

UNIVERSIDAD
CIENTÍFICA
DEL SUR



Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“EFECTO DE LA ADICIÓN DE TEMPOL Y CATALASA AL
DILUTOR PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE
ALPACA”

Tesis para Optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

MUCHOTRIGO LUGO, DANIEL ARNALDO

Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

LIMA- PERÚ

2017

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 CARACTERÍSTICAS SEMINALES EN ALPACAS.....	4
2.2 CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN.....	5
2.2.1 CRIOPRESERVACIÓN Y SUS FUNDAMENTOS.....	5
2.2.2 DAÑO ESPERMÁTICO PRODUCTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN.....	6
2.2.3 CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN ALPACAS.....	7
2.3 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).....	8
2.3.1 EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LOS ROS EN ESPERMATOZOIDES.....	10
2.3.2 EFECTOS PATOLÓGICOS DE LOS ROS EN ESPERMATOZOIDES.....	11
2.4 ANTIOXIDANTES.....	12
2.4.1 ANTIOXIDANTES PRESENTES EN EL ESPERMATOZOIDE Y PLASMA SEMINAL.....	13
2.4.2 ANÁLOGOS DE SUPERÓXIDO DISMUTASA.....	18
2.4.3 USO DE ANTIOXIDANTES EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN.....	19

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
IV. RESULTADOS.....	25
V. DISCUSIÓN.....	29
VI. CONCLUSIONES.....	33
VII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	34
VIII. ANEXOS.....	41

RESUMEN

La criopreservación de semen en alpaca es una biotecnología reproductiva en desarrollo, debido a la baja supervivencia de los espermatozoides tras el congelamiento. Es conocido que el proceso de criopreservación involucra daños funcionales en los espermatozoides, dado los diversos tipos de estrés a los que son sometidos, considerándose al estrés oxidativo como uno de los más perjudiciales. El presente estudio busca reducir dicho efecto empleando dos enzimas antioxidantes, Tempol y Catalasa, con el fin de optimizar el proceso de criopreservación de semen en esta especie. Para realizar el proyecto se trabajó con 13 eyaculados provenientes de 4 machos; cada eyaculado se dividió en 4 grupos: control (criopreservación estándar), antioxidante Tempol (adicionando un análogo de Superóxido dismutasa), grupo Catalasa (adicionando catalasa al dilutor), y grupo interacción Catalasa-Tempol. Las características seminales que se evaluaron antes, durante y luego del congelamiento fueron: motilidad y producción de peróxidos lipídicos, este último expresado en ng/mL de malondialdehído a través del método del ácido tiobarbitúrico (TBA) modificado. El uso de los antioxidantes Tempol 1mM, Catalasa 50 ug/mL y su interacción como parte del dilutor para la criopreservación de espermatozoides de alpaca no presentaron diferencias significativas sobre la motilidad espermática (19.25 ± 11.11 , 22.66 ± 21.88 y 14.82 ± 12.95 respectivamente) con respecto al grupo control (19.04 ± 16.55). La producción de peróxidos lipídicos durante el proceso de criopreservación de semen de alpaca no se ve reducida al utilizar antioxidantes Tempol, Catalasa y su interacción (293.2 ng/mL, 240.3 ng/mL y 169.4 ng/mL respectivamente) con respecto al grupo control (338.4 ng/mL). En conclusión, el uso de antioxidantes no mejora la motilidad post descongelamiento ni reduce la producción de peróxidos lipídicos en los espermatozoides de alpaca.

Palabras clave: criopreservación de semen, espermatozoides, alpaca, superóxido dismutasa, catalasa, biotecnología reproductiva.

