

Uso de nanopartículas de selenio adicionadas al diluyente de congelación para optimizar parámetros espermáticos post descongelación de semen caprino

Javier Iván Cáceres Duarte

Trabajo de grado para optar el título de Zootecnista

Director
Daniel Felipe Torres Ruda
Msc. Zootecnista

Universidad Industrial de Santander
Instituto de Proyección Regional y Educación a Distancia (IPRED)
Programa de Zootecnia
Bucaramanga
2022

Dedicatoria

”Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.” Mahatma Gandhi

Primero que todo quiero darle gracias a **DIOS**, por permitirme cumplir uno más de mis proyectos de vida; a mis padres **JAVIER** y **YANETH**, por ser el verdadero motivo por el cual he podido llegar hasta donde estoy y ser la persona que hoy en día soy, por todas las enseñanzas y valores inculcados a lo largo de mi desarrollo personal y por siempre tener la esperanza puesta en mí, a mi abuela **ALICIA DUARTE** (Q.E.P.D) por haber estado en todos y cada uno de los momentos mas importantes de mi vida, por ser esa motivación de salir adelante sobrellevando cualquier dificultad y por haberme brindado el privilegio de llevar en la memoria tantos recuerdos en aquella talabartería que me inculco el gusto por los equinos; a **MIS HERMANOS Y MI SOBRINA** por motivarme a superar cada reto y cada meta propuesta además de ser esa compañía incondicional; a mi novia **SARA** y **TODA SU FAMILIA**, por ser esa ayuda necesaria para llevar a cabo todo proyecto y por brindar todo el apoyo necesario para seguir creciendo como persona y profesional; a mi director **DANIEL FELIPE** por ser mi director de tesis y por estar dispuesto a la colaboración y orientación durante el proceso de realización de esta tesis, al Docente e Ing. Fisico **ROGELIO OSPINA** por todo su tiempo, dedicación, colaboración y ayuda para poder llevar a cabo el proyecto de investigación; a mis compañeros de **EL ANDINISTA** por estar presente en todo mi proceso de formación, por ser voz de aliento en los malos momentos y estar dispuestos a tardes de compartir Malagueño; a mis demás **DOCENTES** y **COMPAÑEROS** por todo el aprendizaje durante el proceso de esta carrera universitaria, a **MIS AMIGOS** y en especial **JOSE MIGUEL**, por estar dispuesto a largas noches de charlas, trabajo y de aprendizaje científico durante todo este proceso.

Tabla de contenido

Introducción	9
1 Objetivos	12
1.1 Objetivo general	12
1.2 Objetivos específicos	12
2 Marco Teórico	13
2.1 Biotecnología reproductiva	13
2.2 Semen caprino	13
2.3 Metodos para determinar la calidad del semen caprino	16
2.3.1 Microscopía de luz campo claro.	16
2.3.2 Sistema CASA (Sistema de Análisis Computerizado Automático)	16
2.4 Criterios de calidad espermática	19
2.4.1 Características macroscópicas.	19
2.4.2 Características microscópicas.	19
2.5 Criopreservación de semen caprino	21
2.5.1 Características y composición de un diluyente	21
2.5.2 Congelación de semen caprino	23
2.5.3 Función Antioxidante	24
2.5.4 Glutación peroxidasa	25
2.5.5 Selenio	25
2.5.6 Nanopartículas, y su utilización en criopreservación de semen	28
2.5.7 Nanopartículas ya usadas en semen	30
2.6 Marco Conceptual	31
2.7 Marco legal	32
3 Materiales y Métodos	34
3.1 Localización	34
3.2 Insumos químicos	34
3.3 Animales experimentales y colectas de acostumbramiento	34
3.4 Preparación de las nanopartículas de Selenio	35
3.5 Aceptación de eyaculados, congelación y descongelación	35
3.6 Análisis espermático	36
3.7 Análisis estadístico	37
4 Resultados y Discusión	38

NANOPARTÍCULAS EN DILUYENTE DE CONGELACIÓN SEMEN	4
4.1 Experimento I	38
4.2 Experimento II	39
4.3 Discusión	40
5 Conclusiones	43
5.1 Recomendaciones	44
Referencias Bibliográficas	45
Apéndices	55

Lista de figuras

5.1	Colecta seminal	61
5.2	Selenio	62
5.3	Preparación SeNps	62
5.4	Preparacion de laboratorio	63
5.5	Congelación de pajillas	63
5.6	Descongelación de Pajillas	64
5.7	Analisis en CASA	65
5.8	Preparacion de laboratorio	65
5.9	Resultados Variable Motilidad Total	66
5.10	Resultados Variable Motilidad Progresiva	67
5.11	Resultados Variable Motilidad Circular	67
5.12	Resultados Variable Motilidad Rapida	68
5.13	Resultados Variable Motilidad Lenta	68
5.14	Resultados Variable Motilidad Local	69
5.15	Resultados Variable Espermatozoides inmoviles	69

Lista de tablas

2.1	Características seminales de caprino.	15
2.2	Variables Cinemáticas de análisis de esperma asistido por computadora (CA-SA) y de análisis flagelar de esperma (FAST).	18
2.3	Niveles de inclusión de Selenio (Se) otorgados por la RDA.	26
2.4	Funciones de las selenoproteínas.	27
2.5	Efecto del Nano-Se sobre la concentración de la glutación peroxidasa a nivel testicular y seminal, así como de la concentración de la ATPasa y sobre los parámetros de calidad seminal.	28
4.1	Análisis espermático del semen caprino pre-congelado	38
4.2	Análisis espermático del semen caprino post-descongelación	39
4.3	Análisis espermático del semen caprino pre-congelación	39
4.4	Análisis espermático del semen caprino post-descongelación	40

Resumen

TÍTULO: Uso de nanopartículas de selenio adicionadas al diluyente de congelación para optimizar parámetros espermáticos post descongelación de semen caprino. *.

AUTOR: Javier Iván Cáceres Duarte †

PALABRAS CLAVE: Selenio, nanopartículas, diluyente, motilidad, viabilidad, semen.

DESCRIPCIÓN:

El uso de la biotecnología reproductiva viene siendo un auge para el sector pecuario debido a la disponibilidad y facilidad de adquirir alta genética para todo sistema productivo; gracias a esto, es posible almacenar gran variedad de genética de sementales durante muchos años, además el uso de las nanotecnologías está mostrando buenos resultados en el campo de la biotecnología reproductiva. Es por eso, que el presente estudio evaluó la respuesta en el uso de nanopartículas de selenio adicionadas al diluyente de semen caprino durante el proceso de congelación y descongelación. La fase experimental se realizó en dos oportunidades, contando en la primera con 2 eyaculados y 40 pajillas como unidades experimentales y en la segunda con 3 eyaculados y 60 pajillas como unidades experimentales, las cuales fueron viables para el proceso de congelación. Estas muestras diluidas se dividieron en 2 tratamientos $T1$: 1% de SeNPs y $T2$: 2% de SeNPs (Nanopartículas de Selenio). Se evaluaron diferentes variables por medio del sistema computalizado CASA, como Concentración espermática, Motilidad total, Motilidad progresiva, Motilidad circular, Motilidad rápida, Motilidad lenta y Porcentaje de espermatozoides inmóviles en el semen refrigerado y pos descongelado. En cuanto al semen pre congelado se presentaron diferencias estadísticamente significativas; en el experimento I, para el tratamiento $T1$ con 1% SeNPs se encontró mejores resultados en la concentración espermática, motilidad total, motilidad progresiva, motilidad rápida, motilidad local y espermios inmóviles con respecto al $T2$, mientras que en el semen descongelado tanto para el experimento I Y II, no se vieron diferencias estadísticamente significativas para las variables analizadas.

*Trabajo de grado para optar por el título de Zootecnista.

†Instituto de Proyección Regional y Educación a Distancia (IPRED). Programa de Zootecnia. Director: Daniel Felipe Torres Ruda.

Abstract

TITLE: Use of selenium nanoparticles in freezing diluent to optimize sperm parameters post defrosting in goat semen. *.

AUTHOR: Javier Iván Cáceres Duarte †

KEYWORDS: Selenium, nanoparticles, diluent, motility, viability, semen.

DESCRIPTION:

The use of reproductive biotechnology is been rising in the livestock scene due to the availability and easiness of the acquisition of high genetic for all the production system. Thanks to that, it's possible to accumulate a great variety of stallion's genetics throughout many years. Also the use of nanotechnology is showing good results in the field of reproductive biotechnology. Because of that, this study evaluated the response to the use of Selenium nanoparticles added to the goat semen diluent during the freezing and unfreezing process. The experimental phase was carried out in two opportunities, counting in the first one with 2 ejaculated and 40 straws as experimental units and the second one with 3 ejaculated and 60 straws as experimental units, which were viable for the freezing process. These diluted samples were divided in 2 treatments T1: 1 % of SeNPs and T2: 2 % of SeNPs (Selenium Nanoparticles). Different variables were evaluated through the computerized system CASA, as sperm concentration, total motility, progressive motility, circular motility, fast motility, slow motility and percentage of immobile spermatozoa in the refrigerated semem and post defrost. Regarding the pre frozen semem, there were statistically significant differences; in the experiment I, the treatment T1 with 1 % SeNPs we found better results with the sperm concentration, total motility, progressive motility, fast motility, local motility and immobile spermatozoa compared to T2, while in the thawed semem for both experiment I and II, no statistically significant differences were seen for the analyzed variables.

*Bachelor Thesis

†Instituto de Proyección Regional y Educación a Distancia (IPRED). Programa de Zootecnia. Director: Daniel Felipe Torres Ruda.

Introducción

El uso de la Biotecnología reproductiva ha sido de gran utilidad en los sistemas de producción pecuaria, esto gracias al incremento porcentual del éxito en la etapa de reproducción, debido a que la congelación y almacenamiento de semen de diferentes especies en bancos genéticos, permite tener a disposición gran variedad de genéticas de machos *élites* y preservarlas durante muchos años; generando como ventaja adicional la posibilidad de mantener los genes de los sementales, sin el gasto adicional de manutención a los mismos. Como es normal en los procesos de criopreservación, la viabilidad de los espermatozoides caprinos se ve reducida alrededor de un 50 % a 60 % (Watson, 2000), lo que repercute directamente en las tasas de preñez, las cuales tienen un amplio margen de oscilación al reportar promedios del 7 % al 79 % (Bispo y cols., 2011). Una de las causas de esto, es la sensibilidad del espermatozoide de caprinos a cambios bioquímicos durante la congelación y descongelación, ya que su alto contenido de ácidos grasos insaturados lo hace susceptible al estrés oxidativo y peroxidación lipídica; es por esto que los diluyentes que son adicionados al semen colectado deben contener crioprotectores, los cuales ayudarán a amortiguar los efectos que trae el proceso. Trujillo García (2017)

La eficiencia reproductiva de los pequeños rumiantes está estrechamente ligada a factores tales como: la nutrición, la genética, el manejo y los factores medioambientales (intrínsecos y extrínsecos) (Xiong, Lan, Li, Lin, y Li, 2018). Es por ello que en el campo de la biotecnología reproductiva se emplea el método de la criopreservación de semen, el cual está enfocado a la realización de un análisis minucioso introspectivo que permita evaluar la calidad seminal, llegando a determinar los parámetros cuantificables medidos dentro del sistema computalizado CASA, como son: la con-

centración espermática, motilidad masal e individual progresiva, vigor y viabilidad espermática. Lo anterior con el propósito de mejorar el índice de fertilidad de los machos caprinos (Agossou y Koluman, 2018). La criopreservación constituye un proceso crítico, en el sentido que durante esta fase la calidad espermática y la fertilidad se ven afectadas de manera negativa por la disminución de la temperatura, la génesis de cristales de hielo, tensiones fisicoquímicas, osmóticas y oxidativas que forman radicales libres, ocasionando la deshidratación de los espermatozoides y disminuyendo su viabilidad y trayectoria (Ugur y cols., 2019).

En estudios recientes, el uso de diluyentes que contienen porcentaje de nanopartículas con lecitinas ha mostrado claras ventajas en comparación a la yema de huevo como alternativa para garantizar protección al choque osmótico y térmico del espermatozoide (Nadri y cols., 2019), también han utilizado nano-micelas conteniendo fosfatidilcolina, que son partículas lipídicas que también están en la yema de huevo y en la lecitina de soya, con la ventaja de estas nanopartículas debido a su tamaño, permitiría una mejor interacción o recubrimiento de espermatozoides, reduciendo así los factores de daño y riesgo durante el proceso de congelación-descongelación. Bajo este contexto, el presente trabajo investigativo busca generar una alternativa biotecnológica, en la utilización de nanopartículas de selenio, que constituya una herramienta eficaz en el proceso de criopreservación del semen, puesto que el Selenio (Se) es un oligoelemento que actúa reduciendo el estrés oxidativo y mejorando la calidad espermática, por medio del mantenimiento de la integridad del espermatozoide y evitando el daño en el ADN del mismo (Touat-Hamici, Legrain, Bulteau, y Chavatte, 2014). El Selenio como micronutriente trabaja de manera fusionada con las selenoproteínas, dentro de las más importantes en el proceso reproductivo se distinguen la Glutación Peroxidasa (GSH Px) la cual actúa en como antioxidante (Foresta y cols., 2002), la GPX4 en el ADN de los espermatozoides durante la metamorfosis de estrés oxidativo inducido y mantiene la integridad del cuello y el flagelo espermático para que no interfiera con la estabilidad y trayectoria (Hammad y cols., 2018). El SelenOP contribuye con el transporte del Se, mientras que la GPX1 Y GPX3 se relacionan con el aumento del índice de fertilidad en machos caprinos (Noblanc y cols., 2011).

