos, la presencia de anomalías secundarias y totales.

Palabras clave: Glicerol, espermatozoide, caprino, criopreservación

CONTENIDO

	Pág.
Resumen.....	7
Lista de tabla.....	10
Lista de figuras.....	11
Lista de Graficas.....	12
1. IINTRODUCCION (Planteamiento del problema y justificacion)	13
2. Objetivo general.....	18
2.1. Objetivos especificos.....	18
3. MARCO TEORICO.....	18
3.1. Características del semen caprino.....	18
3.1.1. Plasma Seminal.....	18
3.1.2. Volumen de Semen.....	20
3.1.3. Espermatozoides caprinos.....	10
3.1.3.1. Dimensión y morfología espermática.....	20
3.1.3.2. Motilidad de los Espermatozoides.....	22
3.1.3.3. Concentración Espermática.....	23
3.2. Efectos del proceso de criopreservacion y descongelacion de la célula espermática.....	23
3.3. Diluyentes.....	28
3.3.1. COMPONENTES DE LOS DILUYENTES.....	28
3.3.1.1.Crioprotectores.....	29

3.3.1.1.1. Glicerol.....	30
3.3.1.2. Medios Buffer y Azúcares.....	32
3.3.1.3. Antibióticos.....	33
3.3.1.4. Protectores contra el Choque Térmico.....	33
4. MATERIALES Y METODOS.....	33
4.1. Localización.....	33
4.2. Grupo experimental.....	34
4.3. preparación de diluyente.....	34
4.4. Colectas y procesamiento seminal.....	35
4.4.1. Aplicación de los tratamientos a muestras seminales.....	36
4.5. Analisis estadístico.....	38
4.5.1. Variables respuesta.....	39
5. RESULTADOS Y DISCUSION.....	39
5.1. Efecto de la concentración de glicerol (6, 7 y 8%) en el diluyente sobre el porcentaje motilidad progresiva individual.....	40
5.2. Efecto de la concentración de glicerol (6, 7 y 8%) en el diluyente sobre e porcentaje de espermatozoides vivos.....	42
5.3. Efecto de la concentración de glicerol (6, 7 y 8%) en el diluyente sobre el porcentaje de anormalidades primarias.....	43
5.4. Efecto de la concentración de glicerol (6, 7 y 8%) en el diluyente sobre el porcentaje de anormalidades secundarias.....	45
5.5. Efecto de la concentración de glicerol (6, 7 y 8%) en el diluyente sobre el porcentaje de anormalidades totales.....	47
6. CONCLUSIONES.....	48
7. RECOMENDACIONES.....	48
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	50

Lista de tablas

Tabla 1. Dinámica comparativa poblacional de ovinos y caprinos (millones de cabezas)	13
Tabla 2. Producción Anual productos caprinos y ovinos (Toneladas)	14
Tabla 3. Principales alteraciones observadas en el eyaculado.....	20
Tabla 4. Características seminales en fresco por macho y general.....	38
Tabla 5. Variables espermáticas según tratamiento (6, 7 y 8 % de glicerol)	39

Lista de Figuras

Figura 1, Anormalidades Esperáticas.....	21
Figura 2. Microarquitectura del medio durante la congelación de semen.....	25
Figura 3. Cambios probables en el espermatozoide y el medio durante la congelación y descongelación de semen.....	28

Lista de Graficas

Grafica 1. Comportamiento de la motilidad progresiva individual de las células espermáticas (%) de acuerdo al porcentaje de glicerol en el diluyente (tratamientos al 6, 7 y 8 %)	41
Grafica 2. Comportamiento de células espermáticas vivas (%) de acuerdo al porcentaje de glicerol en el diluyente (tratamientos al 6, 7 y 8 %)	43
Grafica 3. Comportamiento de las anomalías primarias en las células espermáticas (%) de acuerdo al porcentaje de glicerol en el diluyente (tratamientos al 6, 7 y 8 %)	44
Grafica 4. Comportamiento de las anomalías secundarias en las células espermáticas (%) de acuerdo al porcentaje de glicerol en el diluyente (tratamientos al 6, 7 y 8 %)	46
Grafica 5. Comportamiento de las anomalías totales en las células espermáticas (%) de acuerdo al porcentaje de glicerol en el diluyente (tratamientos al 6, 7 y 8 %)	47

1. INTRODUCCION (PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN)

Los caprinos y ovinos son considerados los pequeños rumiantes más comunes que proveen impacto económico en el mundo, y su dinámica poblacional en los últimos años muestra incremento de la población de la especie caprina; comportamiento contrario presento la población ovina “Ver tabla 1” (Moreno *et al*, 2014).

Tabla 1. Dinámica comparativa poblacional de ovinos y caprinos (millones de cabezas)

Grupo geográfico	Especie	Año 2005	Año 2010
Mundo	Caprina	838.623.162	909.691.096
	Ovina	1.099.671.843	1.077.762.456
Total	Pequeños rumiantes	1.938.295.005	1.987.453.552
Colombia	Caprina	1.160.000	1.200.000
	Ovina	3.332.990	3.400.000
Total	Pequeños rumiantes	4.492.990	4.600.000

Modificado de Moreno (2013)

En América latina y del caribe se ha calculado una población cercana a los 120 millones de pequeños rumiantes, los cuales hacen parte de los sistemas de producción pecuaria. De acuerdo a lo anterior se ha sugerido que estas especies son un importante recurso para las economías regionales, y se estima que existen aproximadamente 19,7 cabezas de pequeños rumiantes por cada 100 habitantes (Moreno, 2013).

En la tabla 2 se puede evidenciar la producción anual de leche, carne y piel de los sistemas productivos de ovinos y caprinos a nivel mundial y nacional.

Tabla 2. Producción Anual productos caprinos y ovinos (Toneladas)

Especie	Producto	Mundo	Colombia
Caprina	Leche	16.690.395	
	Carne	5.168.151	7.4
	Piel	1.132.622	1.178
Ovina	Leche	10.046.506	
	Carne	8.532.257	7.5
	Piel	1.890.030	1.293

Modificado de Moreno (2013)

En Colombia la población de pequeños rumiantes está constituida aproximadamente por 4.6 millones de animales representados en 3.4 millones de ovinos (74%) y 1.2 millones de caprinos (26%), presentando un incremento de 2,04% y 3,45% respectivamente en los últimos años (Moreno *et al*, 2014).

Datos estadísticos referencian que en Colombia la producción de carne y piel proveniente de ovinos y caprinos se ha venido en incremento, pero para la determinación de la producción de leche caprina no se calculado ni referenciado datos estadísticos productivos. Esto podría deberse principalmente al desconocimiento de la industria caprina nacional, percepción que ha limitado su reconocimiento económico, su relevancia y su capacidad productiva (Grajales *et al*, 2007); sin embargo se sugiere que la producción de leche es uno de los objetivos principales de los programas de mejora genética en caprinos, lo que ha llevado a la necesidad de obtener animales precoces que suministren buena cantidad de leche y rica en sólidos totales, que sirva perfectamente para la fabricación de productos lácteos (Tovío *et al.*, 2007).

Con el objetivo final de aumentar la productividad se han comenzado a utilizar

herramientas biotecnológicas que permitan un desarrollo hacia el avance genético, lo que exige cada día que se requiera fortalecer y mejorar los protocolos relacionados con el manejo y control reproductivo en caprinos, especialmente hacia el macho teniendo en cuenta que este es determinante en el aporte de características de productividad lo cual podría ser mas eficiente si se lograra una intensificación en la implementación de los programas de inseminación artificial (Jian-Hua *et al.*, 2016).

La inseminación artificial es una de las biotecnologías de mayor relevancia en los últimos años, pues permite un avance genético especialmente en los animales productores de leche, mediante la realización de las pruebas de progenie y el mejor aprovechamiento de los sementales con características productivas superiores (Mahieu *et al.*, 2008). Sin embargo, en caprinos su uso ha sido limitado en comparación con otras especies, debido entre otros factores a la dificultad para congelar y descongelar el semen, ya que algunos diluyentes pueden resultar tóxicos para los espermatozoides y tanto al congelar como al descongelar, se disminuye la motilidad progresiva y se incrementa la cantidad de acrosomas dañados (Jian-Hua *et al.*, 2016).

Los avances en investigación sobre este tema también han sido lentos, sin embargo se consiguen en el mercado hoy día diluyentes especiales para semen caprino, pero los resultados postdescongelación son controversiales (Tovio *et al.*, 2007), lo que amerita seguir investigando sobre la conservación de semen de caprinos desde el punto de vista de diluyentes (Martínez *et al.*, 2006).

La dilución del semen se realiza por razones técnicas y biológicas, dentro de las razones técnicas se tiene que el macho por medio de la inseminación artificial utilizando semen congelado permite una mayor cobertura de hembras comparado con las realizadas por monta natural (Evans *et al.*, 1990) En la monta natural el macho cabrío deposita miles de millones de espermatozoides en la vagina de la hembra y de este gran número de espermatozoides solamente unos 100 o 140 millones atraviesan el cérvix (Grajales *et al.*, 2011). Cuando se utiliza la inseminación artificial en cabras, tanto el volumen de inseminación como el

número de espermatozoides que contiene la dosis inseminante se reduce sustancialmente al compararlo con la monta natural (Holt, 2000).

El límite inferior generalmente aceptado como resultante de un buen índice de fertilización, tras la inseminación artificial cervical, es de 100 millones de espermatozoides por dosis preparada; de esta forma se puede inseminar un gran número de hembras con un solo eyaculado (Watson, 2000). Si se utilizara semen sin diluir, este volumen contendría un número de espermatozoides superior al límite mínimo de seguridad, lo que resultaría en un método poco económico; este inconveniente, se soluciona mediante la dilución del semen (Evans *et al.*, 1990).

Adicionalmente se sugiere que un volumen adecuado para utilizar tanto en inseminación cervical como intrauterina debe ser de 0.05 – 0.20 ml; para inseminación vaginal se debe usar un volumen mayor; el disminuir este volumen por debajo de 0.05 ml, no es práctico dada la dificultad de manejar y depositar, cantidades tan pequeñas en una inseminación tradicional “no vía laparoscópica” (Grajales *et al.*, 2011).

Entre las razones biológicas por lo cual se diluye el semen sometido a congelación se resalta la formación de hielo intracelular, tanto en la congelación como en la descongelación, los cuales destruyen la célula al actuar físicamente sobre ella (Karp, 2008). Igualmente los espermatozoides pueden sufrir la pérdida de la integridad de las membranas celulares, así como una inactivación de 20% de enzimas acrosomales y la pérdida de fosfolípidos y de proteínas si la célula no se encuentra en un medio propicio para mantenimiento (Zhao *et al.*, 2009). Adicionalmente los espermatozoides tienen mejor recuperación si un crioprotector está presente en el medio diluyente. Entre estas sustancias utilizadas como crioprotectores penetrantes y de baja toxicidad en concentraciones de 1 molar o más se encuentran el metanol, etilenglicol, 1-2 propanidol, butanediol, acetamida, propilenglicol, dimetilacetamida y el DMSO “dimetil sulfoxido” (Grajales, *et al.*, 2011). Sin embargo, el glicerol ha sido la sustancia crioprotectora con mejores resultados en los diluyentes para congelación de semen de varias especies, entre las cuales se encuentran los caprinos (Tovío *et al.*, 2007).