ABSTRACT

Cryopreservation of Alpaca semen is a reproductive biotechnology under development due to the low spermatozoa survival after freezing. It is well known that cryopreservation process involves functional damages in spermatozoa, being oxidative stress one of the most detrimental. The present study seeks to reduce the oxidative stress using two antioxidant enzymes, Tempol and Catalase, with the purpose to improve the semen cryopreservation process in this especie. To carry out this project, we worked with 13 ejaculates from 4 alpacas; each sample was divided into 4 groups: Control (standard cryopreservation), Tempol antioxidant (added superoxide dismutase analog), Catalase group and finally Catalase-Tempol interaction group. The seminal characteristics that were subject of evaluation before, during and after freezing were: motility and production of lipid peroxides, this last one was expressed in ng/mL of malondialdehyde through the modified tiobacbituric acid assay (TBA). The use of 1mM of Tempol antioxidant, 50 ug/mL of Catalase and their interaction as part of the protocols for spermatozoa cryopreservation did not show significant differences on sperm motility (19.25 ± 11.11 , 22.66 ± 21.88 and 14.82 ± 12.95 respectively) compared to control group (19.04 ± 16.55). Lipid peroxides production during the cryopreservation process of alpaca sperm was not reduced by the use of Tempol or Catalase antioxidant and neither their interaction (293.2 ng/mL, 240.3 ng/mL and 169.4 ng/mL respectively) compared to the control group (338.4 ng/mL). In conclusión, the use of antioxidants does not improve post-freezing motility, neither reduce lipid peroxide production in alpaca spermatozoa.

Key words: sperm cryopreservacion, spermatozoa, alpaca, superoxide dismutase, catalase, reproductive biotechnonology.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.- Especies reactivas de oxígeno radicales y no radicales.

Pág. 9

Cuadro 2.- Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción

Pág. 12

Cuadro 3.- Sistemas de defensa celular contra las especies reactivas de oxígeno.

Pág. 16, 17 y 18

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Valores seminales de alpaca obtenidos mediante vagina artificial

Pág. 25

Tabla 2.- Efecto de los tratamientos sobre la motilidad a los 5°C, 10°C y post descongelamiento

Pág. 26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Producción de Peróxidos Lipídicos (expresados en ng/mL de malondialdehído) en espermatozoides de semen fresco de alpaca (grupo control), al final de la curva de enfriamiento y luego del proceso de criopreservación.

Pág. 27

Figura 2.- Peroxidación lipídica (ng/mL malondialdehído) en los tratamientos de semen alpaca luego del proceso de criopreservación.

Pág. 28

I. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial en alpacas, y en otros camélidos sudamericanos (CSA), está restringida en su mayoría al uso de semen fresco (Bravo *et al.* 1997; Alarcón *et al.*, 2012), debido que la criopreservación de semen en estas especies aún se encuentra en desarrollo y los resultados obtenidos hasta la fecha no son alentadores. Diversos factores son los que imposibilitan la criopreservación de semen; entre ellos podemos nombrar la concentración espermática, el porcentaje de espermatozoides anormales y el escaso conocimiento sobre dilutores y crioprotectores al semen de CSA (Banda *et al.*, 2010).

Hasta la fecha, no se han reportado porcentajes de viabilidad y motilidad óptimos como para masificar la utilización de dicha biotecnología o realizar inseminaciones con semen congelado. Diversos estudios han obtenido motilidades post-descongelamiento que varían de 0 a 20% (Vaughan *et al.* 2003, Santiani *et al.*, 2005, 2012; Morton *et al.*, 2007, 2010). Se encontró un único reporte que indica que la motilidad post descongelamiento podría llegar sobre el 40% (Bravo *et al.*, 1996); sin embargo, estos resultados no han podido ser reproducidos.

El proceso de criopreservación produce daños funcionales en los espermatozoides debido al estrés oxidativo que involucra (Aitken *et al.*, 1993). Es durante la curva de enfriamiento que los espermatozoides son expuestos a un cambio gradual de temperatura, el cual produce shock. Se ha demostrado en humanos, bovinos y equinos, que los espermatozoides producen grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) como respuesta al shock térmico (Álvarez *et al.*, 1992; Bilodeau *et al.*, 2000; Ball *et al.*, 2001; Bansal *et al.*, 2011). Dentro de las especies reactivas de oxígeno más estudiadas se

tiene al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH) (Sikka *et al.*, 1995). En pequeñas cantidades, las especies reactivas de oxígeno juegan un papel esencial en la capacitación espermática, la hiperactivación de la motilidad, y la reacción de fusión con el oocito en humanos (Aitken *et al.*, 1993), toro (O' Flaherty *et al.*, 2003), caballos (Baumber *et al.*, 2003), verracos (Awda *et al.*, 2009) y carneros (Peris *et al.*, 2007); sin embargo en altas cantidades son perjudiciales para la célula espermática. Recientemente se ha demostrado que en muestras de espermatozoide de alpaca hay un incremento de anión superóxido y peróxido de hidrógeno durante el proceso de criopreservación (Trelles, 2015).