El selenio también actúa como biomarcador en el plasma seminal, puesto que bio potencializa la motilidad, viabilidad y capacidad de fertilización en especies mamíferas (Anel-López y cols., 2017). En caso de que sea suplementado en la dieta, el selenio se debe dar de forma orgánica para generar una mayor biodisponibilidad y evitar problemas de toxicidad que alteren el status sanitario de la especie caprina, en cuanto a los procesos de nanotecnología las partículas de selenio micro encapsuladas a los espermatozoides, la teoría demuestra que cuando se emplean cantidades insuficientes de Se observa una mala calidad del espermatozoide y una reducción en la síntesis de esperma, dando como consecuencia una fertilidad baja (Sánchez-Torres, 2013).

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Evaluar la respuesta en el uso de nanopartículas de Selenio en el diluyente de semen comercial sobre los parámetros de cinemática espermática posdescongelación de semen caprino.

1.2. Objetivos específicos

Determinar la viabilidad de los eyaculados caprinos durante el proceso de congelación.

Evaluar el efecto de la concentración de las nanopartículas sobre la calidad espermática posdescongelación de acuerdo a la respuesta del diluyente comercial.

2. Marco Teórico

2.1. Biotecnología reproductiva

En el desarrollo de biotécnicas de conservación y de preservación de las especies animales como vegetales, la biotecnología contribuye a la utilización sostenible de la diversidad biológica y a su preservación. A ello se suma un interés económico, principalmente a nivel de los animales domésticos, pues se busca aumentar la productividad de los mismos ante la demanda creciente de productos de origen animal es por esto, que la biotecnología de la reproducción es un conjunto de técnicas que van desde la inseminación artificial hasta la clonación, todas ellas encaminadas a aumentar la eficiencia reproductiva de los animales (Ugalde, 2014).

2.2. Semen caprino

El semen caprino posee una consistencia que varía de la clara acuosa hasta la cremosa espesa, esto se da de acuerdo con la superpoblación espermática y el plasma seminal (Tabarez Rojas y cols., 2014), por lo tanto, entre mayor consistencia viscosa tenga el semen, será de mejor calidad y tendrá un número más elevado de espermatozoides, con respecto a las texturas clara u acuosas (Díaz Díaz, 2020). Por su parte el semen recién eyaculado tiene un valor respectivo de 7,4 y cuando por algún suceso el pH seminal disminuye, también se reduce el metabolismo energético celular y la motilidad (Niño González, 2013). Además, se han reportado valores variables de pH que os-

cilan de 6,2 a 7,3, con una motilidad masal de 3 a 5 e individual del 70 al 90 % (Llivi Marcatoma, 2015).

Plasma Seminal

El plasma seminal de los mamíferos es una secreción fisiológica de múltiples glándulas del tracto reproductor masculino que juega un papel importante en la maduración final de los espermatozoides, a través de cambios hormonales, enzimáticos y modificación de la superficie de membrana espermática, además, sirve como vehículo para los espermatozoides. Parte de la amplia variación de la calidad espermática del semen refrigerado que se observa entre machos de una misma especie puede atribuirse a diferencias en la composición de su plasma seminal (Muiño-Blanco, Pérez-Pé, y Cebrián-Pérez, 2008).

El plasma seminal es un líquido isotónico y neutro, compuesto principalmente por agua (75 %), sustancias orgánicas (fructosa, sorbitol, inositol, ácido cítrico, glicerilfosforilcolina, fosfolípidos, prostaglandinas y proteínas) e inorgánicas (sodio, potasio y cloro) que sirven de protectores y nutrientes de los espermatozoides (Evans, Maxwell, y Salamon, 1990).

Espermatozoide caprino

El espermatozoide es la célula germinal masculina altamente especializada, que ha evolucionado para cumplir una función biológica compleja, fecundar al ovocito, se trata de una célula haploide, producto final del proceso de la gametogénesis en el macho, portadora de la información genética paterna (Evans y cols., 1990; Gázquez Ortiz y Blanco Rodríguez, 2004; Hidalgo, 2005). En el espermatozoide se distinguen tres partes características: la cabeza (con su núcleo y capuchón acrosómico) que contiene los cromosomas responsables de portar la información genética, la pieza de conexión o cuello y la cola (pieza intermedia, pieza principal y porción terminal) que

es el órgano locomotor del espermatozoide (Evans y cols., 1990). La estructura general es muy similar en la mayoría de las especies animales; sin embargo, su morfología externa es específica para cada especie, particularmente, el espermatozoide de macho cabrío tiene una longitud de 60 μm y la cabeza mide de 8 a 10 μm de larga, 4 μm de ancho y 1 μm de grosor (Evans y cols., 1990). La cabeza del espermatozoide difiere en su forma según la especie, en el macho cabrío, morueco, toro, cerdo y caballo es plana y ovoide; en el humano es aplastada y elipsoide; en la rata es falciforme y en el gallo es delgada y alargada (Bonet, 2000; Gázquez Ortiz y Blanco Rodríguez, 2004; Hafez y Hafez, 2007; Hidalgo, 2005; Wrobel y Bergmann, 1998). Los parámetros del semen estudiados normalmente son: el volumen del eyaculado, número total de espermatozoides por eyaculado, concentración espermática/ml, porcentaje de espermatozoides normales, porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto, el tiempo de sobrevivencia (Karagiannidis, Varsakeli, Alexopoulos, y Amarantidis, 2000; S. Zhang, Hu, Li, Jiang, y Zhang, 2009), el color, el olor, la consistencia y el pH. Foote (2003) menciona que una buena calidad del semen, es un requisito que el macho debe cumplir para que, al depositar el semen en el tracto reproductivo femenino, este logre fecundar el ovocito (ver tabla (2.1)).

Tabla 2.1 Características seminales de caprino.

Características	Valores
Volumen	0.5 - 1.5 mL
Color	Blanco o amarillo marfil
Olor	Sui generis
Movimiento masal	>4
Vigor	>3
Concentración espermática	2 - 5 $\times 10^9$ /mL
Total de espermatozoides eyaculado	3 - 5 $\times 10^9$ /mL
Espermatozoides normales	>80 %

Nota: Adaptado de: Evans e Maxwell (1987).

2.3. Metodos para determinar la calidad del semen caprino

2.3.1. Microscopía de luz campo claro.

Es la técnica más común empleada en el laboratorio que permite evaluar la morfología de los espermatozoides, mediante técnicas de tinción del semen y criterios de normalidad enfocados en parámetros morfométricos de la cabeza del esperma, pieza intermedia y de la flagelación del espermatozoide (Collodel y cols., 2013). En el laboratorio los microscopios ópticos poseen dos lados polarizados que se disponen de forma perpendicular y dejan pasar la luz en un solo plano, al refractarse se observan dos rayos polarizados ocasionando el proceso de birrefringencia analizando las partes del espermatozoide núcleo, acrosoma y flagelo en respuesta a una reacción acrosómica (Sánchez Pozo, Sánchez Prieto, y Bueno Rodríguez, 2017). En el sistema CASA emplea en la mayoría de las especies productivas una microscopia de iluminación en fase negativo, porque los espermatozoides poseen una estructura lateral plana; a diferencia que, si se empleará una iluminación en fase positiva, dado que la morfología del espermatozoide no sería plenamente visible (Molina-Coto y Lucy, 2018).

2.3.2. Sistema CASA (Sistema de Análisis Computerizado Automático)

Utiliza una cámara adaptada al microscopio para capturar una secuencia de video en un ordenador dotado de un sistema de análisis de imagen. El software permite calcular el porcentaje de espermatozoides móviles y emite un informe donde se describen las particularidades de su movimiento (Abecia Martínez y Forcada Miranda, 2010; Bonet, Martínez, Rodríguez, y Barrera, 2006). La motilidad determinada por el sistema CASA es más rápida y más objetiva que una evaluación visual y puede proporcionar mucho más datos con tal grado de exactitud que pueden revelar diferencias sutiles no perceptibles al ojo humano (Bonet y cols., 2006; Rodríguez-Martínez, Saravia, Wallgren, Roca, y Peña, 2008; Versteegen, Iguer-Ouada, y Onclin, 2002).

El CASA^o es un sistema de análisis computarizado, cuya función es determinar la concentración de espermatozoides centrados y analizar la motilidad espermática simultánea, siendo un método de precisión en el laboratorio, pues permite medir variables como: la viabilidad, morfología y características de movilidad de los espermatozoides (ver tabla (2.2)) (Sieme, 2009). Este sistema estandarizado está constituido por un microscopio óptico en diversas fases, platina de calefacción, cámara de video, un ordenador y software, previo al uso se le debe realizar una calibración y configuración técnica (Monserrat, 2017) para la medición adecuada de los parámetros tales como: la Velocidad curvilínea (VCL) ($\mu m/s$), Velocidad rectilínea (VSL) ($\mu m/s$), Velocidad Media (VAP) ($\mu m/s$), Índice de linealidad (LIN) (%), Índice de rectitud (STR) (%), Índice de Oscilación (WOB) (%), Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) (μm) y Frecuencia de Batido de la cola (BFC) (Hz) (Carvajal et al., 2018). CASA también emplea tres tipos de microscopía, la primera consiste en un campo brillante convencional de iluminación que necesita de tinción, la segunda se basa en el contraste de fase, empleando montajes húmedos y la tercera es la fluorescencia que utiliza una sonda fluorescente, es así que en el mercado existen variados sistemas CASA tales como: Andro Vision^o, ISAS v1, Plataforma SCA^o, Analizadores IVOS II^o y CEROS II^o (Boe-Hansen y Satake, 2019).

Tabla 2.2 Variables Cinemáticas de análisis de esperma asistido por computadora (CASA) y de análisis flagelar de esperma (FAST).

Parámetros cinemáticos de CASA (50-169 fps)	Parámetros flagelares RÁPIDOS (169 fps)
VCL= velocidad curvilínea ($\mu m/s$)	fBC = frecuencia de latido flagelar
VSL = velocidad en línea recta ($\mu m/s$)	fAWS = Velocidad de onda de arco flagelar
VAP = Velocidad de trayectoria promedio ($\mu m/s$)	fAWL = Longitud de onda del arco flagelar ($\mu m/s$)
LIN = linealidad VSL / VCL x 100 (%)	Longitud flagelar del esperma ($\mu m/s$)
ALH = Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza	Longitud de la cola de disipación de potencia flagelar = fwatts
STR = Rectitud = VSL / VAP x100 (%)	Disipación de potencia flagelar primeros 30 μm = fwatts30
WOB = Oscilación = VAP / VCL x 100 (%)	Potencialmente también amplitud del desplazamiento flagelar
BCF = Frecuencia cruzada de batido (Hz)	TCS = Seguimiento de la velocidad del centroide (progresividad)

Nota: Adaptado de (Gallagher, Cupples, Ooi, Kirkman-Brown, y Smith, 2019).

En el trabajo de investigación titulado “Efectos de la criopreservación sobre las subpoblaciones espermáticas en caprinos” en donde se empleó el Sistema de Análisis de Semen Asistido por Computador (CASA) tomando como base siete machos adultos de razas (4 alpinos y 3 Saanen) para un total de recolectas de 56 eyaculados, para semen fresco y descongelado, se encuentra que, para el semen fresco las variables como: VCL ($\mu m/s$), VSL ($\mu m/s$), LIN (%), STR (%) Y ALH ($\mu m/s$) se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas obteniéndose valores mayores en la raza Alpina; mientras que para la estirpe Saanen se obtuvieron valores superiores en los parámetros de WOB (%) y BCF (Hz), en tanto la VAP ($\mu m/s$) en las dos razas se comportó estadísticamente igual. En contexto, para el semen descongelado las variables como: VSL ($\mu m/s$), VAP ($\mu m/s$), LIN (%), WOB (%) y ALH ($\mu m/s$) fueron superiores en la raza Saanen con respecto a la Alpina, así mismo la superpoblación de espermatozoide para los parámetros de velocidad progresiva fueron superiores en el semen fresco que el descongelado, estos hallazgos podrían ser inferidos a la genética y al estado fisiológico de las razas (Hernández Corredor, Camargo Rodríguez, Silva Torres, Montoya Páez, y Quintero Moreno, 2018).

2.4. Criterios de calidad espermática

2.4.1. Características macroscópicas.

Volumen y color del eyaculado

En promedio, el eyaculado en ganado caprino es de 1 mL (0.3 - 1.5), donde se pueden encontrar variaciones según el método de recogida, especie, estado fisiológico del macho, raza, edad, tamaño corporal, alimentación y régimen sexual al que se le somete, en general, eyaculados con volumen menor a 0.4 mL son descartados (Aisen, 2004; Cortés Gallego, 1998; Derivaux, 1982; Memon, Bretzlaff, y Ott, 1986). La medida y valoración del volumen del eyaculado se realiza en el tubo colector, inmediatamente después de su recogida, evitando errores al pasar el eyaculado de un recipiente a otro para su valoración (Evans y cols., 1990). Llevar a cabo una óptima medición del volumen del eyaculado, es de vital importancia para determinar el número total de espermatozoides presentes en el mismo.

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 (Trujillo García, 2017).