El efecto crioprotector del glicerol contra el congelamiento de los espermatozoides se debe a que este tiene un punto de congelación más bajo que el del agua, minimizando la concentración extracelular de solutos y aumentando las posibilidades de supervivencia de estas células dentro de la célula y ayuda al mantenimiento de la presión osmótica del diluyente y la célula (Hereng *et al.*, 2011).

Sin embargo las características físico-químicas de los crioprotectores no son suficientes para definir las condiciones de una buena protección celular; en efecto, se ha demostrado que el principal factor limitante de la utilización de crioprotectores, es su toxicidad, ya que su uso puede conducir a lesiones osmóticas y/o lesiones bioquímicas de acuerdo a la concentración utilizada como en el caso del glicerol, del cual se ha demostrado su efectividad como crioprotector en células espermáticas de toro, ovejo y cabro entre otros, por lo cual es el crioprotector mas utilizado en los medios diluyentes comerciales (Mahieu *et al.*, 2008).

La inclusión de glicerol en diluyentes para semen caprino según algunos autores debería estar entre un 3 al 9% (Grajales *et al.*, 2011); aunque algunos otros investigadores, reportan inclusiones de glicerol de hasta un 15 a 20%, obteniendo buenos resultados en la evaluación del semen pos descongelación (Holt 2.000). No obstante según los porcentajes descritos se nota el amplio rango de las concentraciones de glicerol recomendados para semen caprino, inclusive en los diluyentes comerciales, por lo cual aun persiste mucha incertidumbre sobre la concentración optima (Tovío *et al.*, 2007) en las condiciones en de trópico alto colombiano.

De acuerdo a lo anterior se requiere del diluyente, con sus respectivos componentes que permita la máxima viabilidad pos descongelación del semen caprino, esto de acuerdo a que la investigación generada en cuanto a la temática en referencia es poca y limitada a nivel mundial y nacional; por tal motivo la importancia de generar bases fisiológicas, que faciliten el estudio del comportamiento reproductivo de la especie y que estas a su vez sirvan para

futuras investigaciones que conduzcan a una más adecuada explotación y aprovechamiento de la especie.

2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la concentración de glicerol (6, 7 y 8%) como crioprotector en un medio diluyente para congelación de semen caprino en el trópico alto colombiano.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Evaluar el efecto de la concentración de glicerol al 6, 7 y 8 % en el total del diluyente, sobre el porcentaje de motilidad progresiva individual en semen caprino pos descongelado en el trópico alto colombiano.
- b) Evaluar el efecto de la concentración de glicerol al 6, 7 y 8 % en el total del diluyente, sobre el porcentaje de anormalidades espermáticas en semen caprino pos descongelado en el trópico alto colombiano.
- c) Evaluar el efecto de la concentración de glicerol al 6, 7 y 8 % en el total del diluyente, sobre el porcentaje de células espermáticas vivas pos descongelación en semen caprino en el trópico alto colombiano.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Características del semen caprino

3.1.1. Plasma Seminal

El plasma seminal es una mezcla de líquidos secretados por las glándulas vesiculares, el epidídimo, conductos deferentes y otras glándulas sexuales accesorias (Evans 1.990; Salamon 1.995).

Los principales constituyentes estudiados en el plasma seminal del macho cabrío son: Fructosa, Inositol, Ácido Cítrico, Riboflavina, Iones Inorgánicos, Enzimas, Glicerofosforilcolina y Prostaglandinas. De acuerdo a estas últimas podemos decir; que en el plasma de cabro hay muy altas concentraciones de prostaglandinas (> 40 ug./ml.), lo cual colabora con la producción de las

contracciones de la musculatura uterina y esto beneficia el transporte de los espermatozoides a través del tracto genital de la hembra (Maxwell, 1.995).

El efecto benéfico del plasma seminal se debe a que activan la motilidad de los espermatozoides que, durante su permanencia en el epidídimo, han estado en un estado de quietud, a bajas tasas metabólicas, debidas a las características del medio respecto a pH, temperatura, tensión de oxígeno y a la alta relación entre alta presión osmótica/alta concentración de potasio, También proporciona un medio rico en nutrientes y actúa como vehículo para los espermatozoides (Evans, 1990; Volkmann *et al*, 2.001).

El semen del macho cabrío al igual que en otras especies como: hámster, ovejo, cerdo y humano entre otros, presenta la fosfolipasa A, que se origina en la glándula bulbo-uretral. Esta contribuye entre otras actividades a la modulación en eventos de la fusión de la membrana en el proceso de la fertilización (Upreti *et al.*, 1999). También hay evidencias en el importante papel que cumple esta en el proceso de exocitosis acrosomal (Garde y Roldan, 1996). Generalmente los niveles de fosfolipasa A, son solamente detectables con métodos radioactivos (Upreti *et al*, 1.999).

Cuando se utiliza yema de huevo en el diluyente como medio protector contra el choque térmico, esta fosfolipasa degrada la lecitina de la yema de huevo, formándose productos tóxicos para los espermatozoides a la vez que se produce la coagulación del medio. (Evans y Maxwell, 1.990).

El semen normal del macho cabrío presenta un color blanco grisáceo o amarillento. La presencia de otras coloraciones o sangre la cual da al semen una coloración rosada, puede ser debido a lesiones del pene causadas durante la colecta y/o eyaculado. Las coloraciones pardas son indicadores de contaminación o alguna clase de infección en el sistema reproductor. (Freitas *et al*, 1.997; Evans, 1.990; Evans y Maxwell, 1.987) “Véase tabla 3”.

3.1.2. Volumen de Semen

Cuando el semen es colectado por medio de vagina artificial el volumen promedio es de 1 ml y cuando se colecta utilizando electroyaculador el promedio esta en 2.5 ml (Salamon, 1.995). El volumen de eyaculado se puede ver afectado por varias causas y esto se relaciona diferentes causas (Véase Cuadro 1). Karagiannidis *et al*, (2.000), reporta volúmenes de eyaculados colectados con vagina artificial de 0.7 a 2 ml. para las razas alpina, saanen y damasco.

Tabla 3. Principales alteraciones observadas en el eyaculado

Parámetro	Característica	Denominación
Volumen	Ausente	Asospermia
	Reducido	Hipospermia
	Aumentado	Hiperpesmia
Concentración	Cero	Azoospermia
	Reducida	Oligospermia
	Normal	Normospermia
	Aumentada	Polizoospermia
Motilidad	Disminuida	Astenozoospermia
Morfología	Anormales	Teratozoospermia
Células extrañas	Sangre	Hemospermia
	Pus	Piospermia

Fuente: Modificado de Tovío. 2002

3.1.3. Espermatozoides caprinos

3.1.3.1. Dimensión y morfología espermática

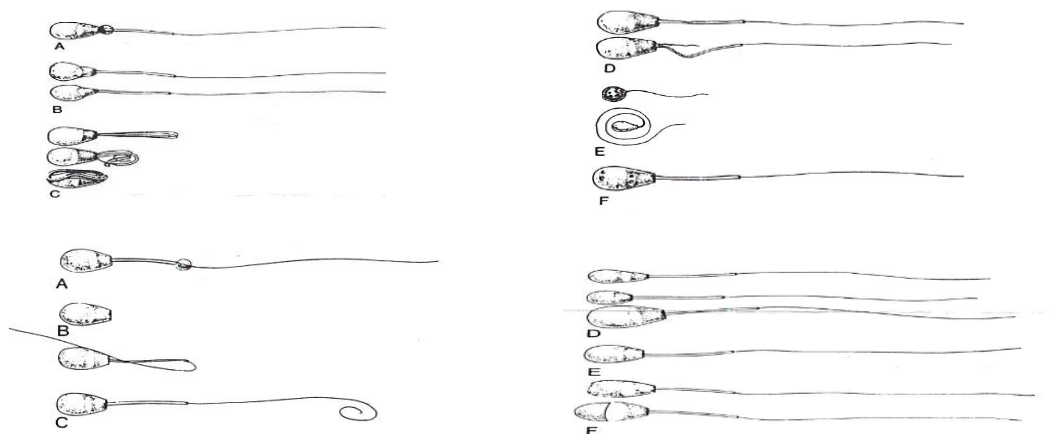
Los espermatozoides del macho cabrío tienen una longitud de 60 μm . Su cabeza mide unos 8 – 10 μm de longitud y 4 μm de ancho con 1 μm de grueso (Evans y Maxwell, 1.990). Este es relativamente pequeño comparado con el oocito cuyo diámetro es de 160 – 180 μm . Se puede decir que el oocito tiene un volumen 16.000 veces mayor que el del espermatozoide (Maxwell, 1.995).

Las anomalías morfológicas pueden ser primarias o secundarias; las primarias se deben a fallas en la espermatogénesis, mientras que las secundarias ocurren

durante el paso de los espermatozoides a través del epidídimo (Hafez, 1999). La lesión espermática que se produce durante el eyaculado o después o por manejo inadecuado del semen extraído, se considera una anomalía espermática. Igualmente se debe dar especial atención al acrosoma, ya que este es de gran importancia en el momento de la fecundación (Karagiannidis *et al*, 2.000) “Véase Figura 1”.

Las razas saanen, alpina y damasco presentan un rango de anomalías entre 5 a 15% (Karagiannidis *et al*, 2.000). Anomalías superiores al 20% están relacionadas con una baja fecundidad (Hafez, 1.999).

Figura 1, Anormalidades Espermáticas



MENORES

- A, Gota citoplasmática proximal.
- B, Cabezas deformes.
- C., Cola completamente doblada., Cola enrollada, cola enrollada alrededor de la cabeza.
- D, Defectos en la pieza media.
- E, Mal desarrollados.
- F. Cráteres.

Mayores

- A, Gota citoplasmática distal.
- B, Cabeza normal sin cola.
- C, Curva simple o terminación de la cola enrollada.
- D, Cabezas estrechas, pequeñas o gigantes.
- E, Implantación abaxial.
- F. Acrosomas anormales (arrugado, distal).

FUENTE: CURSO DE CONGELACION DE SEMEN BOVINO. BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA. (2002)

3.1.3.2. Motilidad de los Espermatozoides

En el semen normal los espermatozoides tienen una carga eléctrica negativa con lo que se repelen entre sí. Si estos pierden esta carga tienden a agruparse; este fenómeno recibe el nombre de aglutinación y puede ser debido a un aumento de la acidez del medio, presencia de iones metálicos, bacteria u otras impurezas o a la presencia de aglutininas originadas en el animal (salamon, 1.995) (véase tabla 3).

LA ENERGÍA NECESARIA PARA MANTENER LA MOTILIDAD Y VIABILIDAD PROCEDE DE LOS AZÚCARES, ESPECIALMENTE DE LA FRUCTOSA PRESENTE EN EL PLASMA SEMINAL (WATSON, 2.000). CUANDO LOS AZÚCARES SON METABOLIZADOS POR LOS ESPERMATOZOIDEOS SE PRODUCE DIÓXIDO DE CARBONO, AGUA Y ALGO DE ÁCIDO LÁCTICO. ESTE DIÓXIDO DE CARBONO EN ALTA CONCENTRACIÓN INHIBE LA MOTILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDEOS AFECTANDO DE ESTA FORMA LA FECUNDACIÓN (SALAMON, 1.995).

los espermatozoides presentan 3 principales tipos de movimientos los cuales son: Movimiento progresivo hacia delante, Movimiento circular o rotatorio y Movimiento oscilatorio o convulsivo sin progreso ni cambio de posición (Maxwell, 1.995). Para la inseminación solo se debe usar el semen que presente altas proporciones de espermatozoides con motilidad progresiva. Se deben discriminar los espermatozoides con movimiento rectilíneo de aquellos inmóviles, con movimiento circular o con cualquier otro tipo de movimiento (Deka, 1.984). Motilidades progresivas por debajo del 60% se han considerado bajas para una posible fecundación (Valencia *et al*, 1.994; Kelly *et al*, 1,997), pero normalmente se reportan motilidades altas de 70a 90 % en las razas alpina y saanen (Karagiannidis *et al*, 2.000). La velocidad de movimiento hacia delante de un espermatozoide de macho cabrío suspendido en plasma seminal es de 5-15 mm/min. (Promedio 7 mm./min.) (Valencia *et al*, 1.994).