El estrés oxidativo ocurre cuando la producción de ROS excede la capacidad de los antioxidantes naturales del plasma seminal y del propio espermatozoide (Bansal *et al.*, 2011). Actualmente, la adición de antioxidantes a los dilutores durante la criopreservación, promueven efectos protectores en semen de toro, carnero, chivo, verraco, perro y humano; mejorando parámetros como motilidad espermática e integridad de membrana post descongelamiento (Bucak *et al.*, 2010). El Tempol, un análogo del superóxido dismutasa (SOD), mantiene la motilidad y viabilidad del semen refrigerado en el chivo (Mara *et al.*, 2007), carnero (Mara *et al.*, 2005) y pavo (Donoghue *et al.*, 1997). En la alpaca, el uso de Tempol y Tempo, otro análogo de SOD, obtuvieron motilidades superiores a los protocolos estándar (Santiani *et al.*, 2012). Por otro lado, el antioxidante Catalasa asociado a Trolox, antioxidante análogo a la vitamina E, reduce significativamente la producción de peróxidos lipídicos tras la criopreservación en el carnero (Maia *et al.*, 2010).

Bioquímicamente, estos dos antioxidantes, Tempol y la Catalasa, presentan una actividad biológica significativamente importante. El SOD metaboliza al anión superóxido (O_2^{-2}) formando dioxígeno (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mientras que la Catalasa convierte este peróxido de hidrógeno en dioxígeno y agua (H_2O) (Sikka *et al.*, 1995). Se ha demostrado el efecto del Tempol en el semen de alpaca (Santiani *et al.*, 2012) en cual evita la pérdida de la motilidad post descongelamiento; sin embargo, la interacción con la Catalasa aún no ha sido reportada. Ambos antioxidantes podrían prevenir los principales efectos nocivos de los ROS sobre la célula espermática como la disminución de la motilidad, la peroxidación lipídica y la fragmentación del ADN.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de Tempol y Catalasa de forma individual y combinada sobre la motilidad espermática y la producción de peróxidos lipídicos durante la criopreservación de semen de alpaca.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS SEMINALES EN ALPACAS

El color del semen de la alpaca es blanco lechoso a blanco cristalino (Hafez *et al.*, 2002). El volumen es muy variable según el método de recolección. En promedio, 3 mL de semen de alpaca se obtuvo con VA (vagina artificial) en colecciones de 10 minutos y hasta 12,5 mL de semen en 30 minutos de colecta (Sumar y Leyva 1981). Los valores de pH proporcionados por varios autores presentan cierta tendencia a la alcalinidad, variando de 7.15 a 8.8 (Mogrovejo, D. 1952), 7.5 (Fernández Baca y Calderón 1966) en alpaca y 7.4 en semen de llama (Aller *et al.*, 2003).

La concentración espermática también es influenciada por la técnica de colección, siendo la vagina artificial el método más usado y confiable con valores alrededor de 100 millones de espermatozoides por mL (Sumar y Leyva, 1981; Bravo *et al.*, 1997; Aller *et al.*, 2003; Santiani *et al.*, 2005). En su contraparte, la electroeyaculación aumenta mucho la variabilidad en la concentración que oscila entre 1 a 250 x10⁶ espermatozoides por mililitro (Hafez *et al.*, 2002).

El semen de alpaca y llama es muy viscoso, lo que dificulta mucho la valoración de su calidad. Debido a la alta viscosidad del plasma seminal no existe motilidad masal, la motilidad individual es descrita como oscilatoria y muy lenta (Raymundo *et al.*, 2004). Diferentes autores registran variados valores para la motilidad con un promedio de 52,4% y rango de 30.6 – 80.0% (Sumar y Leyva, 1981; Bravo *et al.*, 2002; Dávalos y Olazábal,

2002).

Se han descrito formas anormales de espermatozoides en alpaca, como gotas citoplasmáticas proximales y distales, encorvaduras de colas, microcabezas, cabezas gemelas, todas estas en semen colectado con vagina artificial. El porcentaje de espermatozoides anormales para el eyaculado de alpaca es de 25.2% en promedio, contando con un rango de 14 – 41% (Mogrovejo, 1952; Bravo *et al.*, 1997; Dávalos y Olazábal, 2002).