2.4.2. Características microscópicas.

Concentración espermática

La concentración espermática se define como el número de espermatozoides por unidad de volumen, expresado normalmente en millones por ml de eyaculado, se pueden encontrar valores normales para carnero y chivo que oscilan entre $3000 - 7000 \times 10^6$ espermatozoides/mL (Aisen, 2004).

Investigaciones similares reportan que, en promedio, la concentración espermática estimada en el ganado caprino es de 2.500 - 3.000 x10⁶ espermatozoides/ml, pudiendo variar según épocas del año, características raciales e individuales. se pueden encontrar menores diferencias entre los eyaculados, cuando los machos están sometidos a un ritmo periódico de colectas. (Cortés Gallego, 1998)

Motilidad masal e individual

En el análisis de la motilidad masal, se valora la formación y progresión de ondas producidas por el desplazamiento de los espermatozoides, las ondas de movimiento sólo pueden ser observadas en especies de alta concentración espermática, como es el caso de pequeños rumiantes (Evans y cols., 1990). La movilidad individual, es una prueba realizada frecuentemente para determinar la calidad seminal, en algunas especies, nos determina la capacidad del espermatozoide para fecundar el ovocito (Evans y cols., 1990; Pomerol y Arrondo, 1994).

El movimiento desarrollado por los espermatozoides es característico de la especie y del estado fisiológico en que se encuentre (movimiento tras la eyaculación, dilución, refrigeración, congelación, hiperactivación) (Santiago Moreno, Cortes, Gonzalez de Bulnes, y Vinader, 1996), estando sujeto también al efecto ejercido por el método de recogida, factores ambientales, manejo del semen tras su obtención (Evans y cols., 1990).

Morfología espermática

El estudio de la morfología espermática es otra prueba importante de la contrastación rutinaria del semen. Se ha demostrado que es un indicador importante del descenso de la fertilidad en humanos y en un gran número de especies animales (Morales, 2012). Las anomalías de la cabeza del espermatozoide han sido asociadas con la reducción de la capacidad para fecundar al óvulo y la pérdida embrionaria temprana, disminución de la fertilidad y calidad del embrión. Además de

aportar una referencia sobre la fertilidad del eyaculado, la morfología espermática permite la posibilidad de detectar alteraciones en la espermatogénesis y en la maduración epididimaria (Bonet, 2000).

2.5. Criopreservación de semen caprino

En los animales de índole productivo, la criopreservación de semen es una técnica muy utilizada en la inseminación artificial (IA) y en la técnica de fertilización in vitro (FIV) (Zanganeh y cols., 2013a). La importancia de conservar el semen, es prolongar la capacidad fecundante de los espermatozoides, al reducir o detener su movilidad y reacciones metabólicas (Evans y cols., 1990). Cuando el semen se congela y conserva en nitrógeno líquido a muy baja temperatura (-196°C), las reacciones metabólicas de los espermatozoides quedan detenidas; esto hace que se puedan conservar genes para futuros usos y se asegure la disponibilidad de un semental en particular, además, el semen se puede conservar en épocas distintas a la reproductiva (Evans y cols., 1990; Görlach, 1999). La congelación de espermatozoides de macho cabrío sigue representando un desafío, ya que esta especie tiene la peculiaridad de contener lipasas en el semen, procedentes de las secreciones de las glándulas bulbouretrales que interactúan con la yema de huevo, produciendo sustancias tóxicas para el espermatozoide (Iritani, Nishikawa, y Nagasawa, 1964). Por esta razón, los diluyentes comerciales hoy en día llevan proteína vegetal (la lecitina de soya) como protector en la criopreservación (Gil, Rodríguez-Iraozqui, Lundeheim, Söderquist, y Rodríguez-Martínez, 2003b), en este proceso, se hace uso de diluyentes, los cuales se caracterizan por ser una solución acuosa, la cual posee crioprotectores encargados de amortiguar los cambios bioquímicos y los efectos que conlleva el proceso de congelación, además, el uso de estos diluyentes permite incrementar el volumen del eyaculado, permitiendo la producción de más dosis por colecta.

2.5.1. Características y composición de un diluyente

Las principales características que deben poseer los diluyentes usados en la crio preservación de semen, son:

- Capacidad amortiguadora (evitar cambios de pH al neutralizar los ácidos producidos por metabolismo de los espermatozoides).
- Deben ser isotónicos al semen (tener la misma concentración de iones libres).
- Proporcionar nutrientes para el metabolismo de los espermatozoides.
- Proteger a los espermatozoides de las lesiones producidas por el choque térmico.
- Los espermatozoides deben de estar protegidos contra daño durante la congelación y descongelación.
- Controlar contaminantes microbianos.

Los diluyentes sintéticos más utilizados, tienen como amortiguador el tris o el citrato, glucosa o fructosa como fuente de energía y yema de huevo; Cuando se realiza la dilución, el diluyente y el semen deben encontrarse a la misma temperatura (30°C). Se debe agregar el diluyente al semen, no de forma contraria; la mezcla debe hacerse con suavidad (Ax y cols., 2002)

- **Citratos, fosfatos, Fructosa, Glucosa:** Son nutrientes para el espermatozoide y favorecen la anabiosis (acto de revivir después de una muerte aparente).
- **Tris (Hidroximetil-aminometano):** Es una sustancia química con gran capacidad tamponeante para proteger a los espermatozoides de las variaciones de pH y facilitar la conservación de la vitalidad.
- **Glicerol (Glicerina):** Tiene acción crioprotectora. Este protege a los espermatozoides durante el proceso de refrigeración, congelación y descongelación.
- **Penicilina y Dihidroestreptomicina:** para congelación de semen se adiciona 1000 UI/ml de Penicilina G sódica, o cristalina (no la potásica que es tóxica), y 1 mg/ml de Dihidroestreptomicina. En esta proporción estos antibióticos tienen efecto bacteriostático, es decir, inhiben el crecimiento bacteriano. Además, aseguran una mayor y mejor supervivencia de los espermatozoides y aumentan la fertilidad (Daza, 1994).

2.5.2. Congelación de semen caprino

En los animales de índole productivo, la congelación de semen es una técnica muy utilizada en la inseminación artificial (IA) y en la técnica de fertilización in vitro (FIV) (Zanganeh y cols., 2013b). La importancia de conservar el semen, es prolongar la capacidad fecundante de los espermatozoides, al reducir o detener su movilidad y reacciones metabólicas (Evans y cols., 1990). Cuando el semen se congela y conserva en nitrógeno líquido a muy baja temperatura (-196°C), las reacciones metabólicas de los espermatozoides quedan detenidas; esto hace que se puedan conservar genes para futuros usos y se asegure la disponibilidad de un semental en particular. También de esta forma el semen se puede conservar en épocas distintas a la reproductiva (Evans y cols., 1990; Görlach, 1999). La congelación de espermatozoides de macho cabrio sigue representando un desafío, ya que esta especie tiene la peculiaridad de contener lipasas en el semen procedentes de las secreciones de las glándulas bulbouretrales que interactúan con la yema de huevo, produciendo sustancias tóxicas para el espermatozoide (Iritani y cols., 1964). Por esta razón, los diluyentes comerciales hoy en día llevan proteína vegetal (la lecitina de soya) como protector en la criopreservación (Gil, Rodríguez-Iraozqui, Lundeheim, Söderquist, y Rodríguez-Martínez, 2003a).

El proceso de congelación se realiza en dos etapas, la de enfriamiento y la de congelación propiamente dicha. La etapa de enfriamiento es un periodo de adaptación para los espermatozoides a un metabolismo reducido, el semen ya diluido se enfría hasta los 5°C , a una velocidad de unos -0.2 a $0.4^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ (Cebrián, Muño-Blanco, Pérez-Pé, Casao, y Palacios, 2010). Al momento de la congelación, hay que tener en cuenta que, si la velocidad es demasiado rápida, se forman cristales de hielo intracelulares que provocan serias lesiones y rotura de la membrana plasmática. Pero si por el contrario, esa velocidad es demasiado lenta, la formación de cristales de hielo comienza en el exterior celular, produciendo la salida de agua del interior de la célula, en un intento por compensar el aumento de la osmolaridad en el medio extracelular y la célula se deshidrata. Cebrián y cols. (2010) también dice, que existe una velocidad óptima de congelación, que será variable para cada especie y para cada tipo de envase empleado. Dicha velocidad oscila entre -10 y $-80^{\circ}\text{C}/\text{min}$,

lo mismo ocurre para el proceso de descongelación

Las muestras congeladas, se descongelan en un proceso de inmersión en baño maría a una temperatura de 37°C por un periodo de tiempo mínimo de 30 segundos, posteriormente, se secan y se cortan los extremos de la pajilla para llevar a cabo su análisis.

2.5.3. Función Antioxidante

La alteración de los espermatozoides causada por una producción excesiva de radicales libres se ha estudiado extensamente como uno de los mecanismos de esterilidad. Los radicales libres pueden modificar las funciones celulares, poner en peligro la supervivencia celular o ambas cosas. Por lo tanto, se debe reducir continuamente el exceso de radicales libres para mantener la función celular normal, debido que, el estrés oxidativo surge como consecuencia de la producción excesiva de radicales libres y del deterioro de los mecanismos de defensa antioxidante (Uysal, 2007)

Las concentraciones moderadamente altas de peróxido de hidrógeno no afectan la viabilidad de los espermatozoides, pero si los inmovilizan, generalmente por agotamiento del ATP intracelular y disminución ulterior en la fosforilación de las proteínas del axonema, las altas concentraciones de peróxido de hidrógeno inducen la peroxidación lipídica y producen la muerte celular (Muiño-Blanco y cols., 2008)

Los radicales libres son especies químicas que tienen un electrón no apareado y se comportan como moléculas altamente reactivas (Hicks, 2001) Para el control o disminución de la peroxidación lipídica del espermatozoide, se utilizan los antioxidantes con función biológica que se definen como aquellas sustancia que presentes en concentraciones muy pequeñas comparadas con las de un sustrato oxidable, disminuye o evita la oxidación del sustrato toda vez que resulta un agente reductor más potente. En bioquímica inorgánica puede considerarse como un donador de electrones capaz de evitar una reacción en cadena de oxidorreducción. Existen los antioxidantes preventivos que actúan al inicio de una cadena de oxidación para reducir o impedir el comienzo de una cadena

de oxirreducción. Como ejemplos se pueden considerar los reductores de peróxidos orgánicos e inorgánicos (enzimas glutatión peroxidasa, catalasa y peroxidasa), mientras que los antioxidantes secundarios son interruptores que actúan al bloquear en alguna etapa la cadena de oxidación ya iniciada al captar radicales libres y al acortar la longitud de la cadena de oxidación y sus consecuencias (vitaminas E y C y la enzima superóxidodismutasa) (Hicks, 2001).

2.5.4. Glutatión peroxidasa

En el organismo existe una constante producción de radicales libres, moléculas inestables altamente reactivas que pueden causar graves daños a las células; por ello, existen en nuestro cuerpo unos mecanismos de defensa que permiten neutralizar los radicales libres, pero si este equilibrio se rompe, se produce lo que se conoce como estrés oxidativo, que da lugar a diversos cambios fisiológicos y bioquímicos en las células que conducen a su deterioro y muerte, es por esto que dentro de los mecanismos de defensa, formados por enzimas y compuestos de bajo peso molecular, destacamos la glutatión peroxidasa, la cual es una enzima selenio dependiente que se localiza en todos los órganos y tejidos del organismo. Su función principal es antioxidante, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o lipoperóxido (L-OOH), usando como agente reductor al glutatión reducido (GSH) en los compartimentos intracelular y extracelular. La actividad enzimática de la glutatión peroxidasa es directamente proporcional a la ingesta de selenio, por lo que hay una estrecha relación entre la deficiencia de selenio y el estrés oxidativo (San-Miguel y Martin-Gil, 2009).

2.5.5. Selenio

El Selenio forma parte de la glutatión peroxidasa, la cual es una enzima que cataliza la eliminación del peróxido de hidrógeno, por lo cual permite proteger a las membranas de la oxidación, además, el selenio es un oligoelemento esencial para humanos, animales y ciertas plantas, ya que ejerce a través de las selenoproteínas sus funciones biológicas: defensa contra el estrés oxidativo, mantenimiento del estado redox celular, la señalización redox e interviene en el metabolismo de

la hormona tiroidea, además, las selenoproteínas participan en la defensa antioxidante (glutatión peroxidasa), formación de hormonas tiroideas, síntesis de ADN, fertilidad y reproducción. Estas selenoproteínas contienen selenio en forma del veintiunavo aminoácido, selenocisteína (Sec). La selenocisteína es un análogo de la cisteína (Cys), cuya cadena lateral presenta selenio en lugar de azufre.(Vázquez, 2011)

El (Se) Selenio es un mineral traza que, en sinergia con la Vitamina E, actúan como antioxidantes, en las especies de caprinos el Selenio debe ser ingerido de forma orgánica, con la finalidad de mejorar el estado anti-oxidativo, la hormona triyodotironina (T3) en el plasma seminal y suero sanguíneo, lo cual ayuda al proceso de la espermatogénesis, a la protección de los espermatozoides, a producir semen de mejor calidad y a sintetizar más testosterona (Carrillo et al., 2018). En este sentido, cabe destacar que el selenio juega diversos papeles, por ejemplo, la Selenocisteína (SeCys) actúa como componente esencial de las selenoproteínas, algunas como la P y W retardan el envejecimiento celular, estas proteínas participan en la cápsula mitocondrial del esperma (Seleno) y por ende contribuyen a obtener un mayor índice de fertilidad masculina, es así que en niveles de inclusión superiores a los óptimos, llega a ser un oligoelemento tóxico; mientras que su deficiencia reduce la motilidad y viabilidad espermática en caprinos (Vázquez, 2011)

Tabla 2.3 Niveles de inclusión de Selenio (Se) otorgados por la RDA.