3.1.3.3. Concentración Espermática

El semen caprino normalmente contiene concentraciones de 2.000 a 5.000 millones de espermatozoides/ml. En animales con buena condición, de las razas alpina saanen y damasco (Karagiannidis *et al*, 2.000).

Un factor muy ligado a la concentración espermática es la consistencia del semen (sus valores van desde 5 a 0), la cual depende de la relación entre espermatozoides y plasma seminal. Una alta consistencia indica una alta cantidad de espermatozoides, permitiendo así una mayor dilución (Evans, 1.990; Maxwell, 1.995; Karagiannidis *et al*, 2.000). Mientras que alteraciones en esta, se relacionan con problemas de diferente tipo. (Véase tabla 3). Aparte de la consistencia, la concentración espermática es determinada fácilmente por medio del hemocitómetro, el cual se utiliza con una dilución de semen solución 1:200 (Valencia *et al*, 1.994). Esto nos da la base para una determinación confiable del número de espermatozoides/ml. de semen la cual es necesaria para precisar la formula matemática para hacer la dilución (Karagiannidis *et al*, 2.000).

3.2. Efectos del proceso de criopreservacion y descongelacion de la célula espermática

La congelación se presenta un abatimiento de la calidad de la célula, que se manifiesta con una disminución de la motilidad y mortalidad espermática (Jian-Hua *et al.*, 2016). Este proceso es atribuido a una alteración de los componentes celulares, unido a un trastorno en el intercambio iónico involucrando al potasio y a fosfatos contenidos en el diluyente (Zhao *et al.*, 2009).

Los efectos de la criopreservacion se pueden dividir en dos:

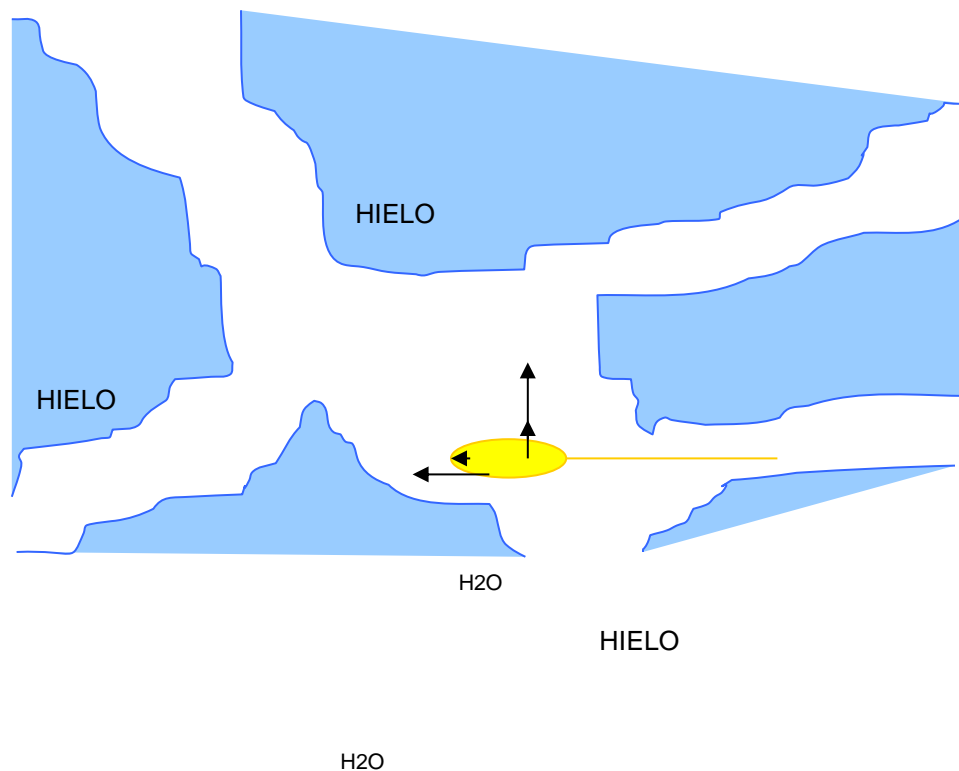
- I. Efectos de las soluciones que provocan cambios de presión osmótica del medio, provocado por la adición de los diluyentes, con el subsecuente flujo de agua del interior de la célula y viceversa, cuando las células son descongeladas (Karp, 2008).

- II. Si la velocidad de enfriamiento es muy rápida, se forman cristales de hielo al interior de la célula espermática, pues el agua no ha podido salir de la célula, lo cual causa daños irreparables en las membranas espermáticas (Zhao *et al.*, 2009). También hay formación de cristales extracelulares y si estos son muy grandes pueden causar daños mecánicos en los espermatozoides, especialmente al momento de ser descongelados (Holt, 2.000).

Estos efectos se pueden retomar cuando la temperatura de la suspensión alcanza los -6 C , momento en el que se inicia la formación de cristales extracelulares del agua en el diluyente; este proceso puede tomar uno o dos minutos, luego se reinicia el enfriamiento de la suspensión, se forman más cristales fuera del espermatozoide, se aumenta la concentración extracelular de solutos, el agua se mueve desde dentro de la célula al medio extracelular y el espermatozoide inicia una deshidratación progresiva (Amann, 1.995).

El movimiento del agua ocurrido fuera de la célula se debe a fuerzas osmóticas generadas por la gran concentración de solutos en el diluyente, lo que reduce el volumen de cada célula cuando la temperatura es menor a los -50 C y , finalmente, a -196 C (Giraud *et al.* 2.000). Es decir, se inicia la formación de cristales de hielo extracelular de agua pura, por lo cual los solutos quedan separados del cristal, aumentando así su concentración en la porción de agua precongelada la cual también existe en el interior del espermatozoide y que se difunde a través de la membrana plasmática hacia el exterior, con el propósito de que la concentración de sales del interior y exterior de la célula se equilibre (Karp, 2008). La pérdida de agua intracelular y la subsiguiente deshidratación del espermatozoide son deseables por que así se reduce de grandes cristales de hielo dentro de la célula que pueden causar daños a las estructuras internas o a la membrana plasmática (Zhao *et al.*, 2009).

Figura 2. Microarquitectura del medio durante la congelación de semen.



Fuente: Modificado de Forero . Congelación de semen equino. (2003).

Canales de agua no congelada y el movimiento del agua del interior al exterior de la célula, con la disminución resultante de volumen del espermatozoide y aumento de la concentración intracelular de solutos.

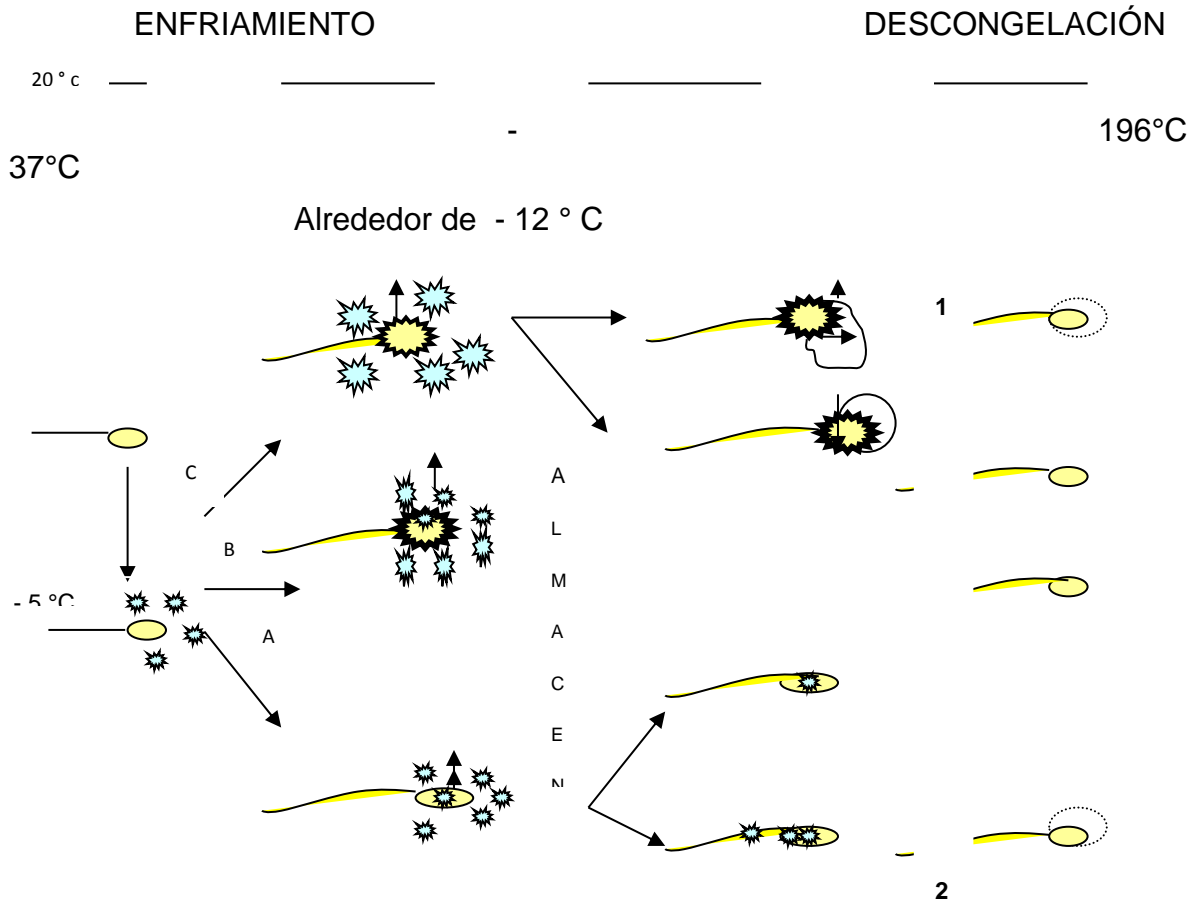
Otra teoría para explicar el daño en la membrana plasmática, plantea que al disminuir la temperatura por debajo de 0 °C, la formación de ATP también disminuye provocando que la bomba sodio-potásio de la membrana plasmática también reduzca su actividad (Karp, 2008).

A estos procesos debe sumársele el daño causado por los crioprotectores como el glicerol, que en algunos estudios ha demostrado ser tóxico para los

espermatozoides, debido a los daños bioquímicos que causa en los componentes celulares, pues altera la presión osmótica de las células, modifica las membranas plasmáticas y acrosomal y provoca reacciones de la membrana plasmática con otras moléculas del diluyente; incluso, se ha llegado a pensar que al interactuar con la membrana plasmática, reduce la longevidad del espermatozoide pues podría inducir su capacitación; sin embargo, el glicerol disminuye el punto de congelamiento de las estructuras celulares por debajo del agua, lo cual minimiza la concentración extracelular de solutos (efectos de la solución) y aumenta los espacios de diluyente no congelado en los que el espermatozoide puede sobrevivir mientras esté criopreservado (Holt, 2.000).