Todas estas características hacen del semen de alpaca un material particular al momento de manipularlo, sobre todo para someterlo a los procesos de criopreservación, donde los resultados post descongelamiento hasta la fecha no han sido del todo alentadores.

2.2 CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN

2.2.1 CRIOPRESERVACIÓN Y SUS FUNDAMENTOS

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas. El comportamiento de la membrana plasmática durante la congelación y descongelación definirá los índices de supervivencia de la célula congelada, debido a que estos son los periodos críticos de supervivencia celular (Ávila-Portillo 2006).

La membrana plasmática de la célula eucariota, independientemente de su composición, tiene una estructura organizada según el modelo de mosaico fluido (Singer y Nicholson 1972), composición que comprende lípidos, proteínas y un pequeño porcentaje de carbohidratos. Los lípidos de membrana son los que determinan la fluidez y resistencia durante los procesos de criopreservación, por tanto rigen el transporte de moléculas, clave para la supervivencia celular post descongelamiento (Ávila - Portillo 2006).

Cuando la temperatura desciende de 10°C a -16°C, los lípidos pasan de un estado líquido a uno sólido, perdiendo inevitablemente fluidez, alterando sus funciones de membrana y causando fragilidad celular. Durante la deshidratación celular, que tiene lugar en el proceso de congelación, se puede presentar una pérdida de lípidos el cual afecta la integridad de la membrana debido a la disminución de la capacidad de expansión durante

la rehidratación al volver a condiciones isotónicas (o normales) (Seidel, 2006; Ávila-Portillo 2006).

Los espermatozoides de los mamíferos domésticos no sobreviven el rápido enfriamiento hacia los 0°C debido al shock de frío. Es por ello que siempre la muestra de espermatozoides requiere ser protegida durante su procesamiento hasta que es añadido el crioprotector. La membrana plasmática alterada, debido al enfriamiento o al congelamiento, favorece la pérdida de cationes y enzimas de los espermatozoides, lo cual explica que el shock de frío deprime irreversiblemente la motilidad y la actividad metabólica espermática (White, 1993).

Los productos criopreservados se deben almacenar a temperaturas desde -133°C (vapores de nitrógeno líquido) a -196°C (nitrógeno líquido). A estas temperaturas no existen fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo las reacciones químicas y por tanto las dificultades de la congelación no derivan de la permanencia a temperaturas bajas sino de los procesos de congelación y descongelación (Loken *et al.*, 2005).

2.2.2 DAÑO ESPERMÁTICO PRODUCTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN

La mayoría del daño que produce la criopreservación depende la estabilidad estructural de la membrana plasmática del espermatozoide (De Leeuw *et al.*, 1993). La susceptibilidad de la membrana plasmática al pasar por la transición lipídica durante el enfriamiento está inversamente relacionada a la proporción de colesterol presente. También está involucrado la cantidad de ácidos grasos insaturados sobre saturado, lo cual la hace más susceptible a efectos deletéreos al pasar por temperaturas de enfriamiento (Bailey *et al.*, 2000). Las especies se pueden dividir en dos grupos según la cantidad de ácidos grasos insaturados (AGI) que poseen en la membrana plasmática de sus espermatozoides; aquellos con altos niveles de AGI como en el toro, oveja y cerdo son susceptibles a los cambios de temperatura; en cambio el conejo, perro y humanos poseen ratios menores de AGI haciéndolos más resistentes a las temperaturas bajas (Bailey *et al.*, 2000).

La membrana plasmática espermática sufre daños debido a los cambios de temperatura y efectos osmóticos que la criopreservación genera; el congelar y descongelar induce grandes alteraciones en el volumen de agua celular, el cual confiere considerable estrés

mecánico. (Hammerstedt *et al* 1990). En investigaciones que simulan el ciclo de congelamiento y descongelamiento, los espermatozoides fueron sometidos a soluciones salinas altas y devueltas a una solución de equilibrio osmótico, obteniendo como resultado una permeabilización significativa de la membrana espermática. Ambos, el congelamiento y el descongelamiento, inducen alteraciones severas en el volumen de agua celular, demostrando el estrés mecánico considerable que confiere sobre las membranas celulares (Hammerstedt *et al*, 1990).