Especies	RDA
Ovejas y cabras	100-200 $\mu g/kg$ de materia seca de pienso / día
Cerdo	150-300 μg / kg de materia seca de pienso / día.
Caballo	100 μg / kg de materia seca de pienso / día.
Burro	150 μg / 100 kg de peso corporal.
Vaca lechera	100 μg / kg de materia seca de pienso / día.
Vaca de ternera	300 μg / kg de materia seca de pienso / día.
Ternero bovino	100 μg / kg de materia seca de pienso / día.
Camello	400-800 μg / día.

Nota: Adaptado de: (Qazi y cols., 2018)

En cuanto al proceso de absorción, el Se orgánico al ser ingerido se absorbe a través del intestino delgado, siendo transportado al hígado y metabolizado en forma de Selenocisteína y Seleno-

metionina, la que posteriormente se une a la selenoproteína P, siendo secretada al plasma y a otros tejidos periféricos como: el cerebro y los testículos (Ha, 2019). Dentro de las selenoproteínas de mayor importancia se encuentran la Selenoproteína P está (SeP) es la mayor proteína contenida en el plasma, a diferencia de todas las selenoproteínas que contienen 1 átomo de Se, la SeP contiene 10 átomos de Se, está contiene el 50 % de Se en el plasma, está ayuda a la activación enzimática, al proceso REDOX y a la fertilidad masculina (Saito y Takahashi, 2000). Todas las selenoproteínas actúan como antioxidantes, es decir reducen el estrés oxidativo, evitando de esta manera la muerte celular, la insuficiencia de los órganos, en cuanto al GPX4 se le conoce por ser una proteína estructural de los espermatozoides, si se presenta una baja funcionalidad de la GPX se le atribuye a que los espermatozoides tendrán una menor motilidad y supervivencia, aparte de existir un fallo a nivel neuronal, las selenoproteínas fortalecen el sistema inmunitario, puesto que al ser consumidas en la dieta balanceada generan anticuerpos (Weeks, 2012).

Tabla 2.4 Funciones de las selenoproteínas.

Especies	RDA
GPX1 (glutación peroxidasa citosólica)	Se, antioxidante en citosol.
GPX2 (glutación peroxidasa gastrointestinal)	Protección antioxidante en el tracto gastrointestinal.
GPX3 (glutación peroxidasa plasmática o extracelular)	Antioxidante extracelular y plasmático.
GPX4 (fosfolípido hidropéroxido glutación peroxidasa)	Antioxidante intracelular.
GPX5 (selenoproteína de la cápsula mitocondrial de esperma)	Antioxidante en el desarrollo de células espermáticas.
D1 (desyodasa tipo I)	Regulación y producción T4→T3.
D2 (desyodasa de tipo II)	Activar la hormona tiroidea.
D3 (desyodasa de tipo III)	Convierte T4 en rT3 bioactivo.
TRs (tioredoxina reductasa)	Síntesis de ADN, regulador redox.
Sel P (selenoproteína P)	Antioxidante, transporte de Se, desintoxicante.
Sel W (selenoproteína W)	Metabolismo muscular antioxidante.

Nota: Adaptado de (Vázquez, 2011)

En el trabajo de investigación titulado 'Effect of elemental nano-selenium on semen quality,

glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats'' en donde se seleccionaron 42 machos de la raza Boer de 4,5 meses de edad, en donde se adicionaron 0,3 mg Se/Kg de M.S y se tomaron de 2-3 eyaculados por semana durante 1 mes, se encontró que hubo diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento control con respecto al tratamiento en donde se incluyó los 0,3 mg Se/Kg de M.S, en las siguientes variables: concentración de semen GSP-Px (U/ml), concentración de ATPasa (U/ml), concentración de GSH-Px testicular (U/mg), volumen del eyaculado (ml), motilidad de los espermatozoides (%), Densidad de espermática (109 ml-1), tasa de anomalía de los espermatozoides (%) y pH de los espermatozoides (Shi y cols., 2010).ver tabla 2.5.

Tabla 2.5 Efecto del Nano-Se sobre la concentración de la glutación peroxidasa a nivel testicular y seminal, así como de la concentración de la ATPasa y sobre los parámetros de calidad seminal.

Ítems	Control ($n = 20$)	Nano-selenium ($n = 22$)
Concentración de semen GSP-Px (U/ml)	13.55 ± 3.15	29.95 ± 2.87.
Concentración de ATPasa (U/ml)	5.41 ± 1.07	16.01 ± 2.00.
Concentración de GSH-Px testicular (U/mg)	65.20 ± 5.89	106.51 ± 9.56.
Volumen del eyaculado (ml)	0.87 ± 0.31	0.97 ± 0.58.
Motilidad de los espermatozoides (%)	75.20 ± 4.69	80.51 ± 3.40.
Densidad de espermática (109ml-1)	49.38 ± 4.10	51.95 ± 3.00.
Tasa de anomalía de los espermatozoides (%)	16.23 ± 2.68	4.34 ± 2.10.
pH de los espermatozoides	6.01 ± 0.11	5.75 ± 0.07.

Nota: Adaptado de (Shi y cols., 2010)

2.5.6. Nanopartículas, y su utilización en criopreservación de semen

La búsqueda de implementar nuevas metodologías para la síntesis de nanomateriales que además de producir nanopartículas (NPs) de un tamaño uniforme, también implique tener un menor impacto ambiental, ha mostrado grandes avances no sólo para la comunidad científica sino también a nivel industrial. es por esto, que la nanociencia y la nanotecnología presentan gran variedad de aplicaciones, pues es un área interdisciplinar entre la biología, la química y la física (Tong y cols., 2008).Una nanopartícula es aquella que posee un tamaño específico, el cual oscila entre 1-1000

nm (Jain, El-Sayed, y El-Sayed, 2007) y se pueden definir como átomos artificiales, los cuales presentan propiedades fisicoquímicas únicas en relación a las de la misma especie en su estado cristalino (Wu y cols., 2006).

Actualmente se han realizado avances significativos en la síntesis de nanopartículas, utilizando estrategias de química húmeda que producen especies de alta calidad de diversos materiales inorgánicos. La manipulación de las condiciones de síntesis permite el control de la morfología de las partículas y provee los medios para "moldear" sus propiedades. Estos métodos de síntesis suelen agruparse en dos categorías "de arriba hacia abajo", donde se dividen sólidos macroscópicos en porciones más pequeñas, seguido de volatilización del sustrato y condensación de los componentes; y la segunda, que es la más empleada por su economía y eficiencia, es "de abajo hacia arriba", que implica la condensación de átomos o moléculas en fase gaseosa o líquida (Petersen, Jakobi, y Barcikowski, 2009).

Existen diferentes rutas sintéticas para la síntesis de NPs en la categoría "de abajo hacia arriba"; los más comunes son el método de sol-gel, síntesis solvotermal y el método coloidal (Chen y cols., 2004; Fojtik y Henglein, 1993; Sylvestre, Kabashin, Sacher, Meunier, y Luong, 2004). Estas rutas implican el uso de químicos tóxicos, que llevan a la formación de subproductos peligrosos y la contaminación con los precursores químicos, por tal motivo, se hace necesario el desarrollo de procedimientos limpios, no tóxicos y amigables con el medio ambiente, para la síntesis de nanopartículas. En consecuencia, la ablación por láser pulsado en medio líquido (PLALM) es una mejor opción, esta técnica consta de un láser pulsado de alta potencia enfocado por medio de un objetivo sobre un blanco sólido sumergido en un medio líquido. La interacción de la luz con la superficie del blanco sólido causa vaporización tanto del blanco como de una pequeña cantidad del líquido que lo rodea dando paso a reacciones químicas de las que resultan NPs compuestas por átomos tanto del líquido como del blanco (J. Zhang y Lan, 2008).

2.5.7. Nanopartículas ya usadas en semen

El uso de nanopartículas es una técnica eficiente en los procesos de criopreservación del semen, puesto que este proceso genera un alto nivel de estrés oxidativo (Khalil, El-Harairy, Zeidan, y Hassan, 2019) con carencia en la defensa de antioxidantes, que afectan morfología y calidad seminal, provocando un impacto perjudicial en el proceso de fertilización (Kumaresan y cols., 2009), es por ello que la suplementación de diluyentes promueven la protección de los espermatozoides, en el mercado se pueden encontrar algunos diluyentes en forma de antioxidantes enzimáticos tales como la glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa, vitaminas (ácido ascórbico, α -tocoferol y β -caroteno), minerales (Zn y Se) (Rezaeian y cols., 2016). Estos nanomateriales poseen una mayor absorción, reactividad, área superficial, propiedades tanto antioxidantes como aglutinantes (Nel, Xia, Madler, y Li, 2006).

Por primera vez se demostró la citocompatibilidad de AgNPs en espermatozoides de cerdo. Aún con el tratamiento con la dosis de 20 mM se mantuvo la viabilidad del semen de cerdo, la cual podría considerarse alta comparada con las dosis reportadas por otros autores (López-Pérez, 2017).

Las Au-NP y Ag-NP no parecen ser perjudiciales para los espermatozoides humanos hasta concentraciones altas (250-500 μ M) que probablemente son difíciles de alcanzar in vivo. Es obligatorio explorar el efecto genotóxico de las NP en las células germinales (Moretti y cols., 2013).

Adición de selenio en nanopartículas (SeNPs) a 0.5 o 1.0 μ gmL mejora significativamente la motilidad progresiva y la integridad de membrana plasmática. Esa mejora puede ser explicada por el aumento de la capacidad antioxidante, principalmente por la acción de la enzima glutatión peroxidasa que es una enzima que se encuentra en el plasma seminal, favoreciendo la protección del plasma seminal sobre el estrés oxidativo (Khalil y cols., 2019).

2.6. Marco Conceptual

Cinemática: parte de la mecánica que estudia los tipos de movimiento sin atender las causas que lo producen.

Criopreservación: la criopreservación seminal es el proceso en el cual se busca preservar la información genética de sementales, manteniendo la viabilidad celular a temperaturas muy bajas (-196°C Nitrógeno líquido) por un tiempo indefinido.

Diluyente: medio de mantenimiento para minimizar los efectos perjudiciales de la criopreservación.

Espermatozoide: gametos del macho que se producen en los túbulos seminíferos de los testículos.

Nanopartículas: una nanopartícula es aquella cuyo tamaño específico se encuentra entre 1-1000 nm (Jain y cols., 2007).

Plasma seminal: fluido espeso y de color blanquecino que está compuesto por un líquido en el que se encuentran en suspensión los espermatozoides; se produce por las secreciones de distintas glándulas del aparato reproductor masculino.

Radicales libres: aquellas moléculas que tienen un electrón desapareado en su orbital más externo. Esto les confiere una capacidad de reacción muy elevada, por lo que son capaces de actuar en los sistemas biológicos produciendo cambios en la composición química o en la estructura de los elementos celulares.

Vagina artificial: es una imitación de la vagina de la hembra, que mediante un estímulo térmico y mecánico, desencadena la eyaculación (Aisen, 2004)

2.7. Marco legal

- Resolución N° 20277 (07/02/2018): Por la cual se establecen los requisitos sanitarios y de inocuidad para obtener la certificación en buenas practicas ganaderas BPG en la producción primaria de Ovinos y Caprinos.
- LEY 811 DE 2003 (junio 26): por medio de la cual se modifica la Ley 101 de 1993, se crean las organizaciones de cadenas en el sector agropecuario, pesquero, forestal, acuícola, las Sociedades Agrarias de Transformación, sat, y se dictan otras disposiciones.
- Resolución 889 (10/04/2003): Por la cual se establecen requisitos sanitarios para las fincas que produzcan bovinos, ovinos, caprinos y bubalinos para sacrificio con destino a la exportación
- Resolución 1192 de 2008: Por la cual se establecen medidas sanitarias para la Prevención, el Control y la Erradicación de la Brucelosis en las especies bovina, bufalina, caprina, ovina y porcina en la República de Colombia.
- Decreto 1500 de 2007: del Ministerio de Protección Social, por el cual se establece el reglamento técnico a través del cual se crea el sistema oficial de Inspección, vigilancia y control de la carne, productos cárnicos comestibles y derivados cárnicos destinados para el consumo humano y los requisitos sanitarios y de inocuidad que se deben cumplir en su producción primaria, beneficio, desposte, desprese, procesamiento, almacenamiento, transporte, comercialización, expendio, importación o exportación.
- CONPES 3375 de 2005, por el cual se define la política nacional de sanidad agropecuaria e inocuidad de alimentos para el sistema de medidas sanitarias y fitosanitaria.

- Resolución 008430 de octubre 4 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia: esta investigación se consideró como investigación sin riesgo de acuerdo al artículo 11 de esta última resolución, dado que no se hará una modificación genética, bioquímica, celular, fisiológica o cambios en los modelos de estudio.