Todos los eventos ocurren dependiendo del ritmo de enfriamiento (Crister, 1.999). La salida del agua de la célula espermática es mayor cuando el espermatozoide es enfriado lentamente, que cuando el enfriamiento se hace con rapidez (Hereng *et al.*, 2011).. Si se hace un congelamiento rápido se reduce al mínimo el daño debido a las alteraciones en el metabolismo celular a los cambios en la presión osmótica y en las membranas, pero se producen grandes cristales de hielo que causan graves daños mecánicos. En cambio, si el congelamiento se hace lentamente, no se forman grandes cristales, pero se producen cambios en las membranas y el metabolismo celular. En otras palabras, si el agua no sale con la velocidad suficiente para mantener el equilibrio, las células empiezan a superenfriarse, logrando el equilibrio osmótico por congelamiento intracelular que induce la muerte celular (Jian-Hua *et al.*, 2016).

Figura 3. Cambios probables en el espermatozoide y el medio durante la congelación y descongelación de semen.



- A. Enfriamiento muy rápido
- B. Enfriamiento rápido
- C. Enfriamiento lento
- 1. Descongelación subóptima (muy rápida).
- 2. Descongelación óptima
- 3. Descongelación subóptima (muy lenta)

A una tasa óptima de enfriamiento (B), el agua sale y el espermatozoide se encoge por deshidratación. Durante la descongelación a una tasa adecuada (2), el movimiento de agua provoca la rehidratación del espermatozoide, con el balance de la presión del soluto y la formación de microcristales de hielo.

Fuente: Modificado de Forero. Congelación de semen equino. (2003).

3.3. Diluyentes

Las dos principales funciones del diluyente son conservar la fertilidad de los espermatozoides y aumentar el volumen total, de forma tal que la dosis determinada de espermatozoides pueda ser envasada y utilizada convenientemente para la inseminación artificial, de tal manera que de un eyaculado normal pueden inseminarse un gran número de animales (Tribulo H. *et al.*, 2.000).

Para poder cubrir estos requerimientos, el diluyente para semen debe tener características como suministro de nutrientes como fuente de energía (Hammersted, 1.999, proteger contra el daño que produce el enfriamiento rápido (Hafez, 1.999), amortiguar los cambios de pH, cuando se forma ácido láctico, previniendo el daño por éste (Hereng *et al.*, 2011). mantener una adecuada presión osmótica, al igual que un equilibrio electrostático correcto (Hammersted, 1.999), aumentar el volumen de semen para usarlo en varias inseminaciones (Hafez, 1.999), contener un apropiado balance mineral (Hammersted, 1,999), tener capacidad de neutralización de los productos tóxicos que metabolizan los espermatozoides (Jian-Hua *et al.*, 2016), poseer capacidad de estabilización de los sistemas enzimáticos y de la integridad de las membranas espermáticas (Hammersted, 1.999), estar libres de organismos infecciosos (Grajales *et al.*, 2011), inhibir o minimizar el crecimiento bacteriano (Hammersted, 1.999).

El diluyente puede ser dividido en fracción A y fracción B, la cual lleva el porcentaje del crioprotector. Esta fracción B es agregada a 5 °C. ya que a temperaturas mayores crioprotectores como el glicerol se hace tóxico a los espermatozoides. A temperaturas menores de 0 °C. el crioprotector no penetra a la célula, y de esta forma no ejerce su efecto adecuado (Keskintep *et al.*, 1.998).

3.3.1. COMPONENTES DE LOS DILUYENTES

Los diluyentes basados en sustancias amortiguadoras como citrato o hidroximetilaminometano (TRIS.), con agregado de yema de huevo o leche descremada (medio contra el choque térmico), azúcares, electrolitos, glicerol

(crioprotector), son los más convenientes y apropiados para la congelación de semen caprino. (Zhao *et al.*, 2009; Salamon, 2.000; Corteel, 1.981; Deka, 1.984; Evans, 1.990).

Sin embargo con el semen de macho cabrío se debe tener mucho cuidado con la inclusión de la yema de huevo en el diluyente, ya que el plasma seminal de este contiene la fosfolipasa A, que se origina en la glándula bulbo uretral. Esta fosfolipasa degrada la lecitina de la yema del huevo, generando productos tóxicos para los espermatozoides y provocando la coagulación del medio, por este motivo se sugiere que la inclusión máxima de yema de huevo en el diluyente no supere el 2.5% (Valencia *et al.*, 1.994).

3.3.1.1. Crioprotectores

Son sustancias que gracias a sus características de ser moderadoras en los cambios de concentraciones de solutos, de mantener equilibrio de potencial químico entre el agua extra e intracelular, de ser deshidratantes y disminuir la formación de cristales de hielo y de ser estabilizadoras de la membrana celular; evitan los daños a las células durante la congelación (Songsasen *et al.*, 1.995).

Los crioprotectores pueden ser clasificados de acuerdo a su modo de acción lo cual va ligado a sus características físico-químicas:

- a) Crioprotectores que penetran libremente a la célula, de peso molecular bajo. Figuran sustancias de baja toxicidad en concentraciones de 1 molar o más como: el glicerol, 1 - 2 propanidol, butanodiol, acetamida, dimetilacetamida, DMSO (dimetil – sulfoxido), etilenglicol, etanol y glicerol. Estos son alcoholes que ejercen su propiedad crioprotectora penetrando a la célula y por sus radicales hidróxido o sulfoxido, fijan parte del agua intracelular durante los procesos de congelación y descongelación, limitando la formación de cristales de hielo intracelular (Holt, 2.000).

En este grupo de crioprotectores también encontramos compuestos anfipáticos como la betaína, la glutamina y la prolina. Estos compuestos, se piensa que interactúan directamente con los lípidos y proteínas de la

membrana, alterando el comportamiento de su fase de transición y su estado de hidratación (Holt, 2.000).

- b) Crioprotectores que no penetran la célula y de peso molecular bajo. Se incluyen proteínas como las contenidas en la leche o la yema de huevo, azúcares como la lactosa, fructosa, manosa y tetralosa; polímeros sintéticos como la metil celulosa, y las amidas. (Amann, 1.995).

En su orden, el efecto crioprotector de los azúcares, aparentemente es aumentar el porcentaje de agua no congelada a ciertas temperaturas o reducción de la concentración de sales en la solución acuosa no congelada (Holt, 2.000).

- c) Crioprotectores que no penetran a la célula y de peso molecular elevado, como son el polyvinylpilorridon (PVP), el dextran, la albúmina de suero bovino, etc. (Holt, 2000).

La elección del crioprotector prácticamente se hace por ensayo y error, debido a que no se conoce completamente la acción de cada uno de sus componentes ni el efecto conjunto de la sustancia sobre los espermatozoides (Holt, 2.000).

El espermatozoide requiere soportar los rigores de cada uno de los pasos de la crio preservación, manteniendo su capacidad de fertilización, sustentado por un diluyente que asegure la recuperación de todos los compartimentos espermáticos, esto implica que se optimice el proceso de congelación, junto con la composición de los diluyentes, para minimizar los daños que no pueden ser corregidos (Hammerstedt, 1.999).

3.3.1.1.1. Glicerol

El glicerol es el crioprotector más usado frecuentemente. Actúa como crioprotector penetrante y sirve como solvente y soluto en el diluyente. (Vidament *et al*, 2.001; Holt, 2.000; Critser, 1.999; Amann, 1.995).

Las características de descripción química del glicerol son: 1, 2, 3 propanetriol o glicerina, C₃ H₈ O₃, peso molecular 92.09; C39.12% H8.75% O52.12%.

CH₂OHCHOHCH₂OH. Es un líquido viscoso y su sabor es suave tibio. Se solidifica a 0 C formando cristales ortorrómbicos. Su punto de fusión es 17.8 C. y su punto de ebullición es a 760 mm. de Hg. 290C. (Yoshida, 2000).

El efecto crioprotector del glicerol contra el congelamiento de los espermatozoides se debe a que este tiene un punto de congelación más bajo que el del agua, minimizando la concentración extracelular de solutos y aumentando las posibilidades de supervivencia de los espermatozoides dentro de los cristales de hielo del solvente; es decir, incrementa la fracción no congelada en el exterior de la célula y ayuda al mantenimiento de la presión osmótica del diluyente y la célula (Holt, 2.000; Amann, 1.995; Hafez, 1.999; Gongora *et al.*, 1.983). Sin embargo, el glicerol es tóxico pues altera la morfología de las células espermáticas cuando se adiciona a temperatura ambiente, además de limitar la acción protectora de otros compuestos presentes en el diluyente, e interferir parcialmente con la acción inhibitoria de los antibióticos (Holt, 2.000; Vargas, 1.997; Amann, 1.995).

Algunas investigaciones han evidenciado que la presencia de un nivel alto de glicerol en el diluyente, causa daños a la membrana celular, altera la permeabilidad, inducen la fusión entre membranas e inhibe la actividad enzimática (Yoshida, 2000).

Se postula que el daño que el glicerol ejerce sobre las células se debe a que afecta la viscosidad del citoplasma alterando las tasas de difusión mediada de la célula. De otro lado, debido a su carácter penetrante, el glicerol se instala en la bicapa lipídica de la membrana celular, provocando cambios en su estructura lipídica y, por tanto, afectando su estabilidad y permeabilidad al agua. Este efecto también provoca alteraciones en las vías de transmisión de señales celulares, lo que, al parecer, puede inducir una reducción de la longevidad espermática pues se aceleran sus procesos de capacitación. Así mismo, es probable que interfiera con el balance entre la utilización y la síntesis de ATP, lo que conduce a daño irreversible durante el enfriamiento de las células, aunque, aparentemente, esto no ocurre en todas las especies. Igualmente, la cantidad de glicerol durante la descongelación afecta la integridad del acrosoma (Hereng *et al.*, 2011).

Para reducir el daño que pueda causar el glicerol al espermatozoide, algunos autores proponen adicionarlo de manera lenta para evitar los cambios de volumen en la célula cuando el agua y el glicerol difunden a través de la membrana plasmática y, ojalá, se hiciera a bajas temperaturas (4 – 5 –°C), más que a la temperatura ambiente (22 o 37 °C) (Amann, 1.995).

Sin embargo, teniendo en cuenta lo descrito, se ha encontrado, que el daño celular de los espermatozoides congelados con glicerol es menor que el producido al utilizar otros crioprotectores como el DMSO, el cual induce a la célula a un estrés osmótico (Gao *et al*, 1.995; Bustamante *et al.*, 1.981; Fiser *et al.*, 1.996; Robbins *et al*, 1.976; Colas *et al.*, 1.977; Locksley, 1.978; Holt, 2.000).

La inclusión de glicerol en semen de cabro según Leboeuf (2.000), está en un rango de 3-9%; aunque Salamon (2.000), reporta inclusiones de glicerol de hasta un 15 a 20%, lo cual favorece la retención de la transaminasa oxaloacética glutámica. Holt (2.000), reporta datos de inclusión de 3 a 20% en semen de marsupial y de ratones, obteniendo buenos resultados en la evaluación del semen. No obstante según los porcentajes descritos, aún persiste mucha incertidumbre sobre la concentración ideal u óptima del diluyente, con sus respectivos componentes que permita la máxima viabilidad del semen de caprinos.