La formación de hielo intracelular y la consecuente deshidratación celular de los espermatozoides criopreservados dependen de la velocidad de congelamiento al que son sometidos (Kumar *et al.*, 2003). Por ello es necesario conocer la velocidad óptima de congelamiento, aquella suficientemente lenta para prevenir la formación de hielo intracelular, pero rápida para minimizar los efectos de la exposición prolongada a un medio extracelular hiperosmótico (Holt, 2000).

Las transiciones de fase y otras modificaciones ultraestructurales de la membrana plasmática durante el enfriamiento y el recalentamiento podrían jugar un papel importante en la pobre fertilidad de los espermatozoides criopreservados. La reorganización de los lípidos de membrana altera las interacciones entre lípidos-proteínas y por tanto no habrá función normal adecuada (Parks y Graham, 1992). Generalmente se asume que un 40 a 50% de los espermatozoides no sobreviven al proceso de congelamiento-descongelamiento. Por lo tanto el semen congelado siempre va a ser de menor calidad que el semen fresco.

2.2.3 CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS EN ALPACAS

La criopreservación de semen en esta especie facilitaría la inseminación artificial; sin embargo, esta biotecnología hasta la fecha no ha tenido alentadores resultados debido, fundamentalmente, a las motilidades post-descongelamiento poco satisfactorias (Santiani *et al.*, 2005, 2012; Morton *et al.*, 2007, 2010).

Algunas de las causas por las que la criopreservación de semen en la alpaca no ha sido tan exitosa es debido a las características reproductivas de la especie: su cópula en recumbencia ventral y la eyaculación continua por hasta 40 minutos (Bravo *et al.*, 1997), el eyaculado altamente viscoso y su concentración variable, hace difícil el manejo, su dilución y por tanto su criopreservación (Bravo *et al.*, 2000).

Reportes de criopreservación en esta especie muestran el impacto que tiene el congelamiento sobre el parámetro de motilidad post-descongelamiento. Motilidades de semen fresco de alpaca que van desde 53% descienden hasta 20% post-descongelamiento (Santiani *et al.*, 2012) y 15% (González *et al.*, 2008).

Una alternativa, tratando de evitar posibles complicaciones de la viscosidad seminal, es la de usar espermatozoides colectados de epidídimo; motilidades de 31% y 52% descienden hasta 17% y 20.5% post-descongelamiento respectivamente (Banda *et al.*, 2010; Morton *et al.*, 2010). En llamas, Aller *et al.*, 2003 obtiene motilidades post-descongelamiento de un 20%, las cuales partieron de un promedio de 54% en semen fresco.

Este descenso en la motilidad es inevitable, y diversos autores tratan de contrarrestar dicho efecto utilizando diversos protocolos de criopreservación, variando el crioprotector y dilutores. Los agentes crioprotectores son sustancias hidrosolubles de baja toxicidad que permiten disminuir el efecto del estrés osmótico durante la criopreservación (Ávila-Portillo, 2006; Santiani *et al.*, 2012), reemplazan el líquido intracelular del espermatozoide evitando así la rápida formación de cristales de hielo durante la criopreservación. En diversos estudios, el etilenglicol y la lactosa fueron los más eficientes durante el congelamiento de semen de alpaca (Santiani *et al.*, 2005) obteniendo 20% post descongelamiento; así mismo Morton *et al.*, 2010 trabajó con espermatozoides de epidídimo y obtuvo un 20.5% de motilidad post descongelamiento al usar glicerol 4% y lactosa.

Por otro lado, la adición de antioxidantes al semen de alpaca (Santiani *et al.*, 2012) logró motilidades superiores a la criopreservación estándar (dilutor a base de leche, yema de huevo y fructosa) sin antioxidante (19.63% y 22.57% sobre 10.62%), favoreciendo de este modo, la prevención de la pérdida de motilidad, integridad funcional de membrana durante la criopreservación de semen de alpaca.

2.3. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) derivan molecularmente del oxígeno, juegan un rol fisiológico importante, pero al mismo tiempo pueden llegar a desempeñar efectos tóxicos. Los ROS son productos intermediarios de la señalización enzimática inter e intracelular. Entre los más comunes destacan el anión

superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot), y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Bansal *et al.*, 2010; Moreira da Silva *et al.*, 2010). Existen otras especies reactivas de oxígeno, algunos poseen electrones apareados, y no apareados; de ahí que se prefiera usar el término de ROS.