3. Materiales y Métodos

3.1. Localización

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones de la granja Los Andes y el laboratorio de Biotecnología Reproductiva del Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA), ubicados en el municipio de Málaga, Santander, a una altitud de 2.105 msnm, y una georreferenciación de 6°43'27"N y 72°43'0"W.

3.2. Insumos químicos

Los insumos usados en este estudio, como el Selenio del 99.9 % pureza transformado en nanopartículas de Selenio, fue importado por medio de la empresa PLMC (Plasma and Materials Characterization), además se utilizó Triladyl| Minitube, como medio diluyente en agua bidestilada. Figura C.2 y C.4

3.3. Animales experimentales y colectas de acostumbramiento

El estudio se realizó con machos caprinos de 5-6 años de edad de razas Boer, Alpino frances, Alpino americano y Saanen cuyos animales se encontraban en una condición corporal de 3 a 3.5, mantenidos en las mismas condiciones de alimentación, agua y alojamiento, éstos animales fueron preparados para la colecta según se describe en el apendice A; además fue necesaria la utilización

de 2 hembras caprinas estrogenizadas por medio de una dosis de 0.5 ml via intramuscular de EstroZoo (Benzoato de estradiol), facilitando la receptividad hacia los machos. Figura C.1

Las colectas de semen fueron realizadas por medio de una vagina artificial, éste proceso tuvo un periodo de acostumbramiento de un mes previo al experimento. Las colectas fueron analizadas para determinar la calidad seminal de los eyaculados mediante los criterios de aceptación definidos para su posterior congelación, estos procedimientos se realizaron teniendo en cuenta los implementos y el protocolo que se describe en el apéndice B.

3.4. Preparación de las nanopartículas de Selenio

Se utilizó la técnica de ablación laser pulsado en medio líquido (PLAL- pulsed laser ablation in liquids), fue utilizado un láser pulsado de Nd:YAG, operando en frecuencia de pulso de a 10Hz, con ancho de pulso de 10ns y energías máximas de 850mJ, 400mJ y 185mJ en las longitudes de onda de 1064nm (infrarrojo), 532nm (verde) y 355nm (ultravioleta) respectivamente (Fojtik y Henglein, 1993), fue usado como solvente agua ultra pura para la preparación de las nanoparticulas de selenio (NPs Se) para medio líquido, libres de reactivos y contaminantes. La distribución de tamaño de partículas de las NPso preparadas en medio líquido fue caracterizada en un equipo SALD 2201 y potencial Zeta. El tamaño de la nanoparticula fue de 80 nm, con un potencial Z (mV) -19.4 ± 0.30 y con un índice de polidispersión (PDI) de 0.4 ± 0.03 . La solución final tuvo una concentración de $0,1 \times 10^{-3}$ gr/ml.

Figura C.3

3.5. Aceptación de eyaculados, congelación y descongelación

La fase experimental fue realizada en dos oportunidades para constatar los resultados obtenidos. En un primer experimento realizado, se obtuvieron dos eyaculados y 40 pajillas mediante el método de vagina artificial. Luego de obtener las colectas de los eyaculados, se mezclaron con la

primera fracción del diluyente (1:1) una vez estabilizado a 35 °C en baño maría, se analizaron para establecer la concentración espermática a la que se congelaran las muestras experimentales; en una segunda fase experimental, se colectaron tres eyaculados y 60 pajillas mediante método de vagina artificial, los eyaculados se diluyeron (1:1) y se continuo con la curva de refrigeración. Figura C.5 y C.6

El semen fue diluido hasta garantizar en promedio una concentración final de 120×10^6 spz/ml en un medio de congelación espermático Triladyl, preparado en su forma comercial en una proporción del 60 % de agua bidestilada, 20 % de yema de huevo y 20 % de diluyente Triladyl, a una temperatura de 35 °C.

Las SeNPs fueron adicionadas en las proporciones de 1 % y 2 % en las muestras diluidas, se lograron destinar 5 pajillas para cada tratamiento por eyaculado, identificadas por color durante su sellado, se continuó con la respectiva curva de refrigeración (1°C/3min) hasta llegar a los 5°C, donde se evaluaron las variables de calidad seminal por tratamiento, teniendo así, datos de referencia al momento antes de su congelación. Estos procesos e implementos para la congelación y descongelación de las pajillas, se describen en el apéndice C.

3.6. Análisis espermático

El análisis del semen fresco se realizó inmediatamente se hizo la colecta, para obtener los parámetros espermáticos como volumen, color, consistencia, concentración espermática, motilidad masal y motilidad total, siendo estos parámetros los necesarios para aprobar el semen que sería congelado. Las variables de cinemática (Motilidad, Motilidad Progresiva, Motilidad circular, Motilidad rapida, Motilidad Lenta, Motilidad local y espermatozoides Inmoviles) fueron determinadas por medio del **Sistema computalizado CASA® Audiovision**. Figura C. y C.8

3.7. Análisis estadístico

Con el propósito de evaluar la respuesta del uso de nanopartículas de selenio adicionadas al 1 % y 2 % sobre la calidad del semen pre-congelado (5 °C) y post-descongelado en los tratamientos experimentales sobre las variables: concentración espermática [10^9 /ml], motilidad total (%), motilidad progresiva (%), motilidad circular (%), motilidad rápida (%), motilidad lenta (%), motilidad local (%) y espermios inmóviles (%), se realizó la prueba de normalidad t-Student. Los datos fueron analizados el programa InfoStat versión (2018).

Tratamientos experimentales

T1: Inclusión del 1 % de Nanopartículas de Selenio.

T2: Inclusión del 2 % de Nanopartículas de Selenio.

Planteamiento de Hipótesis.

H0: la adición de nanopartículas de selenio al 1 y 2 % es igual.

H1: La adición de nanopartículas de selenio al 1 y 2 % no es igual.

4. Resultados y Discusión

4.1. Experimento I

Tabla 4.1 Análisis espermático del semen caprino pre-congelado

Variabes	Inclusión 1 % SeNps	Inclusión 2 % SeNps	T	p Valor
Concentracion epz [10^9 /ml]	100,34	60,36	3,56	0,0052
Mot Total[%]	65,64	37,37	11,23	0,0001
Mot progresiva[%]	51,57	26,89	14,68	0,0001
Motilidad circular (%)	0	0,07	-2,4	0,0397
Mot rapida [%]	12,16	9,29	2,54	0,0317
Mot lenta [%]	39,41	17,55	19,25	0,0001
Mot local [%]	14,08	10,49	4,11	0,0007
Epz inmóviles[%]	34,37	62,63	-11,24	0,0001

SeNps: Nanopartículas de selenio

Prueba t-Student

Con base a la Tabla 4.1 del experimento I para el análisis espermático del semen caprino pre-congelado a 5°C la medición de variables: concentración espermática [10^9 /ml], motilidad total, motilidad progresiva, motilidad circular, motilidad rápida, motilidad lenta, motilidad local y espermios inmóviles estimadas en porcentaje (%) se observó que los tratamientos T1 y T2 presentaron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0,05$).

Tabla 4.2 Análisis espermático del semen caprino post-descongelación

Variabes	Inclusión 1 % SeNps	Inclusión 2 % SeNps	T	p Valor
Mot Total[%]	33,99	33,96	0,00	0,9969
Mot progresiva[%]	26,86	25,85	0,15	0,8835
Motilidad circular (%)	0,07	0,08	-0,15	0,8789
Mot rapida [%]	7,31	8,78	-0,76	0,4555
Mot lenta [%]	19,44	16,96	0,48	0,1241
Mot local [%]	7,13	8,14	-0,72	0,4812
Epz inmóviles[%]	66,01	66,04	0,00	0,9969

SeNps: Nanopartículas de selenio

Prueba t-Student

Con base a la Tabla 4.2 del experimento I para el análisis espermático del semen caprino pre-congelado a 5°C en la medición de variables: concentración espermática [10^9 /ml], motilidad total, motilidad progresiva, motilidad circular, motilidad rápida, motilidad lenta, motilidad local y espermios inmóviles estimadas en porcentaje (%) se observó que los tratamientos T1 y T2 no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0,05$).

4.2. Experimento II

Tabla 4.3 Análisis espermático del semen caprino pre-congelación

Variabes	Inclusión 1 % SeNps	Inclusión 2 % SeNps	T	p Valor
Concentracion epz [10^9 /ml]	153,53	124,88	1,97	0,0585
Mot Total[%]	77,78	73,28	0,81	0,4318
Mot progresiva[%]	59,3	61,27	-0,32	0,7522
Motilidad circular (%)	0,06	0,13	-4,16	0,0007
Mot rapida [%]	21,25	26,47	-1,54	0,1414
Mot lenta [%]	38,01	35,35	0,87	0,3988
Mot local [%]	18,48	12	9,32	0,0001
Epz inmóviles[%]	22,23	26,72	-0,81	0,4318

SeNps: Nanopartículas de selenio

Prueba t-Student

Con respecto a la Tabla 4.3 del experimento II en el análisis espermático del semen caprino pre-congelado a 5°C para la medición de variables concentración espermática [10^9 /ml], motilidad

circular (%) y motilidad local (%) los tratamientos T1 y T2 se comportaron estadísticamente diferente.

En tanto, las variables de motilidad total, motilidad progresiva, , motilidad rápida, motilidad lenta y espermios inmóviles estimadas en porcentaje (%) se determinó que los tratamientos T1 y T2 se comportaron de manera estadísticamente igual ($\alpha=0,05$).

Tabla 4.4 Análisis espermático del semen caprino post-descongelación

Variabes	Inclusión 1 % SeNps	Inclusión 2 % SeNps	T	p Valor
Mot Total [%]	30,99	23,28	1,60	0,1237
Mot progresiva [%]	19,32	15,89	1,13	0,2689
Motilidad circular (%)	0,01	0,01	-0,45	0,6593
Mot rapida [%]	7,68	7,15	0,48	0,6365
Mot lenta [%]	11,63	8,73	1,21	0,2370
Mot local [%]	11,66	7,39	1,65	0,1167
Epz inmóviles [%]	69,01	76,73	-1,60	0,2350

SeNps: Nanopartículas de selenio
Prueba t-Student

Con respecto a la Tabla 4.4 del experimento II, en el análisis espermático del semen caprino post-descongelado para la medición de variables concentración espermática [10^9 /ml], motilidad total, motilidad progresiva, motilidad circular, motilidad rápida, motilidad lenta, motilidad local y espermios inmóviles estimadas en porcentaje (%) se determinó que los tratamientos T1 y T2 se comportaron estadísticamente iguales ($\alpha=0,05$).

4.3. Discusión

En el presente estudio del análisis espermático del semen caprino pre-congelado (5°C) en el experimento I arrojó diferencias estadísticamente significativas para todas las variables estudiadas; en cambio en el semen post-descongelado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las variables concentración espermática [10^9 /ml], motilidad total (%), motili-

dad progresiva (%), motilidad circular (%), motilidad rápida (%), motilidad lenta (%), motilidad local (%) y espermios inmóviles (%) ($\alpha=0,05$), esto quiere decir que las nanopartículas de selenio al 1 y 2 % tuvieron en el pre-congelamiento a 5° C y no al momento de la post-descongelación, estos datos se correlacionan con los obtenidos por (Moreno-Avalos y cols., 2021) quien encontró una viabilidad espermática para el semen refrigerado que va del 51 % al 79,3 %, lo que supone un porcentaje de espermatozoides muertos de 49 % y 20,7 %, datos que pudieron ser propiciados a la composición del diluyente, ya que de por si afecta la calidad espermática tanto en el proceso de refrigeración como al de post-descongelamiento (Stewart y cols., 2018), en este estudio se encontró diferencias estadísticamente significativas para la concentración espermática con valores oscilatorios de $153,536 \times 10^9$ a $60,36 \times 10^9$ espermatozoides/ml tanto en el experimento I y II del semen pre-congelado 5°C dato un tanto intermedio con respecto a los encontrados por Câmara et al., (2019) el cual reportó una concentración espermática del semen fresco de $3,55 \times 10^9$, en este estudio para el semen refrigerado se obtuvo valores para la misma variable de $1,8236 \times 10^9$ en el tratamiento alternativo y $1,03 \times 10^9$ en el tratamiento testigo; ya para las variables de motilidad total se reportaron valores de 33,37 a 77,78 % y una motilidad progresiva 15,89 a 25,85 % datos un tanto inferiores y correlacionados a los obtenidos por Cavalcante (2003) quien encontró en el semen descongelado una motilidad total igual al 51 % y una motilidad progresiva del 21 %, en base a estos valores reportados hizo alusión a que el proceso de pasar el semen fresco a post-descongelado disminuye los procesos de motilidad progresiva hasta en un 46 %, así mismo el proceso de crio-preservación es nocivo para la motilidad total y la velocidad de trayectoria de los espermatozoides tomado de (BARROSO, 2018), aunque los valores de motilidad en general también varían de acuerdo a la fracción del eyaculado, el biotipo racial, el procedimiento de congelación, la circunferencia escrotal y el tipo de diluyente que se empleen, es así que en estudios realizados utilizando Triladyl® como diluyente, se observó porcentaje de motilidad del 35,3 % (Hernández-Corredor, Nivia-Osuna, Hernández-Villamizar, Rubio-Parada, y Quintero-Moreno, 2013), sin embargo las motilidades total y progresiva en este estudio son mayores que las encontradas por Câmara et al., (2019) quien obtuvo valores para el semen descongelado una motilidad total (%) del 20,50 % valo-

res que concuerdan con los intervalos en base a la media poblacional de este estudio, sin embargo los valores que cita el autor para el parámetro motilidad progresiva fueron inferiores con un valor de 11,29 %. Otra de las variables identificadas en este estudio fue la cantidad de espermios inmóviles medida en porcentaje, la cual en el semen post-descongelado oscilo entre valores de 66,01 a 76,73 %, este parámetro no hace solo alusión a la cantidad de espermatozoides muertos, sino también a aquellos que estando vivos o muertos, tienen algún defecto en su morfología, estos datos pueden ser referentes a que durante el proceso de la criopreservación se presenta deshidratación del espermatozoide, cambio celular, daño estructural de la membrana y desnaturalización de la proteína, disminuyendo en sí el porcentaje de viabilidad hasta en un 50 % por daños en el semen (Sakashita, de Carvalho Rodrigues, Rodello, Monteiro, y Iapichini, 2016).