3.3.1.2. Medios Buffer y Azúcares

Desde los años 70 se ha venido experimentando con el uso y concentración de los medios buffer. Básicamente se ha estudiado y observado la buena capacidad tamponante que tiene el citrato para mantener el pH adecuado para la célula espermática (Simon, 1.981; Salamon, 2.000).

En 1.959 se reportó que la inclusión de arabinosa (5.85%) o urea (2.4%) en cambio de la glucosa mejoraba la supervivencia de los espermatozoides post-calentamiento (Salamon, 2.000). Debido a esta acción del glicerol, muchos investigadores usaron hipertónicamente citrato – azúcar – yema de huevo como diluyentes con una presión osmótica de 8-12 atmósferas (Maxwel, 1.995).

3.3.1.3. Antibióticos

Los antibióticos adicionados al diluyente se pueden seleccionar dependiendo de su estabilidad con el pH del diluyente; por ejemplo, la penicilina es muy estable en el diluyente basado en citrato y, junto con la estreptomicina, actúa bien sobre gran negativos (Vargas, 1.997). Es importante saber que los antibióticos actúan sobre bacterias y no sobre virus, para los cuales se deben tener otro tipo de controles (Hafez, 1.999).

3.3.1.4. Protectores contra el Choque Térmico

Desde 1932 investigadores comenzaron a describir la adición de lípido (yema de huevo) en el diluyente para proteger la célula espermática contra el choque térmico (Salamon, 2.000). Posteriormente en 1939, se mostró el efecto benéfico de la yema de huevo sobre el almacenamiento y la congelación del semen a temperaturas cercanas a cero grados (Hatn, 1.989). La leche descremada y calentada a 90 °C/10 minutos (para inactivar la acción fatal de las enzimas de la leche sobre los espermatozoides), también ha sido utilizada como protector contra el choque térmico, pero con esta no se consiguen tan buenos resultados como cuando se utiliza el agregado de yema de huevo (Keskinetep *et al*, 1.998).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Localización

El trabajo de campo se desarrollo en un sistema de producción de leche caprina ubicado en el municipio de Subachoque departamento Cundinamarca, localizado a los 4o 55' 41" latitud norte y 74o 21' 25" de longitud oeste; altura sobre el nivel del mar 2663 metros; temperatura media de 13.3 °C; humedad relativa 60% y precipitación 824.2 mm/año.

El trabajo de laboratorio se realizo en colaboración con el Laboratorio de Hormonas de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá D.C., en el cual se midieron y calcularon las

concentraciones requeridas de los componentes del diluyente para crio preservación a utilizar. Igualmente se utilizó el material y equipos necesarios, reglamentarios para llevar a cabo los procedimientos adecuadamente.

4.2. Grupo experimental

Se trabajaron 3 reproductores, de la raza Sannen, los cuales correspondieron a animales adultos entre 2.5 a 3.5 años de edad; con pesos entre 68 a 75 kilogramos y condición corporal entre 3 y 4, en escala calificatoria de 1 a 5 (Edmonson et al., 1989). Estos machos tenían fertilidad comprobada (preñeces comprobadas). Igualmente se verifico su estado sanitario con el cual se descarto la presencia de enfermedades con los exámenes pertinentes de laboratorio. Adicionalmente se verifico su capacidad de eyaculado por medios artificiales (Vagina artificial). Los animales se manejaron bajo pastoreo en praderas sembradas con una mezcla de *Lolium Peremne* (Rye Grass) y *Pennisetum clandestinum* (Kikuyo); igualmente se suministro sal mineralizada y agua a voluntad.

4.3. preparación de diluyente

Se utilizo un diluyente bajo sistema de dos pasos (diluyente de dos fracciones: A y B) el cual estaba compuesto básicamente de citrato-fructosa (80%).

La fracción 1 (A) del diluyente específicamente estaba conformada por citrato de sodio al 2.9% deshidratado, 1.25% de fructosa, 100 UI de penicilina por cada 5ml. y 1ml. de estreptomycin por cada ml. Estos componentes fueron filtrados en poro de 0.22. El otro 20% del diluyente lo componía el protector contra el choque térmico; en este caso se utilizo yema de huevo. La fracción 2 (B) del diluyente tenia la misma composición de la fracción 1 (A) mas un porcentaje de glicerol.

Se realizaron tres diluyentes de la fracción 2 (B), cada una con tres concentraciones diferentes de Glicerol; 6, 7 y 8%, los cuales fueron los tratamientos a utilizar en la investigación.

4.4. Colectas y procesamiento seminal

El semen se colecto con vagina artificial la cual se mantuvo a temperatura interna de 39° C. Esta vagina contaba con tubos colectores estériles (falcon®) graduados por mililitros; los cuales también estaba atemperados a 39° C.

Luego de colectar el semen se mantuvo a una temperatura de 37° C. para evitar choque térmico que pudiera alterar a las células espermáticas. Se evaluaron sus características macroscópicas directamente en el tubo colector Falcon® (Color, consistencia y volumen) y microscópicas utilizando microscopio con contraste de fases Nikon® (motilidad progresiva individual, vivos y anomalías).

Para el calculo de la concentración se utilizo cámara de Neubauer®. Las anomalías se calcularon mediante metodología de tinción utilizando eosina nigrosina (1:1) y se observaron utilizando lente de inmersión en microscopio con contraste de fases Nikon®

De acuerdo a las características seminales (Volumen, concentración, motilidad y morfología) se procedió a agregar la mitad del volumen total del diluyente (fracción A. - 37° C) teniendo en cuenta que se realizo dilución de dos pasos (fracción A y B), donde la primera fracción es sin glicerol y la segunda es la fracción glicerolada (tratamiento planteado para la investigación), la cual se aplico a 5° C.

Los formula utilizada para dilución fue la siguiente:

$$\text{Volumen eyaculado} \times \text{concentración} \times \frac{\text{motilidad progresiva individual}}{\text{normalidad}}$$

Concentración a dejar cada dosis de 0.5 ml (50 millones por dosis)

$$= \text{Volumen final} - \text{Volumen eyaculado} = \text{Cantidad total de diluyente a utilizar} / 2 = \text{cantidad de fracción A (aplicar a 37° C) y B de diluyente a aplicar (aplicar a 5° C)}$$

Antes de la primera dilución (fracción A) se realizó un proceso de centrifugación del semen a 1400 RPM/8 minutos, utilizando una solución de citrato fructosa. Esto con la finalidad de poder separar el paquete espermático del plasma seminal.

Posterior a la primera dilución se comenzó la curva de descenso de temperatura (en nevera calibrada a 5° C) con el fin de llevar a 5° C el semen en dos horas (aproximadamente 1° C cada 4 minutos).

4.4.1. Aplicación de los tratamientos a muestras seminales

Al llegar a los 5° C se procedió a dividir en tres alícuotas iguales el semen ya diluido con la fracción A; enseguida se le aplicó a cada alícuota de semen cada una de la fracción B de diluyente correspondiente a la parte glicerolada (tratamiento 6, 7 y 8% de glicerol). Luego de esto el semen a 5° C se dejó en equilibrio por dos horas tiempo suficiente para que el glicerol deshidratara e ingresara a la célula espermática.

Después del equilibrio por dos horas el semen se empacó en pajillas de 0.5 ml. las cuales se dejaron con una concentración de 50.000.000 millones de espermatozoides. Las pajillas se marcaron previamente con los siguientes datos:

- Nombre del macho
- Raza
- Fecha
- % de glicerol (Tratamiento)

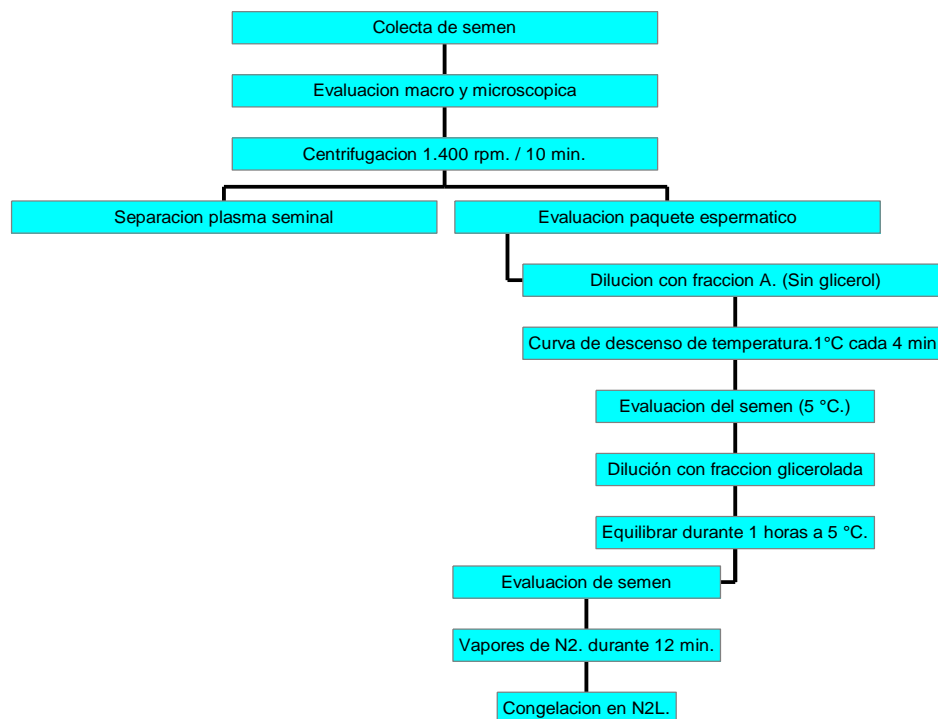
Las pajillas se comenzaron a congelar sometiéndolas a vapores de nitrógeno líquido a una altura de 8 centímetros (pajilla – nitrógeno) por 10 minutos. Pasado este tiempo se sumergieron en nitrógeno líquido (T° de –196° C).

En total se realizaron 3 colectas seminales por macho (tres machos), para lo cual se dejaron descansar ocho (8) días entre colecta y colecta para garantizar una buena recuperación reproductiva.

Se obtuvieron en total 9 eyaculados; cada eyaculado se dividió en 3 alícuotas iguales para que a cada una de estas le correspondiera aplicar un nivel diferente de inclusión de la fracción 2 (B) de glicerol (cada uno de los tratamientos). En total se obtuvieron 27 muestras (nueve eyaculados divididos en tres alícuotas). Cada una de las 27 muestras fueron sometidas a congelación en pajillas de 0.5 ml., de las cuales se descongelaron 3; es decir, 81 muestras en total (27 muestras por tres pajillas por muestra) en total fueron analizadas estadísticamente (27 pajillas con inclusión de glicerol al 6%, 27 pajillas con inclusión de glicerol al 7% y 27 pajillas con inclusión de glicerol al 8%).

Posteriormente se procedió a descongelar las pajillas a 37° C durante un minuto para someter a evaluación espermática en donde se verifico el porcentaje de recuperación de la motilidad progresiva individual y el porcentaje de anomalías espermáticas y el porcentaje de células vivas; estas variables se verificaron de acuerdo a la misma metodología utilizada con el semen fresco.