Las especies reactivas de oxígeno y radicales libres no son términos sinónimos; a diferencia de los radicales libres de oxígeno, los ROS representan un amplio espectro de especies incluyendo derivados del oxígeno no radicales capaces de iniciar y propagar el daño oxidativo tisular (Villegas *et al.*, 2004).

Cuadro 1.- Especies reactivas de oxígeno radicales y no radicales

Radicales	No radicales
Superóxido	Peróxido de hidrógeno
Radical hidroxilo	Hidroperóxido lípido
Radical hidroperoxilo	Complejos hierro-oxígeno
Radical lípido	Hipoclorito
Radical peroxilo lípido	
Radical alcohoxilo lípido	
Dióxido de nitrógeno	
óxido de nitrógeno	
Radical tiól	
Radical proteína	

(Papas, 1999)

El anión superóxido (O_2^-) es un radical libre con reactividad intermedia, formado cuando una molécula de oxígeno (O_2) adquiere un electrón adicional, dejándola con solo un electrón impar. En la mitocondria, el anión superóxido es continuamente formado, la cantidad producida depende del flujo de oxígeno dentro de la mitocondria (Morieira da Silva *et al.*, 2010). Este radical es capaz de difundirse y reaccionar con moléculas específicas. En general, el daño causado por el O_2^- , es debido a su conversión hacia especies más reactivas. El O_2^- se dismuta a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la subsiguiente descomposición a radicales hidroxilo (OH^\cdot) serían los responsables de su efecto biológico (Fuchs *et al.*, 1997).

El radical hidroxilo (OH^\cdot) es de vida corta, pero es una de las moléculas derivadas del oxígeno más reactivas. Su reactividad es tan grande, que cuando se forma en sistemas biológicos, los radicales reaccionan inmediatamente con cualquier molécula vecina

(Fuchs *et al.*, 1997). Este radical puede ser formado del anión superóxido y el peróxido de hidrógeno a través de la reacción Harber-Weiss (Morieira da Silva *et al.*, 2010).

Como ya se mencionó, la producción incontrolada de los ROS que exceda la capacidad antioxidante trae como consecuencia el estrés oxidativo. Todo componente celular incluyendo lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y azúcares son blancos potenciales de dicho proceso (Bansal *et al.*, 2010).

Los espermatozoides son particularmente vulnerables al estrés oxidativo debido a que presentan grandes cantidades de ácidos grasos polinsaturados en su membrana, particularmente del ácido docosahexanoico (Koopers *et al.*, 2008). Además, el limitado volumen y área reducida del citoplasma, restringe la disponibilidad de enzimas antioxidativas intracelulares para contrarrestar dicho estrés (Koopers *et al.*, 2008).

En semen bovino, los ROS son generados principalmente por espermatozoides muertos. En el hombre, dos de las principales fuentes de ROS son los espermatozoides inmaduros y la presencia de leucocitos; son los neutrófilos y los macrófagos los generadores excesivos de ROS que conllevan a la disfunción espermática y consecuente infertilidad (Bansal, *et al.*, 2010).

2.3.1 EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LOS ROS EN ESPERMATOZOIDEOS

En el semen, existen fundamentalmente dos fuentes generadoras de ROS: los espermatozoides y los leucocitos presentes en el líquido espermático. Los neutrófilos emplean la producción de ROS para destruir los patógenos; sin embargo en humanos, los ROS en exceso llevan a casos de infertilidad debido a infecciones agudas o crónicas a nivel reproductivo (Aitken *et al.*, 1994).

La segunda fuente de ROS es a partir de la respiración celular en las mitocondrias de los espermatozoides. La producción baja y controlada de ROS es esencial para la activación espermática, para la señalización celular y fertilización del oocito (De Lamirande *et al.*, 2009; Bansal *et al.*, 2010). Los espermatozoides están equipados para cumplir la función de fertilizar un oocito; sin embargo, no son fértiles luego de haber sido eyaculados. Es en el tracto genital femenino que completan su maduración, esta comprende transformaciones que les permitan unirse a la zona pelúcida alrededor del oocito; la reacción acrosomal resulta del contacto de enzimas proteolíticas que le permiten al

espermatozoide penetrar la zona pelúcida. La capacitación espermática está relacionada a eventos celulares como el flujo de calcio, el incremento de la fluidez de membrana, la elevación del pH intracelular y el AMPc, la fosforilación de proteínas, entre otros. Todos estos procesos son iniciadas con la producción de ROS a partir de los espermatozoides (De Lamirande *et al.*, 2009).