4. Conclusiones

En cuanto al semen pre-congelado a temperatura de 5°C, se evidenció que en la toma de muestras de los eyaculados para el experimento I, las variables (concentración espermática [10^6 /ml], motilidad total (%), motilidad progresiva (%), motilidad rápida (%), motilidad local (%), motilidad lenta (%) y espermios inmóviles (%)) se comportaron de manera estadísticamente diferentes, los tratamientos que tenían el 1% de nanopartículas de selenio con respecto al tratamiento que incluía el 2% de nanopartículas de selenio. En los resultados analizados de pre-congelación del experimento II para la medición de variables concentración espermática [10^9 /ml], motilidad circular (%) y motilidad local (%) los tratamientos T1 y T2 se comportaron estadísticamente diferente; en tanto, los parámetros de motilidad total, motilidad progresiva, , motilidad rápida, motilidad lenta y espermios inmóviles estimadas en porcentaje (%) se determinó que los tratamientos T1 y T2 se comportaron de manera estadísticamente igual ($\alpha=0,05$).

Para el semen post-descongelado en la medición I y II de las tomas de muestra de los parámetros espermáticos y cinemáticos no presentaron diferencias estadísticamente significativas, demostrando así, que no hubo ninguna respuesta en el uso de nanopartículas de Selenio sobre los parámetros de cinemática espermática durante el proceso de congelación.

5.1. Recomendaciones

Sería interesante que en próximos trabajos investigativos se evaluará el perfil de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa y su efecto para disminuir el estrés oxidativo sobre parámetros de calidad espermática tales como: motilidad, vigor espermático y correlacionar los datos que se obtengan sobre el índice de fertilidad.

Teniendo en cuenta que en el mercado existen variedad de nanopartículas que ayudan a la criopreservación del semen, sería importante realizar un estudio acerca de las cantidades óptimas de inclusión de éstas en el diluyente y determinar si existen propiedades citotóxicas similares a la adición de nanopartículas como es el caso de las NPCu, NPZn, NPAg y NPTiO₂.

Del mismo modo, sería importante hacer un estudio del efecto de diferentes diluyentes (Tri-ladyl, Bioexcell, Tris, Edat, Equex) con variadas inclusiones de nanopartículas de Selenio en procesos de criopreservación del semen, para que pueda haber un tratamiento testigo (diluyente comercial) vs. tratamientos alternativos (inclusión de nanopartículas), de igual forma, se podría tomar el biotipo racial de los animales, y así poder determinar si hay una variación entre razas.

Se sugiere realizar un estudio en se evalúe el efecto de las nanopartículas sobre la integridad de las membranas plasmáticas, la morfología y el ADN de los espermatozoides.

Para finalizar, sería indispensable realizar un proyecto en donde se evalúe el uso de antioxidantes vs. el uso de nanopartículas sobre la criopreservación de semen caprino sobre la calidad espermática, el proceso de espermatogénesis, los patrones de motilidad, el vigor espermático y el aumento de la fertilidad, además se podría sugerir, comparar todas estas variables analizando unidades experimentales periódicamente durante un determinado tiempo.

Referencias Bibliográficas

- Abecia Martínez, A., y Forcada Miranda, F. (2010). Manejo reproductivo en ganado ovino.
- Agossou, D. J., y Koluman, N. (2018). The effects of natural mating and artificial insemination using cryopreserved buck semen on reproductive performance in alpine goats. *Archives animal breeding*, 61(4), 459–461.
- Aisen, E. G. (2004). *Reproducción ovina y caprina* (n.º V390 AISr).
- Anel-López, L., Ortega-Ferrusola, C., Martínez-Rodríguez, C., Álvarez, M., Borragán, S., Chamorro, C., ... De Paz, P. (2017). Analysis of seminal plasma from brown bear (*ursus arctos*) during the breeding season: Its relationship with testosterone levels. *PLoS One*, 12(8), e0181776.
- Ax, R., Dally, M., Didion, B., Lenz, R., Love, C., Varner, D., ... Bellin, M. (2002). Evaluación del semen. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. Hafez, ESE; B. Hafez (eds). 7a ed. p, 375–386.
- BARROSO, M. L. D. S. (2018). Estudio preliminar de proteínas relacionadas á criopreservação do sêmen caprino.
- Bispo, C., Pugliesi, G., Galvão, P., Rodrigues, M., Ker, P., Filgueiras, B., y Carvalho, G. (2011). Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small ruminant research*, 100(1), 54–58.

- Boe-Hansen, G. B., y Satake, N. (2019). An update on boar semen assessments by flow cytometry and casa. *Theriogenology*, 137, 93–103.
- Bonet, S. (2000). *Morfología espermática en porcí* (n.º 126). Institut d'Estudis Catalans.
- Bonet, S., Martínez, E., Rodríguez, J., y Barrera, X. (2006). *Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino: biotecnología de la reproducción porcina*. Universidad de Girona.
- Cavalcante, T. V. (2003). Concentrações plasmáticas de testosterona e fertilidade de machos caprinos das raças boer e alpina durante as estações reprodutiva e não reprodutiva.
- Cebrián, P., Muiño-Blanco, M., Pérez-Pé, R., Casao, G., y Palacios, R. (2010). Capítulo 8: Manejo del semen e inseminación artificial. *Abecia MA, Forcada MF. Manejo reproductivo en ganado ovino. España: Servet*, 113–144.
- Chen, G., Hong, M., Lan, B., Wang, Z., Lu, Y., y Chong, T. (2004). A convenient way to prepare magnetic colloids by direct nd: Yag laser ablation. *Applied surface science*, 228(1-4), 169–175.
- Collodel, G., Iacoponi, F., Mazzi, L., Terzuoli, G., Pascarelli, N. A., y Moretti, E. (2013). Light, polarizing, and transmission electron microscopy: three methods for the evaluation of sperm quality. *Systems biology in reproductive medicine*, 59(1), 27–33.
- Cortés Gallego, S. (1998). Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino.
- Daza, J. (1994). Inseminación artificial y andrología bovina. *Editorial Multimpresos. Montería (Córdoba)*.
- Derivaux, J. (1982). Fisiología de la reproducción de los animales domésticos. *Editorial Madrid. España*, 69–70.
- Díaz Díaz, F. (2020). Efecto de los microelementos selenio y cromo organicos en el crecimiento

testicular y calidad del semen de ovinos jóvenes.

Evans, G., Maxwell, W. C., y Salamon, S. (1990). *Inseminación artificial de ovejas y cabras* (n.º SF 376.25. E9218 1990).

Fojtik, A., y Henglein, A. (1993). Laser ablation of films and suspended particles in a solvent: formation of cluster and colloid solutions. *BERICHTE-BUNSENGESELLSCHAFT FUR PHYSIKALISCHE CHEMIE*, 97, 252–252.

Foote, R. H. (2003). Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Animal reproduction science*, 75(1-2), 119–139.

Foresta, C., Flohé, L., Garolla, A., Roveri, A., Ursini, F., y Maiorino, M. (2002). Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biology of reproduction*, 67(3), 967–971.

Gallagher, M. T., Cupples, G., Ooi, E. H., Kirkman-Brown, J., y Smith, D. (2019). Rapid sperm capture: high-throughput flagellar waveform analysis. *Human Reproduction*, 34(7), 1173–1185.

Gázquez Ortiz, A., y Blanco Rodríguez, A. (2004). Tratado de histología veterinaria.

Gil, J., Rodriguez-Irazoqui, M., Lundeheim, N., Söderquist, L., y Rodriguez-Martinez, H. (2003a). Fertilidad de semen de carnero congelado en bioexcell® y utilizado para inseminación artificial cervical. *Teriogenología*.

Gil, J., Rodriguez-Irazoqui, M., Lundeheim, N., Söderquist, L., y Rodriguez-Martinez, H. (2003b). Fertility of ram semen frozen in bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*, 59(5-6), 1157–1170.

Görlach, A. (1999). *Transferencia de embriones en el ganado vacuno* (n.º V395. 5 GORt).

Ha, N. y. B. M. J. y. S. L. A., Herena Y y Alfulaij. (2019). *De la absorción de selenio a la*

degradación de selenoproteína.

Hafez, E. S. E., y Hafez, B. (2007). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. McGraw-hill.

Hammad, G., Legrain, Y., Touat-Hamici, Z., Duhieu, S., Cornu, D., Bulteau, A.-L., y Chavatte, L. (2018). Interplay between selenium levels and replicative senescence in wi-38 human fibroblasts: a proteomic approach. *Antioxidants*, 7(1), 19.

Hernández Corredor, L., Camargo Rodríguez, O., Silva Torres, A., Montoya Páez, J. D., y Quintero Moreno, A. (2018). Efectos de la criopreservación sobre las subpoblaciones espermáticas en caprinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(3), 882–893.

Hernández-Corredor, L., Nivia-Osuna, A., Hernández-Villamizar, D., Rubio-Parada, J. A., y Quintero-Moreno, A. (2013). Evaluación de la motilidad espermática a través del sistema casa de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes. *Respuestas*, 18(2), 16–27.

Hicks, J. (2001). *Bioquímica mc graw hill interamericana editores*.

Hidalgo, M. (2005). Estudio del efecto de la congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos del espermatozoide del macho cabrío.

Iritani, A., Nishikawa, Y., y Nagasawa, S. (1964). Studies on the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen. vii. variations in the enzyme activity of the semen between breeding season and non-breeding season, and in each ejaculate collected three times successively. *Jpn J Anim Reprod*, 10, 52–56.

Jain, P. K., El-Sayed, I. H., y El-Sayed, M. A. (2007). Au nanoparticles target cancer. *nano today*, 2(1), 18–29.

Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Alexopoulos, C., y Amarantidis, I. (2000). Seasonal variation in

- semen characteristics of chios and friesland rams in greece. *Small ruminant research*, 37(1-2), 125–130.
- Khalil, W. A., El-Harairy, M. A., Zeidan, A. E., y Hassan, M. A. (2019). Impact of selenium nanoparticles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation. *Theriogenology*, 126, 121–127.
- Kumaresan, A., Kadirvel, G., Bujarbaruah, K., Bardoloi, R., Das, A., Kumar, S., y Naskar, S. (2009). Preservation of boar semen at 18 c induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *Animal reproduction science*, 110(1-2), 162–171.
- Llivi Marcatoma, J. C. (2015). *Comparación de la fertilidad de semen fresco y semen criopreservado de cabras saanen, usando inseminación artificial, mediante el porcentaje de concepción* (B.S. thesis). Quito: UCE.
- López-Pérez, S. D. A. L. Y. T.-T. O.-Z. P.-D. N.-A. R., Acosta Torres. (2017). Las nanopartículas de plata impiden el crecimiento bacteriano sin efectos tóxicos en el semen de cerdo.
- Memon, M., Bretzlaff, K., y Ott, R. (1986). Comparison of semen collection techniques in goats. *Theriogenology*, 26(6), 823–827.
- Molina-Coto, R., y Lucy, M. C. (2018). Uterine inflammation affects the reproductive performance of dairy cows: A review. *Agronomía Mesoamericana*, 29(2), 449–468.
- Morales, A. M. (2012). *Evaluación objetiva de la morfometría de los espermatozoides de ovino manchego (ovis aries). relaciones con la fertilidad* (Tesis Doctoral no publicada). Universidad de Castilla-La Mancha.
- Moreno-Avalos, S., Veliz-Deras, F., Calderon-Leyva, G., Contreras-Villarreal, V., Guillen-Muñoz, J., y Angel-García, O. (2021). Determinación de la calidad del semen criopreservado con lecitina de soya o yema de huevo, en machos cabríos. *Abanico veterinario*, 11.