CONGELACIÓN DE SEMEN CAPRINO



4.5. Analisis estadístico

Para determinar el comportamiento de variables previo a congelación seminal (Volumen, concentración, motilidad progresiva individual, morfología y vivos) se utilizo estadística descriptiva en donde se evidencian promedios, desviaciones estándar y coeficiente de variación para cada una de las variables (Véase tabla 4).

Tabla 4. Características seminales en fresco por macho y general

MACHO	MUESTREO	Volumen (ml.)	Concentracion (Millones/ml.)	Motilidad progresiva individual (%)	Vivos (%)	Anormalidades primarias (%)	Anormalidades secundarias (%)
1	1	1.0	2800	90	95	1.5	3.0
	2	1.2	2000	85	80	2.0	2.5
	3	1.6	3000	90	86	2.0	2.0
	Promedio	1.3	2600	88	87	1.8	2.5
	DS	0.2	432	2	6	0.2	0.4
	CV	19.7	16.6	2.7	7.1	12.9	16.3
2	1	1.3	3000	85	80	2.0	2.8
	2	1.4	2560	80	75	3.0	2.5
	3	1.8	3560	80	78	2.0	1.5
	Promedio	1.5	3040	82	78	2.3	2.3
	DS	0.2	409.2	2.4	2.1	0.5	0.6
	CV	14.4	13.5	2.9	2.6	20.2	24.5
3	1	1.4	3030	90	85	2.0	1.6
	2	1.5	2500	90	85	1.5	1.5
	3	2.0	2800	85	80	1.5	2.0
	Promedio	1.6	2777	88	83	1.7	1.7
	DS	0.3	217.0	2.4	2.4	0.2	0.2
	CV	16	7.8	2.7	2.8	14.1	12.7
Promedio general		1	2806	86	83	2	2

*Todos los resultados se expresan como promedio, desviación estandar y coeficiente de variación.

Para la distribución de las muestras (alícuotas) en los tratamientos (6, 7 y 8% de glicerol) se utilizó la metodología correspondiente a la generación de números aleatorios, los cuales provenían de una distribución uniforme continua (0,1). (Resultado de una variable al azar especificada por una distribución) (Rienzo et al., 2001).

Para determinar el efecto de los tratamientos (6, 7 y 8% de glicerol) sobre las variables respuesta “motilidad progresiva individual, vivos y anomalías” se

empleo un modelo completamente aleatorizado con el peso, condición corporal y edad como covariables.

Para todas las variables que se analizaron mediante el modelo de covarianza (motilidad progresiva individual, vivos y anormalidades), la homeogeneidad de varianzas de los tratamientos se probó mediante una prueba F (Steel and Torrie, 1980).

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el paquete especializado estadístico Analytics Pro SAS[®].

4.5.1. Variables respuesta

- I. Motilidad progresiva individual
- II. Porcentaje de espermatozoides vivos pos descongelación
- III. Porcentaje de anormalidades espermáticas posdescongelacion (Primarias, secundarias y total)

5. RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 5 se muestra la comparación entre los tratamientos utilizados (glicerol al 6, 7 y 8 %), en cuanto a las variables de motilidad progresiva individual (%), anormalidades primarias (%), anormalidades secundarias (%), y total de anormalidades (%).

Tabla 5. Variables espermáticas según tratamiento (6, 7 y 8 % de glicerol)

Machos	Tratamiento con glicerol (%)	Motilidad progresiva individual (%)		Vivos (%)		Anormalidades primarias (%)		Anormalidades secundarias (%)		Anormalidades totales (%)	
		Media	Letra	Media	Letra	Media	Letra	Media	Letra	Media	Letra
3 (n=81)	6 (n=27)	63.69	b	70.63	b	2	a	9.13	a	11.13	a
	7 (n=27)	72.34	a	82.36	a	2.1	a	6.3	b	8.40	b
	8 (n=27)	56.69	c	65.6	c	2.4	a	9.76	a	12.16	a

*Todos los resultados se expresan como promedio

5.1. Efecto de la concentración de glicerol (6, 7 y 8%) en el diluyente sobre el porcentaje motilidad progresiva individual

En el presente estudio de acuerdo a la variable de recuperación de la motilidad progresiva individual se evidencio diferencias ($P < 0.05$) entre los tratamientos utilizados (diluyente para crio preservación con glicerol al 6, 7 y 8%), siendo mayor esta motilidad cuando al diluyente se aplicó glicerol al 7%, seguido por glicerol al 6% y por ultimo glicerol al 8% (Véase grafica 1).

Este resultado difiere a lo encontrado en estudios similares, como el de Bernal (2005), quien encontró que con la utilización de glicerol al 6% en diluyente para crio preservación de células espermáticas caprinas se evidenciaban motilidades pos descongelación mayores estadísticamente frente a porcentajes de 7 y 8% de glicerol; en ese estudio se utilizo la raza Alpina francesa, siendo el promedio poblacional de recuperación de la motilidad 48%, dato menor numéricamente hablando frente a los promedios encontrados en el presente estudio si se observan los tres diferentes promedios obtenidos con cada uno de los tratamientos de glicerol utilizados (Véase tabla 5).

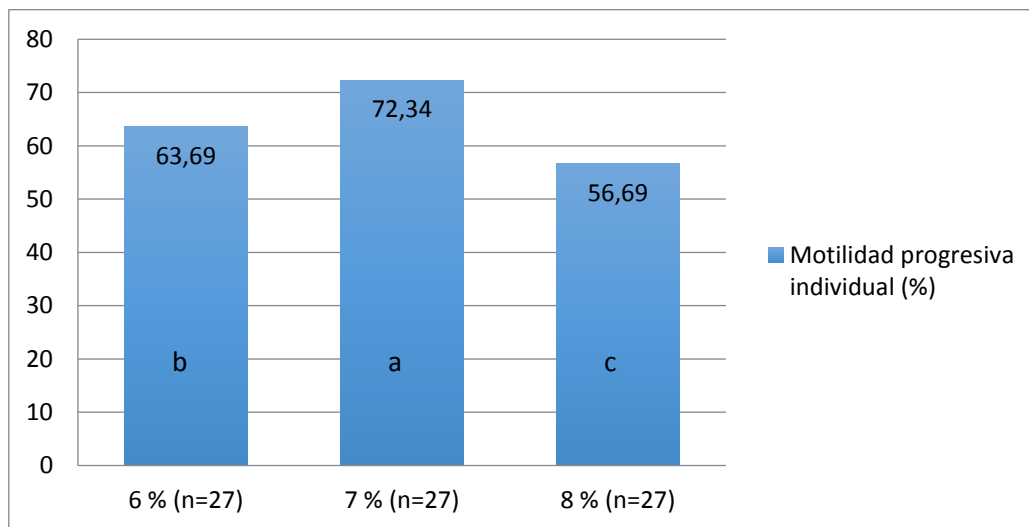
Grajales (1990), reporta como promedio poblacional de recuperación de la motilidad progresiva individual 59%, estudio en el cual utilizo diluyente a base de yema de huevo y glicerol al 6%. Ferrari (1999), reporta igualmente como motilidad poblacional 49% utilizando diluyente a base de leche descremada y dimetilsulfoxido (DMSO) como crioprotector.

Tovío en el 2004, trabajando con tres razas caprinas (Saanen, alpina y criolla colombiana) encontró que utilizando glicerol al 7% en el diluyente se obtenían estadísticamente mejores porcentajes de recuperación de la motilidad progresiva individual. En ese mismo estudio se obtuvo un promedio general de recuperación de la motilidad progresiva individual del 57%, dato similar numéricamente al encontrado en el presente estudio cuando se utilizo glicerol al 8%, y menor numéricamente cuando se utilizo al 6 y 7% (Véase tabla 5).

En el presente estudio los promedios de la recuperación motilidad progresiva

individual en cada uno de los tratamientos podrían considerarse entre los valores normales encontrados pos descongelación seminal en caprino (Kelli, 1997). Según referencias estos valores deberían tener un rango entre 60 y 90% para que se considere en programas de inseminación artificial con mejor promedio de fecundidad, por lo cual se podría plantear que la motilidad progresiva individual obtenida con diluyente con glicerol al 6 y 7% cumplirían los estándares de calidad, evidenciándose mejores resultados con glicerol al 7% (Véase tabla 5)

Se evidencia en los estudios revisado y similares que posiblemente el factor racial, latitud, nutrición, manejo de las muestras, diluyentes utilizados e individualidades son determinante en cuanto a las diferentes respuestas numéricas obtenidas en los estudios referenciados frente a la presente investigación.



Grafica 1. Comportamiento de la motilidad progresiva individual de las células espermáticas (%) de acuerdo al porcentaje de glicerol en el diluyente (tratamientos al 6, 7 y 8 %).

5.2. Efecto de la concentración de glicerol (6, 7 y 8%) en el diluyente sobre e porcentaje de espermatozoides vivos

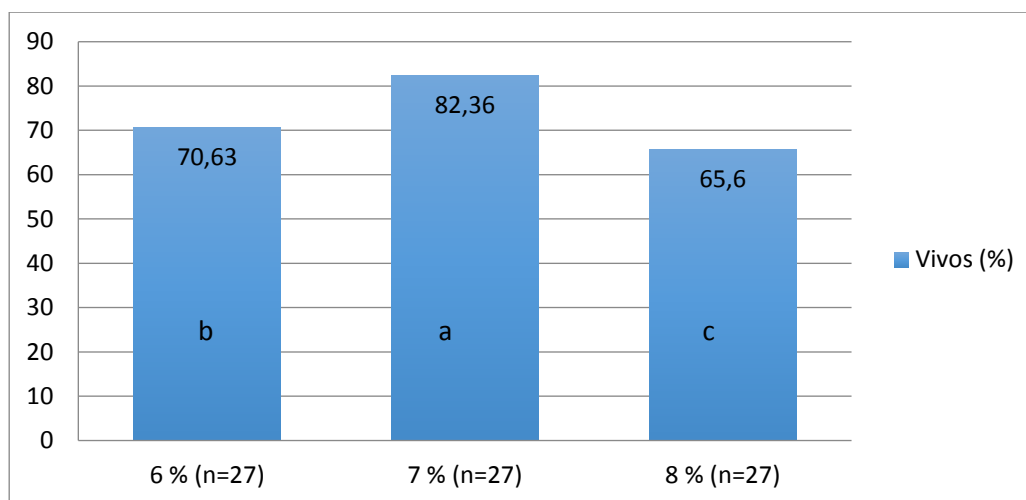
En el presente estudio de acuerdo a la variable de espermatozoides vivos se evidencio diferencias ($P < 0.05$) entre los tratamientos utilizados (diluyente para crio preservación con glicerol al 6, 7 y 8%), siendo mayor esta motilidad cuando al diluyente se aplicó glicerol al 7%, seguido por glicerol al 6% y por ultimo glicerol al 8% (Véase grafica 2).

Este resultado es igualmente concordante con los datos encontrados de acuerdo a la variable de recuperación de la motilidad progresiva individual encontrados (Véase grafica 1).

Ramírez (1993), trabajando con machos de la raza Saanen y diluyente a base de leche descremada encontró un promedio poblacional de 92%; sin embargo otros autores como Tovío (2004), trabajando con tres razas caprinas encontró un promedio general de vitalidad de 40.2%, utilizando diluyente a base de yema de huevo y glicerol como crio protector; y Bernal (2005), 53% en machos alpinos utilizando diluyente al 7% de glicerol.

De acuerdo a lo anterior Salamon (2000), afirma que la viabilidad espermática pos descongelación en células caprinas debe estar en un rango entre 40 y 50%, por lo cual los porcentajes obtenidos en el presente estudio serian satisfactorios en cualquiera de los tres tratamientos utilizado (6, 7 y 8% de glicerol); resaltando los mayores porcentajes de espermatozoides vivos al utilizar el glicerol al 7%.

Al igual que la variable anteriormente analizada (recuperación de la motilidad progresiva), en los estudios revisados las respuestas pueden estar influenciadas posiblemente por el factor racial, latitud, nutrición, manejo de las muestras, diluyentes utilizados e individualidades, variable que indudablemente podrían determinar en cuanto a las diferentes respuestas numéricas obtenidas en los estudios referenciados frente a la presente investigación.



Grafica 2. Comportamiento de células espermáticas vivas (%) de acuerdo al porcentaje de glicerol en el diluyente (tratamientos al 6, 7 y 8 %).

5.3. Efecto de la concentración de glicerol (6, 7 y 8%) en el diluyente sobre el porcentaje de anomalías primarias

En el presente estudio de acuerdo a la variable de espermatozoides vivos no se evidencian diferencias ($P > 0.05$) entre ninguno de los tratamientos utilizados (diluyente para crío preservación con glicerol al 6, 7 y 8%), siendo solamente diferencias numéricas (Véase grafica 3).

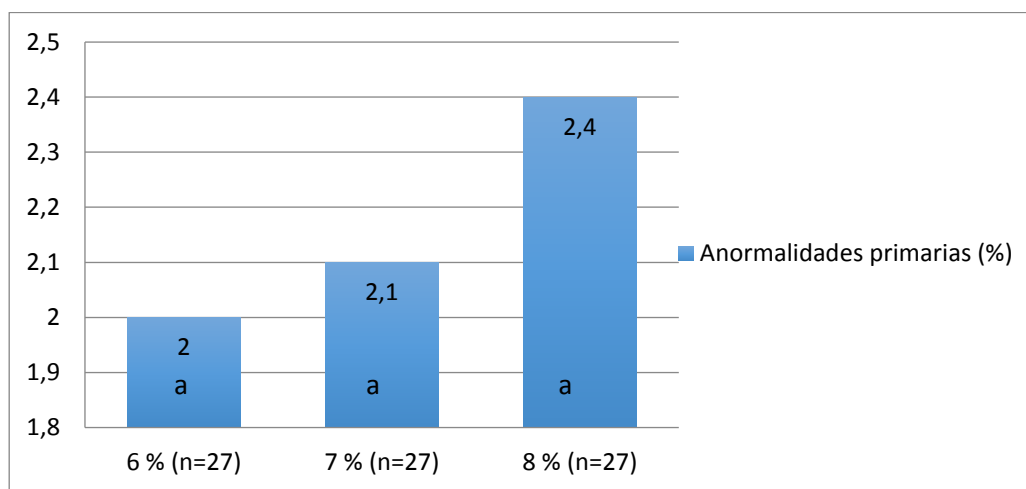
Este resultado es entendible desde el punto de vista que machos que poseen fertilidad comprobada de acuerdo a sus porcentajes de preñez, son los utilizados para las diferentes experimentaciones, esto con la finalidad de descartar este factor de infertilidad por posibles alteraciones espermáticas como lo son las anomalías que puedan influir sobre los resultados.

De acuerdo a lo anterior se evidencian en el presente estudio que numéricamente el rango de anomalías encontrados están en los reportados por otros autores como Salamon y Maxwell (2000) y Grajales (1994), quienes plantean que rangos de anomalías primarias entre 1.4 y 4.5%, son ideales para semen de animales en condiciones aceptables de

fertilidad.

El resultado encontrado en el presente estudio concuerda con lo reportado por Bernal (2005), en donde no se reportaron diferencias estadísticas pos descongelación para esta variable. En ese experimento se utilizó glicerol al 7% en semen de la raza caprina alpina, y su objetivo fue medir siete tiempos de equilibrio del semen a una temperatura de 4 C°.

Igualmente Tovió (2004), para esta variable no encontró diferencias estadísticas en semen de las razas Alpina, Saanen y Criolla colombiana. En el citado estudio se utilizó diluyente al 7% de glicerol, y los datos promedio poblacional para esta misma variable estuvo numéricamente muy similar (2.16%) a los encontrados en el presente estudio tanto para el tratamiento 6, 7 y 8% de glicerol.



Grafica 3. Comportamiento de las anomalías primarias en las células espermáticas (%) de acuerdo al porcentaje de glicerol en el diluyente (tratamientos al 6, 7 y 8 %).

5.4. Efecto de la concentración de glicerol (6, 7 y 8%) en el diluyente sobre el porcentaje de anomalías secundarias

En el presente estudio de acuerdo a la variable de porcentaje de anomalías secundarias se evidenció diferencias ($P < 0.05$) entre los tratamientos utilizados (diluyente para crio preservación con glicerol al 6, 7 y 8%), siendo menor el porcentaje de estas anomalías cuando al diluyente se aplicó glicerol al 7%, lo cual concuerda con el comportamiento que presentó la variable de motilidad progresiva individual, la cual igualmente presentó mejores características estadísticas en el semen congelado con el 7% de glicerol (Véase gráfica 4).

Este resultado concuerda con lo encontrado por Tovío (2005), cuando utilizó diluyente al 7% de glicerol encontrando estadísticamente menores incrementos de anomalías secundarias (5.4%) frente a diluyentes al 6 y 8 % de glicerol.

Grajales (1990), reporta encontrar un máximo de anomalías secundarias en muestra poblacional pos descongelación de 5.2%, y Bernal (2005), reporta 7% de anomalías encontradas.

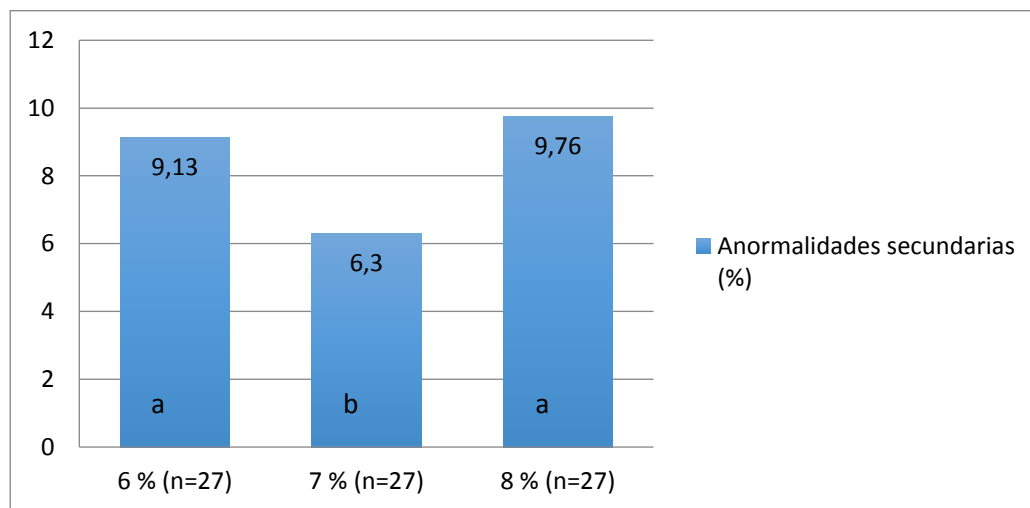
De los anteriores porcentajes encontrados en los diferentes estudios se podría determinar que en el presente estudio esta variable de anomalías secundarias se comportó dentro del rango numérico encontrado en los reportes citados y que según Grajales (1990), estarían dentro de los rangos aceptables para semen pos descongelación sin afectar su fertilidad.

Posiblemente el mejor comportamiento en cuanto a menores porcentajes de anomalías secundarias pos descongelación cuando se utilizó glicerol al 7% como agente crioprotector contra el congelamiento de los espermatozoides se debió a que a esta concentración se minimizó la concentración extracelular de solutos lo cual aumenta las posibilidades de supervivencia de los espermatozoides dentro de los cristales de hielo del solvente; es decir, incrementa la fracción no congelada en el exterior de la célula y ayuda al mantenimiento de la presión osmótica del diluyente y la célula (Holt, 2000).

Algunas investigaciones han evidenciado que la presencia de un nivel alto de glicerol en el diluyente, causa daños a la membrana celular, altera la permeabilidad, inducen la fusión entre membranas e inhibe la actividad enzimática, por lo cual se podría de alguna manera decir que al 7% en criopreservante para caulas espermáticas caprinas se evita este daño y también mantendría la integridad del acrosoma.

(Hereng *et al.*, 2011).

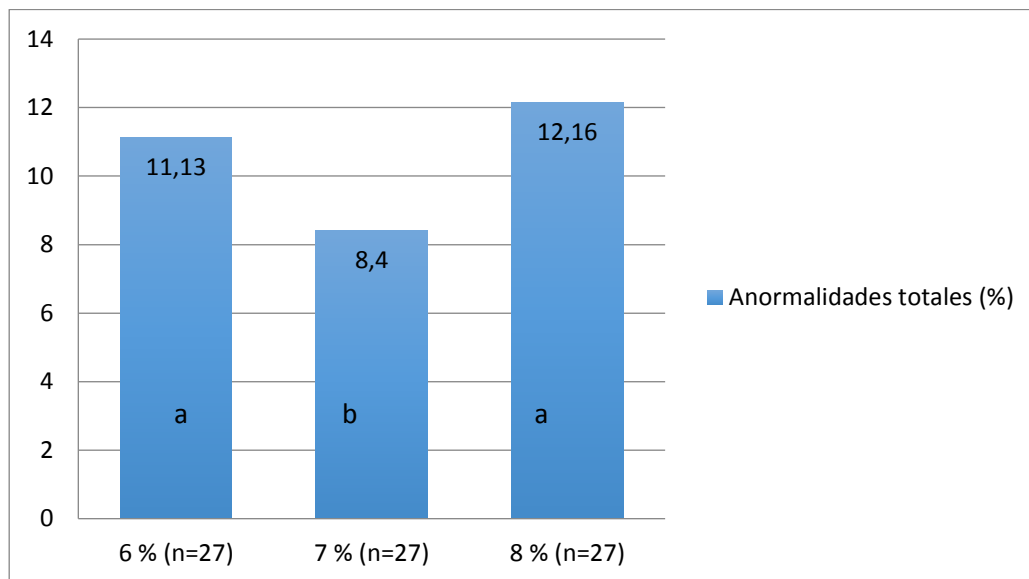
La inclusión de glicerol en semen de caprino según Leboeuf (2.000), podría estar está en un rango de 3-9%; por lo cual se podría decir que en el presente estudio se evidencio que se presenta mejores características en cuanto al no incremento de anomalías secundarias cuando se utiliza el glicerol al 7%. Igualmente la mejor de características también se evidencia en la recuperación de la motilidad progresiva individual (Véase grafica 1).



Grafica 4. Comportamiento de las anomalías secundarias en las células espermáticas (%) de acuerdo al porcentaje de glicerol en el diluyente (tratamientos al 6, 7 y 8 %).