- Moretti, E., Terzuoli, G., Renieri, T., Iacoponi, F., Castellini, C., Giordano, C., y Collodel, G. (2013). In vitro effect of gold and silver nanoparticles on human spermatozoa. *Andrologia*, 45(6), 392–396.
- Muñoz-Blanco, T., Pérez-Pé, R., y Cebrián-Pérez, J. (2008). Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in domestic animals*, 43, 18–31.
- Nadri, T., Towhidi, A., Zeinoaldini, S., Martínez-Pastor, F., Mousavi, M., Noei, R., . . . Sangcheshmeh, A. M. (2019). Lecithin nanoparticles enhance the cryosurvival of caprine sperm. *Theriogenology*, 133, 38–44.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., y Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *science*, 311(5761), 622–627.
- Niño González, T. (2013). *Aportaciones tecnológicas en la preservación del semen en la raza caprina* (Tesis Doctoral no publicada).
- Noblanc, A., Kocer, A., Chabory, E., Vernet, P., Saez, F., Cadet, R., . . . Drevet, J. R. (2011). Glutathione peroxidases at work on epididymal spermatozoa: an example of the dual effect of reactive oxygen species on mammalian male fertilizing ability. *Journal of andrology*, 32(6), 641–650.
- Petersen, S., Jakobi, J., y Barcikowski, S. (2009). In situ bioconjugation—novel laser based approach to pure nanoparticle-conjugates. *Applied surface science*, 255(10), 5435–5438.
- Pomerol, J. M., y Arrondo, J. (1994). *Práctica andrológica*. Barcelona: Ediciones Científicas y Técnicas SA.
- Qazi, I. H., Angel, C., Yang, H., Pan, B., Zoidis, E., Zeng, C.-J., . . . Zhou, G.-B. (2018). Selenium, selenoproteins, and female reproduction: a review. *Molecules*, 23(12), 3053.
- Rezaeian, Z., Yazdekhesti, H., Nasri, S., Rajabi, Z., Fallahi, P., y Amidi, F. (2016). Effect of

- selenium on human sperm parameters after freezing and thawing procedures. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(6), 462–466.
- Rodríguez-Martínez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Roca, J., y Peña, F. (2008). Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 70(8), 1242–1250.
- Saito, Y., y Takahashi, K. (2000). Selenoprotein p: its structure and functions. *Journal of Health Science*, 46(6), 409–413.
- Sakashita, S. M., de Carvalho Rodrigues, C. F., Rodello, L., Monteiro, C. D., y Iapichini, J. E. C. B. (2016). Inseminação artificial em caprinos: Associação das biotécnicas de diluição e refrigeração do sêmen. *PUBVET*, 6, Art–1345.
- Sánchez Pozo, M. C., Sánchez Prieto, I., y Bueno Rodríguez, G. (2017). Técnicas avanzadas para selección de espermatozoides. *Revista del Laboratorio Clínico*, 10(3), 129–138.
- Sánchez-Torres, T. (2013). Micro y nano encapsulación para la liberación controlada de compuestos en la producción pecuaria: Caso selenio. *Agro Productividad*, 6(4).
- San-Miguel, A., y Martín-Gil, F. (2009). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Gaceta Médica de Bilbao*, 106(3), 106–113.
- Santiago Moreno, J., Cortes, S., Gonzalez de Bulnes, A., y Vinader, M. (1996). Ultrasound imaging evaluation in a case of orchitis and vesiculitis in a male goat. *Medicina Veterinaria (España)*.
- Shi, L.-g., Yang, R.-j., Yue, W.-b., Xun, W.-j., Zhang, C.-x., Ren, Y.-s., ... Lei, F.-l. (2010). Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male boer goats. *Animal reproduction science*, 118(2-4), 248–254.
- Sieme, H. (2009). Semen evaluation. *Equine breeding management and artificial insemination*, 57–74.

- Stewart, J. L., Shipley, C. F., Ellerbrock, R. E., Schmidt, L., Lima, F. S., y Canisso, I. F. (2018). Physiological variations in reproductive and metabolic features of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) bucks throughout the rutting season. *Theriogenology*, *114*, 308–316.
- Sylvestre, J.-P., Kabashin, A. V., Sacher, E., Meunier, M., y Luong, J. H. (2004). Stabilization and size control of gold nanoparticles during laser ablation in aqueous cyclodextrins. *Journal of the American Chemical Society*, *126*(23), 7176–7177.
- Tabarez Rojas, A., y cols. (2014). *Optimización del protocolo de crioconservación de semen caprino de la raza autóctona en peligro de extinción blanca de rasquera*. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Tong, S., Zhang, C., Jiang, C., Liu, G., Ling, Q., Kang, E., ... Zhu, C. (2008). Improvement in the hole collection of polymer solar cells by utilizing gold nanoparticle buffer layer. *Chemical Physics Letters*, *453*(1-3), 73–76.
- Touat-Hamici, Z., Legrain, Y., Bulteau, A.-L., y Chavatte, L. (2014). Selective up-regulation of human selenoproteins in response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(21), 14750–14761.
- Trujillo García, D. A. (2017). Criopreservación de semen caprino utilizando diferentes concentraciones de glicerol en el diluyente.
- Ugalde, J. R. (2014). Biotecnologías reproductivas para el siglo xxi. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, *48*(1), 33–34.
- Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., ... Memili, E. (2019). Advances in cryopreservation of bull sperm. *Frontiers in veterinary science*, *6*, 268.
- Uysal, M. y o., Ongun y Bucak. (2007). *Efectos del glutatión oxidado, la albúmina sérica bovina, la cisteína y el licopeno en la calidad del semen de carnero congelado-descongelado*.

- Vázquez, R. y S. A. y L.-D. y T. J. y G.-A. y P. N. y D.1@. y, J y Rojo. (2011). *elementos traza en la reproducción ovina y caprina*.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., y Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57(1), 149–179.
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, 60, 481–492.
- Weeks, H. M. y C. D., B. (2012). *Función dietética de selenio y selenoproteína*.
- Wrobel, K., y Bergmann, M. (1998). Male reproductive system. *Textbook of veterinary histology*, 5, 226–246.
- Wu, C., Qiao, X., Chen, J., Wang, H., Tan, F., y Li, S. (2006). A novel chemical route to prepare zno nanoparticles. *Materials Letters*, 60(15), 1828–1832.
- Xiong, X., Lan, D., Li, J., Lin, Y., y Li, M. (2018). Selenium supplementation during in vitro maturation enhances meiosis and developmental capacity of yak oocytes. *Animal Science Journal*, 89(2), 298–306.
- Zanganeh, Z., Zhandi, M., Zare-Shahneh, A., Najafi, A., Nabi, M. M., y Mohammadi-Sangcheshmeh, A. (2013a). Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? *Small Ruminant Research*, 114(1), 120–125.
- Zanganeh, Z., Zhandi, M., Zare-Shahneh, A., Najafi, A., Nabi, M. M., y Mohammadi-Sangcheshmeh, A. (2013b). Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? *Small Ruminant Research*, 114(1), 120–125.
- Zhang, J., y Lan, C. Q. (2008). Nickel and cobalt nanoparticles produced by laser ablation of solids in organic solution. *Materials Letters*, 62(10-11), 1521–1524.
- Zhang, S., Hu, J., Li, Q., Jiang, Z., y Zhang, X. (2009). The cryoprotective effects of soybean

lecithin on boar spermatozoa quality. *African Journal of Biotechnology*, 8(22).

Apéndice A

5.2. Criterios de aceptación.

- Motilidad masal >3.

- Motilidad progresiva 70 %.

- Morfología 70 %.

Preparación de los machos para las colectas

Protocolo para la colecta de semen

La colecta de semen es uno de los procesos más importantes en los programas de IA, IATF Y FIV, debido a que el éxito de una buena muestra seminal, depende de diferentes factores y condiciones al momento de realizar la colecta.

Para el desarrollo de esta práctica será empleada una Vagina artificial, para realizar la colecta seminal, siendo esta, un equipo muy conocido y con excelentes resultados en la obtención de los eyaculados.

Proceso de higienización pre colecta.

Este proceso, se inicia realizando un lavado para limpiar la parte ventro abdominal y un lavado interno del prepucio realizando una serie de masajes para remover cualquier tipo de suciedad presente y posteriormente se realiza un secado con papel toalla.

Luego, se realiza un corte al exceso de pelo alrededor del prepucio, siempre teniendo cuidado, de no lastimar al animal, una vez culminado este proceso, se realiza un nuevo lavado con agua y jabón neutro para un posterior secado con papel toalla, para finalizar este proceso de higienización, se realiza un lavado interno del prepucio con una infusión de solución salina, con el fin de evitar que el semen se contamine, con algún tipo de agente externo o por mismas secreciones del animal.

Estas acciones se realizan con el fin de obtener muestras seminales óptimas para su congelación.

Paso a paso:

- Lavado de la parte ventral abdominal con la utilización de jabón neutro y abundante agua y secado con papel toalla.
- Corte del exceso de pelo del orificio prepucial con la ayuda de una tijera.
- Lavado del orificio prepucial con la utilización de jabón neutro y abundante agua y el secado con papel toalla.
- Lavado con solución fisiológica de la parte interna del prepucio.

Estimulo sexual pre colecta.

Se debe estimular al macho antes de realizar la colecta, con falsas montas sobre hembras estrogenizadas, y así estimular la secreción de fluidos secretados por las glándulas sexuales, para

eliminar material contaminante de la uretra.

Con estas acciones, se pretende obtener una mayor cantidad y concentración de líquido seminal, exponiendo al macho a estimulaciones visuales y olfativa. Se pueden permitir de 2 a 3 falsas montas.

Apéndice B

Implementos y protocolos para la colecta de semen.

Colecta de semen con la vagina artificial

La vagina artificial es el equipamiento más sencillo, económico y más utilizado en la obtención de semen, al simular una monta natural, permitiendo eyaculados más parecidos fisiológicamente a los naturales con una alta calidad.

Los componentes usuales de una (VA) incluyen, un tubo rígido, una camisa interior de caucho o látex de color negro, conectada a una válvula que permite el llenado con agua caliente y un posterior llenado de aire, permitiendo ajustar la presión de la vagina, varias bandas elásticas de caucho permiten la sujeción del cono colector de látex, un tubo colector de semen y una cubierta protectora con aislamiento de temperatura y de los rayos solares.

Pasos para la preparación de la vagina

- Se toma el tubo rígido, y se introduce la camisa de látex en su interior.
- Posteriormente se voltean las dos puntas de los extremos del látex abrazando y sujetando el tubo rígido a cada extremo por medio de las bandas elásticas.
- El tubo colector se coloca en la parte estrecha del cono desechable, el cual se introduce al tubo rígido, en la parte larga de dónde queda la válvula de llenado.

- Luego, se debe retirar la tapa de la válvula para su posterior llenado, el agua con la que se debe llenar la vagina, debe estar a una temperatura de 35°C.
- Para simular la temperatura y presión de la vagina real de la hembra, se puede agregar aire por medio de la válvula de aire.
- Finalmente se debe tomar la temperatura al interior de la vagina artificial manteniéndose en un rango de °C.

Todos estos equipos se deben tener en las mejores condiciones de higiene, para asegurar las mejores condiciones de los eyaculados.

Pasos para la colecta seminal

- El operario que se encuentra asistiendo a quien colecta, debe sostener al macho, por un lado, y por el otro lado se debe hacer la persona que realizara la colecta.
- Una vez el animal este próximo a realizar el salto de la obtención del eyaculado, el operario deberá sostener la vagina con una mano y colocarla frente al prepucio, justo detrás de los miembros anteriores y con la otra mano se realiza el redireccionamiento del pene, hacia la abertura de la vagina artificial.
- Al momento en el cual el pene tiene contacto con la vagina, ocurre el golpe de riñón, reflejado en la eyaculación del macho, inmediatamente, se debe inclinar la vagina y permitir que la muestra seminal caiga en el tubo colector.
- Luego de obtener el eyaculado del macho, inmediatamente se realiza una dilución 1:1 y se destina a sus procesos de análisis y posterior curva de congelación.