5.5. Efecto de la concentración de glicerol (6, 7 y 8%) en el diluyente sobre el porcentaje de anomalías totales

En el presente estudio de acuerdo a la variable de porcentaje total de anomalías (Primarias y secundarias) se evidencio diferencias ($P < 0.05$) entre los tratamientos utilizados (diluyente para crio preservación con glicerol al 6, 7 y 8%), siendo menor el porcentaje de estas anomalías cuando al diluyente se aplicó glicerol al 7%, lo cual era de esperarse ya que esta variable es la sumatoria de anomalías primarias y secundarias; por tal motivo concuerda con el comportamiento que presento la variable de anomalías secundarias, la cual igualmente presento mejores características estadísticas en el semen congelado con el 7% de glicerol (Véase grafica 5).



Grafica 5. Comportamiento de las anomalías totales en las células espermáticas (%) de acuerdo al porcentaje de glicerol en el diluyente (tratamientos al 6, 7 y 8 %).

6. CONCLUSIONES

- Existió efecto de la concentración de glicerol al 6, 7 y 8 % en el total del diluyente, sobre el porcentaje de motilidad progresiva individual en semen caprino en el trópico alto colombiano pos descongelado, siendo mejor la motilidad cuando se utilizo glicerol al 7%.
- No se evidencio efecto de acuerdo a la concentración de glicerol al 6, 7 y 8 % en el total del diluyente, sobre el porcentaje de espermatozoides vivos en semen caprino pos descongelado en el trópico alto colombiano.
- La concentración de glicerol al 6, 7 y 8 % en el total del diluyente para semen caprino en el trópico alto colombiano no influye sobre el porcentaje de anormalidades primarias
- Existió efecto de la concentración de glicerol al 6, 7 y 8 % en el total del diluyente, sobre el porcentaje de anormalidades secundarias espermáticas caprinas pos descongeladas presentándose menor porcentaje cuando se utilizo glicerol al 7%.
- Existió efecto de la concentración de glicerol al 6, 7 y 8 % en el total del diluyente, sobre el porcentaje total de anormalidades en semen caprino en el trópico alto colombiano pos descongelado, presentándose menor porcentaje cuando se utilizo glicerol al 7%.

7. RECOMENDACIONES

Es necesario diseñar estudios que permitan comparar diferentes porcentajes de glicerol con diferentes, tipologías raciales en diferentes latitudes que permitan evidenciar claramente el efecto de las covariables relacionadas.

Sería pertinente realizar investigaciones a nivel molecular, en las que se profundice acerca de los factores determinantes celulares que involucran el efecto de las diferentes concentraciones de glicerol sobre la célula espermática caprina.

Es importante realizar investigaciones que permitieran determinar la fertilidad de la célula espermática caprina sometida a diferentes concentraciones de glicerol y determinar bajo inseminación artificial el posible efecto del porcentaje de glicerol sobre el porcentaje de preñez.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Amman, R. P. Response of spermatozoa to freezing. Techniques of transported cooled and frozen equine spermatozoa. Fort Collins, Colorado, 1995.
2. Bustamante, C. G.; Valencia, M. J. Acción del silfoxido de dimetilo y glicerol como agentes crioprotectores del acrosoma del espermatozoide de carnero durante la congelación. Vet Mex. 1981; 12: 211-216.
3. Bernal, L. Congelacion de semen caprino utilizando 7 tiempos de equilibrio a 5 C°. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Colombia. Bogota, 2004.
4. Colas, G.; Courot, M. Production of ezpermatozoa storage of semen and artificial insemination in sheep. Proceedings of the Symposium of Management of Reproduction in sheep and Goats. June 10 -14 Madison WIS. University of Wisconsin. 1977; 31- 40.
5. Corteel, J. M. Collection, processing and artificial insemination of goat semen. In: Goat production. Edited by. Call C. 1981; 171 – 191.
6. Critser, J. K. Principles of criobiology. Proceedings of the semen cryopreservation and AI symposium. The society of Theriogenology. Nashville, Tennessee, septiembre, 1999.
7. Dejarnette, J. M. Factors affecting the cuality of frozen semen after thawing. Proceedings of the semen cryopreservation and AI symposium. The society of Theriogenology. Nashville, Tennessee, septiembre, 1999.
8. Deka, B. C.; Rao, A. R. Effect of glycerol level in tris base extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. Indian vet. 1984; 54: 223 – 238.
9. Evans G and Maxwell W M C. Inseminación artificial en ovejas y cabras. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, 1990.
10. Fiser, P. S. *et al.* Glycerol Equilibration time revisió. Reproduction in domestic animals, vol. 1996; 31 (1), Junio.
11. Forero, G. Congelación de semen equino. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. 2003.

12. Gao, G. Y.; Ashworth, E.; Watson, P. F.; Kleinhans, F. W.; Mazur, P.; Crister, J. K. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa. Separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biol. Reprod.* 1995; 49: 112 – 123.
13. Giraud, M. N.; Motta, C.; Boucher, D.; Grizard, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 2160 – 2164.
14. Gongora, I.; Salgado, J. Comparación de la motilidad espermática del semen caprino. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1983.
15. Grajales L H A. Comparación de la fertilidad entre diluyentes para semen y hormonas para controlar la ovulación en cabras inseminadas artificialmente con semen fresco y congelado. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de estudios superiores. México, 1990.
16. Grajales, H., Ospina O. Desarrollo e implementación de un Sistema de Gestión Tecnológica en los Sistemas de Producción de la Cadena Ovino- Caprina para el mejoramiento de su competitividad SIGETEC. Programa de Investigación – Universidad Nacional de Colombia – Universidad de La Salle, Corpoica, ANCO. MADR – Programa Transición de la Agricultura. Bogotá, Enero 2007 – Diciembre 2011. Informes Técnicos - 2012.
17. Grajales, H., Tovío, N., Diuca, A. Manejo y control reproductivo - guía técnica de producción ovina y caprina (III). Editorial Universidad Nacional de Colombia. 2011.
18. Grajales, H. Comparación de la fertilidad entre diluyentes para semen y hormonas para controlar la ovulación en cabras inseminadas artificialmente con semen fresco y congelado. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1990.
- 19.
20. Hafez, E. S. E. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7 ed. McGraw-Hill interamericana. México, 1999.
21. Hahn, R. Contribution to the deep freezing – preservation of goat buck – and ram semen. *Anim. Pro.* 1989; 8: 80 – 85.

22. Hammersted, R. H. Effect of different components sperm cryopreservation. Proceedings of the semen cryopreservation and AI symposium. The society of Theriogenology. Nashville, Tennessee, septiembre, 1999.
23. Hereng TH, Elgstøen KB, Cederkvist FH, Eide L, Jahnsen T, Skålhegg BS, et al. Exogenous pyruvate accelerates glycolysis and promotes capacitation in human spermatozoa. Hum Reprod 2011; 26:3249–63.
24. Holt W E. Basic aspects of frozen storage of semen. Animal reproduction science. 2000; 62: 3 –17
25. Jian-Hua Qiu et al. Effects of glucose metabolism pathways on sperm motility and oxidative status during long-term liquid storage of goat semen. Theriogenology. 2016; 86: 839–849
26. Karagiannidis, A.; Varsakeli, S.; Karatzas, G. Characteristics and seasonal variations in the semen of alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. Theriogenology. 2000; 53: 1288 – 1293.
27. Karp G. Cell and Molecular Biology. Fifth edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2008. p. 194.
28. Kelly M P, Carson S L, Gocial B, Batzer F R, and Gutmann J N. Discontinuous percoll gradient preparation for donor insemination. Determinants for success. Humn Reprod. 1997; 12: 2682 – 2686.
29. Keskintep, L.; Simplicio, A. A.; Bracken, B. G. Caprine blastocyst development after in vitro fertilization with spermatozoa frozen in different extenders. Theriogenology. 1998; 49: 1265 – 1274.
30. Leboeuf B, Restall B, and Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Animal reproduction science. 2000 ; 62 : 113-141.
31. Leboeuf, B.; Restall, B.; Salamon, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Animal reproduction science. 2000 ; 62 : 113-141.
32. Locksley, E. M. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. Ann Rechentre Cryobiol. 1978 ; 15: 382-390.
33. Mahieu, M., Archimède, H., Fleury, J., Mandonnet, N., Alexandre, G. Intensive Grazing system for small ruminants in the tropics : The French West Indies experience and perspectives. Small Rumin. Res. 2008; 77 (2008) 195-207.

34. Martínez R.; Hernández J.; Hernández H.; Michel A. y Valencia J. Inseminación artificial intrauterina en cabras criollas con semen refrigerado. México. *Agrociencia*. 2006; 40 (1):71-76.
35. Moreno Vargas, D. C. Nivel de desarrollo tecnológico de los sistemas de producción ovinos y caprinos en las regiones Centro, Norte y Valles Interandinos de Colombia. Tesis de Maestría Universidad Nacional de Colombia, 2013.
36. Moreno Vargas, D. C. y Grajales Lombana, H. A. Caracterización del proceso administrativo y de mercado en los sistemas ovinos del trópico alto colombiano. *Revista Ciencia Animal*. 2014; (7), 85-98.
37. Ritar A J, And Salomon S. Fertility of fresh and frozen the semen of the Angora goat. *Ausr. Biol. Sci*. 1980; 36: 49-59.
38. Robbins, R. K.; Saacke, R. G.; Chandler, P. T. Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in french straws. *Dairy Sci*. 1976; 42: 145-154.
39. Salamon, S.; Maxwell, W. M. C. Storage of ram semen. *Animal reproduction science*. 2000; 62: 77 – 111.
40. Simon, Y. Fisiopatología de la reproducción e inseminación artificial. 1981; 139-170. Perú.
41. Songsasen, N.; Buckrell, B. C.; Plante, C.; Leibo, S. P. In vitro and survival of cryopreserved sheep embryos cryobiology. 1985; 32: 78 – 91.
42. Tovío, N., Congelación de semen caprino en las razas criolla colombiana, alpina y saanen utilizando diferentes niveles de glicerol. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Colombia. Bogota, 2004.
43. Tovío, N., Grajales, H., Martínez, R. Congelación de semen caprino en las razas criolla colombiana, alpina y saanen utilizando diferentes niveles de glicerol. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2007; 20: 4, p 668.
44. Tribulo, H.; Alisio, L. Curso de congelación de semen. Instituto de reproducción animal de Cordoba Argentina; Universidad Católica de Cordoba Argentina. Agosto 19 y 20. 2.000.

45. Valencia J, González G, González M, Trejo A. Motilidad y daño acromasal del semen caprino congelado en pajillas de 0.25 y 0.5 ml. y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. *Vet Mex.* 25: 127 – 130, 1994.
46. Vargas, H. Inseminación artificial en porcinos. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá. 1997.
47. Varner, D. D.; Blanchard, T. Handling cooled semen requires specialized knowledge. *DVM. Newsmagazine*, marzo. 1997.
48. Vidament *et al.* Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. *Animal Reproduction Science.* 2001; 68: 201 – 218.
49. Vishwanath R, Pitt P, and Shannon P. Sperm numbers, semen age and fertility in fresh and frozen bovine semen. *Proc. 2. Soc. Anim Prod.* 1996;. 56: 31 – 34.
50. Watson P F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science.* 2000; 60 – 61: 481 – 492.
51. Yoshida, M. Conservation of sperms: Currents status and new trends. *Animal reproduction science.* 2000; 60 – 61: 349 – 355.
52. Zhao BT, Han D, Xu CL, Luo MJ, Chang ZL, Tan JH. Protocol optimization for long-term liquid storage of goat semen in a chemically defined extender. *Reprod Domest Anim.* 2009; 44:865–72.