Apéndice C



Figura 5.1 Colecta seminal



Figura 5.2 Selenio



Figura 5.3 Preparación SeNps



Figura 5.6 Descongelación de Pajillas



Figura 5.7 Analisis en CASA

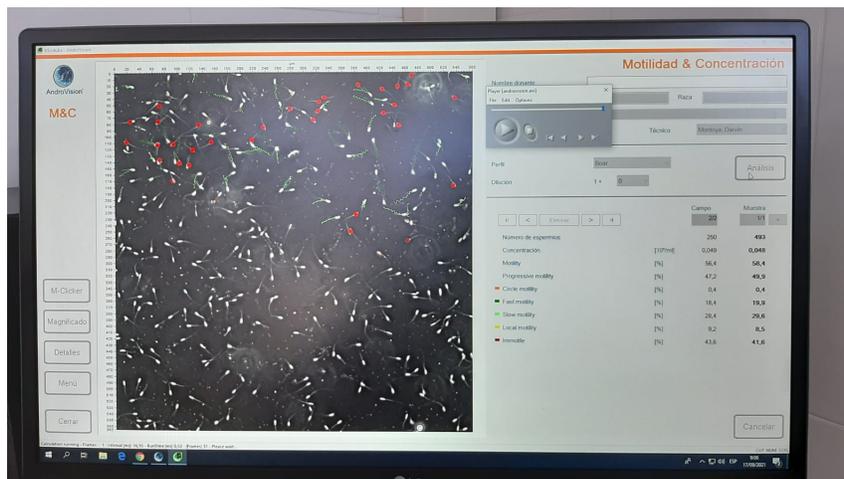


Figura 5.8 Preparacion de laboratorio

Apéndice D

5.3. Resultados gráficas

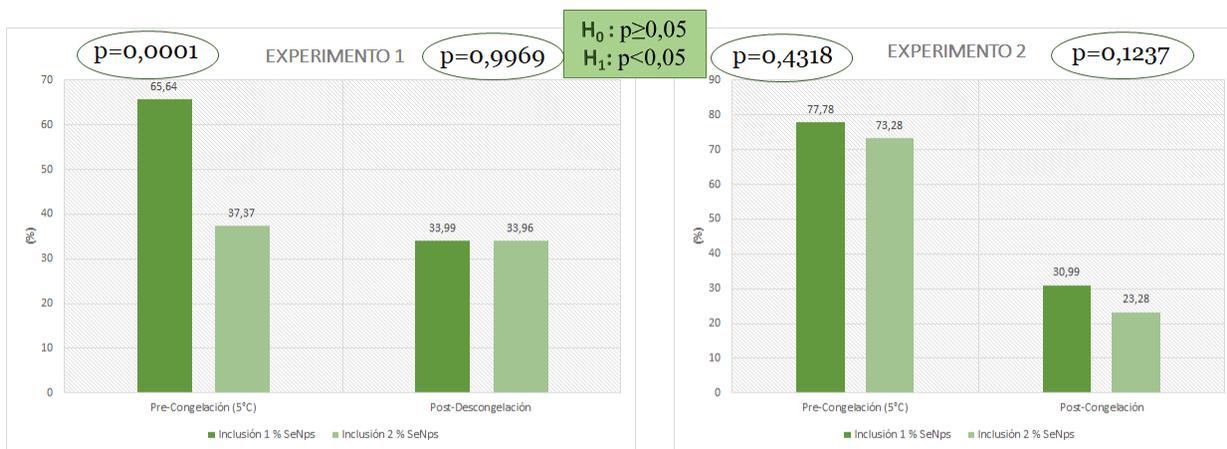


Figura 5.9 Resultados Variable Motilidad Total

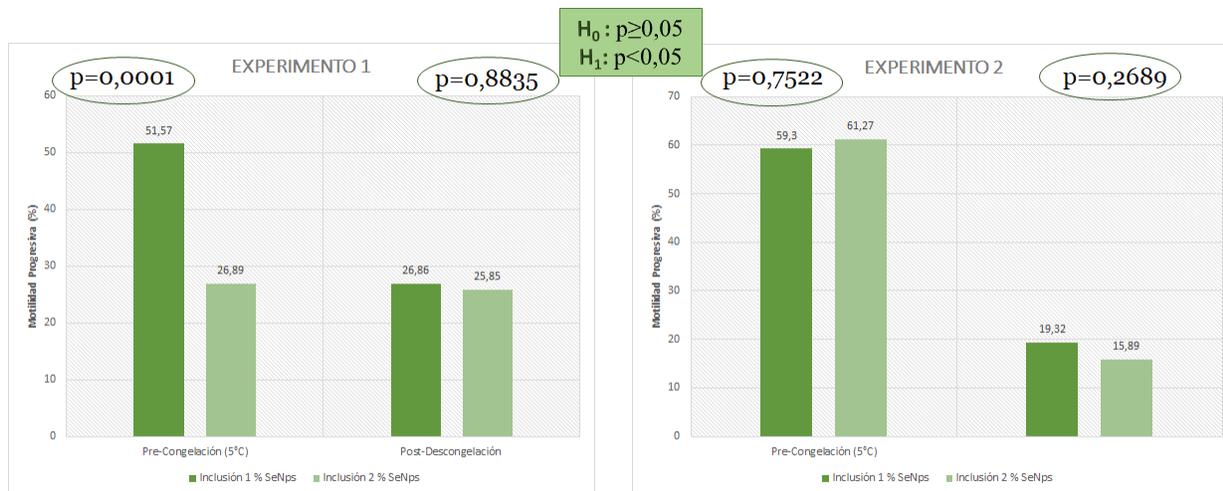


Figura 5.10 Resultados Variable Motilidad Progresiva

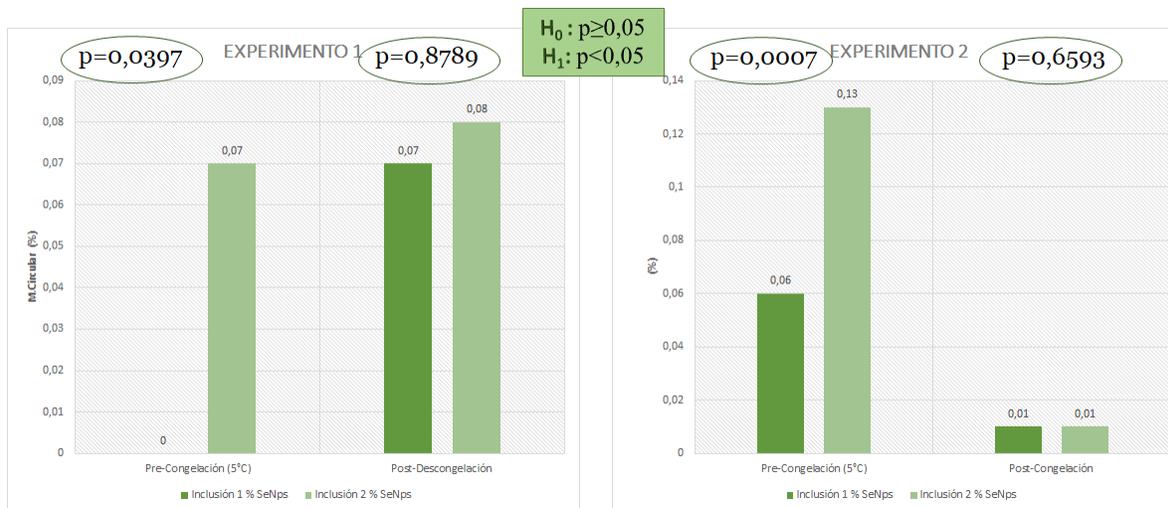


Figura 5.11 Resultados Variable Motilidad Circular

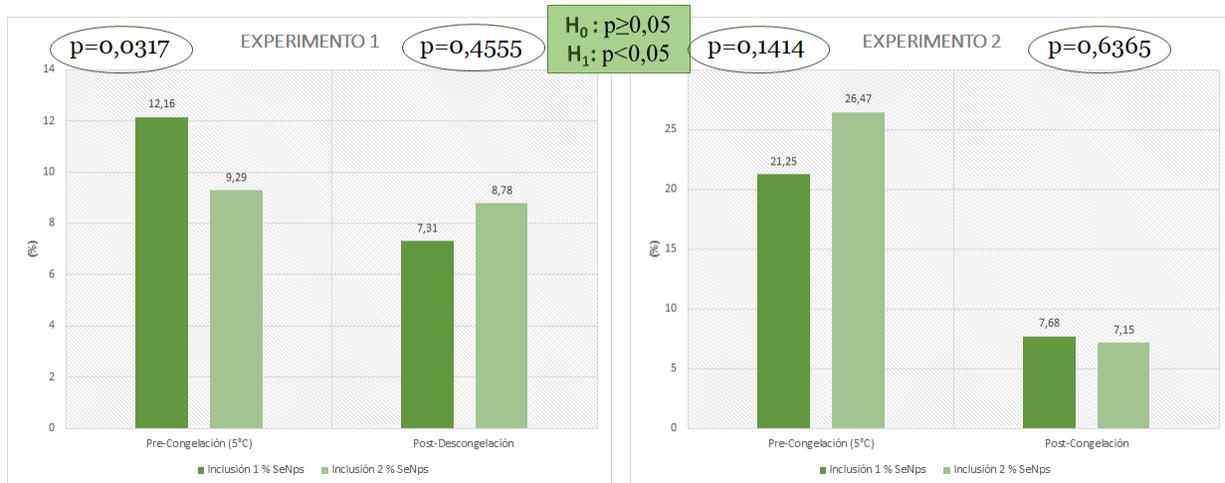


Figura 5.12 Resultados Variable Motilidad Rapida

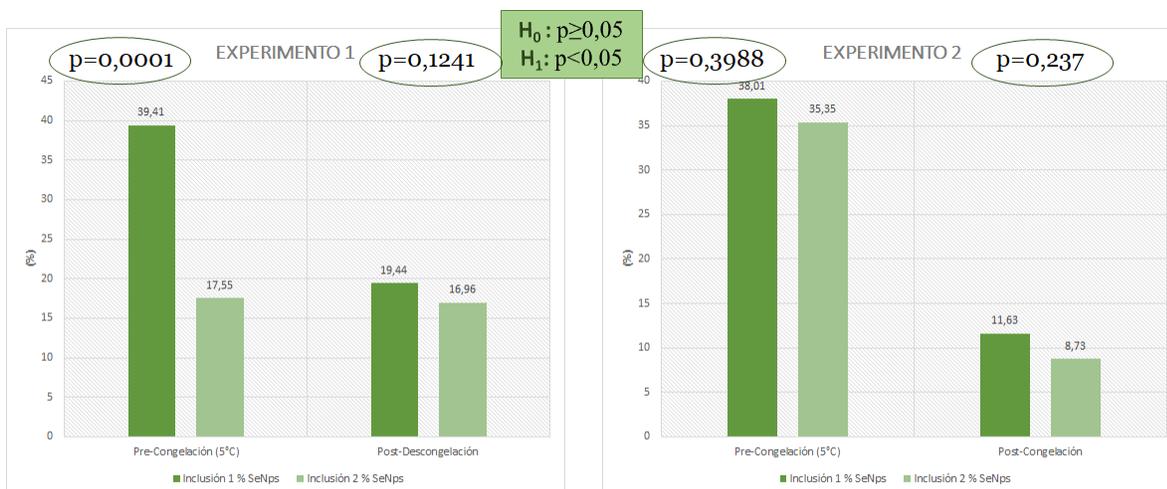


Figura 5.13 Resultados Variable Motilidad Lenta

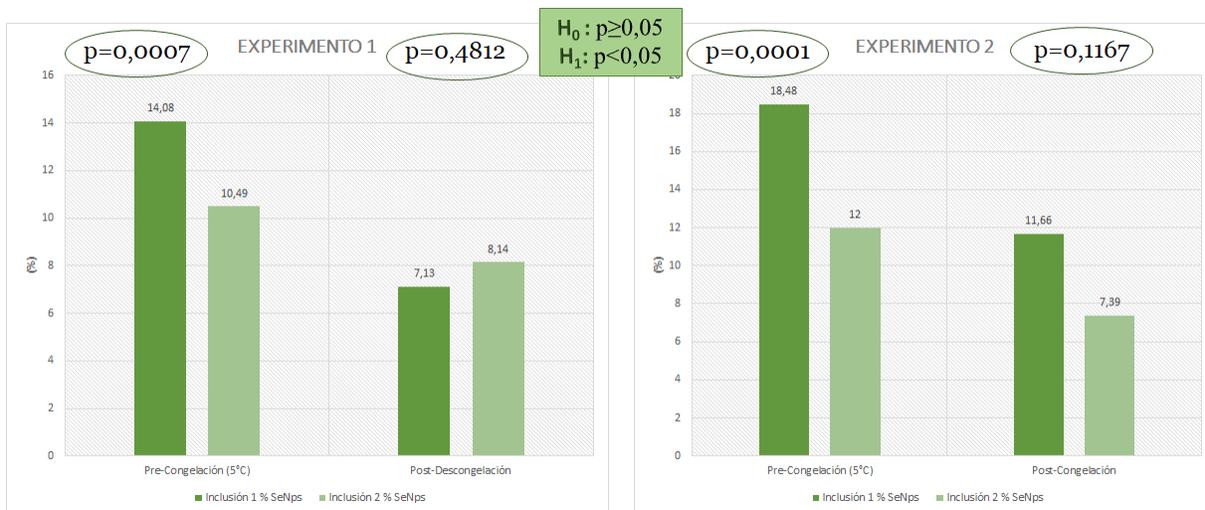


Figura 5.14 Resultados Variable Motilidad Local

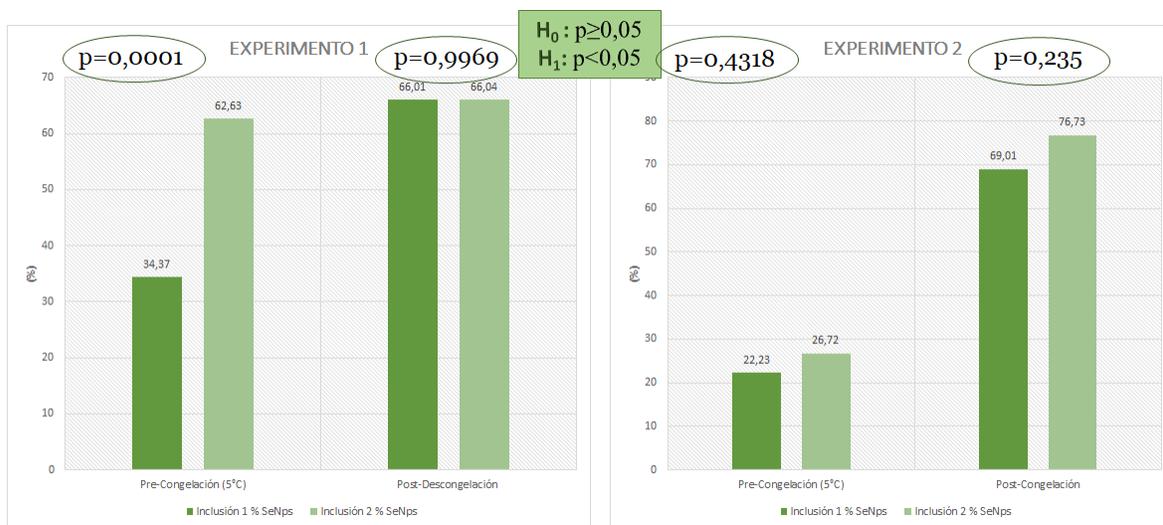


Figura 5.15 Resultados Variable Espermatozoides inmóviles