La estimulación de capacitación espermática por los ROS también es controlada y prevenida por los devoradores de ROS como la superóxido dismutasa (SOD para el anión superóxido) y la Catalasa (para el Peróxido de hidrógeno), hallados en el humano, bovino y ratón (De Lamirande *et al.*, 2009). Es por ello esencial mantener un nivel de ROS adecuado para la función espermática.

2.3.2 EFECTOS PATOLÓGICOS DE LOS ROS EN ESPERMATOZOIDES

Los ROS causan efectos adversos en la membrana plasmática del espermatozoide, en el DNA y en sus procesos fisiológicos, afectando la calidad del mismo. La parte inicial y la porción media del espermatozoide están cubiertas por mitocondrias que generan energía gastando las fuentes de ATP intracelular (Bansal *et al.*, 2010). El excesivo contenido de ROS reduce la motilidad y la capacidad de fertilización, asimismo el shock de frío, producto de la manipulación, cuenta como un estrés adicional, ya que modifica la membrana espermática afectando su fusión al gameto femenino (Bansal, *et al.*, 2010).

La peroxidación lipídica (PL) de la membrana es considerada el mecanismo clave de daño espermático inducido por los ROS (Bansal *et al.*, 2010; Sikka *et al.*, 1996). La PL es un indicador de estrés oxidativo en células y tejidos. Los peróxidos lipídicos, derivados de ácidos grasos polinsaturados, son inestables y se descomponen para formar una serie de compuestos complejos. Al modificar la fluidez y alterar la permeabilidad de la membrana conducen a la célula a un proceso de deterioro y muerte (Sikka *et al.*, 1996).

Asimismo, los espermatozoides de mamíferos presentan abundantes ácidos grasos polinsaturados, es por ello que son susceptibles al ataque de los ROS, lo cual resulta en la disminución de la motilidad, presuntamente debido a la rápida pérdida de ATP intracelular. Esto trae como consecuencia daño en el axonema, disminución de la viabilidad espermática y aumento de los defectos morfológicos en la porción media, produciendo efectos deletéreos sobre la capacitación espermática y la reacción acrosomal (Álvarez *et al.*, 1992).

En diversos estudios, los espermatozoides de mamífero que son mantenidos in vitro con exceso de O₂ sufren una peroxidación lipídica que les causa daño en la membrana, reduce su movilidad y subsecuentemente su fertilidad (Donoghue, 1997). En el equino, el uso del semen almacenado en refrigeración se ha visto limitado debido a la baja capacidad de fecundación. Una de las causas de la disminución en la fertilidad es la peroxidación de los lípidos de la membrana de los espermatozoides, pues el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados los hace sumamente susceptibles (Aurich *et al.*, 1997).

2.4 ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es cualquier sustancia que está presente en bajas concentraciones con respecto a un sustrato oxidable, y que posee la capacidad de reducir o detener la oxidación de dicho sustrato (Halliwell *et al.*, 1989). Como cualquier sustrato oxidable se puede considerar una variedad de moléculas orgánicas e inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN (Venereo *et al.*, 2002).

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar o interactuar más rápido con los radicales libres o los ROS que con el resto de moléculas presentes en un determinado microambiente como la membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular (Venereo *et al.*, 2002). Según su sitio de acción tenemos:

Cuadro 2.- Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción

INTRACELULAR	MEMBRANA	EXTRACELULAR
Superóxido dismutasa (SOD)	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactoferrinas
DT-deafarasa		Albúminas
GSH (Glutation reducido)		Haptoglobinas
Proteínas que ligan metales		Vitamina C
Sistemas proteolíticos		Ácido úrico
Vitamina C		Vitamina E

Venereo et al., 2002 Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes.

Los antioxidantes se pueden clasificar en dos grupos, antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los primeros son también conocidos como antioxidantes naturales; neutralizan el exceso de ROS y previenen el daño celular. Dentro de este grupo encontramos al superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutathione peroxidasa (GPx) y al glutathione reductasa (GR). Los antioxidantes no enzimáticos, también son conocidos como antioxidantes sintéticos o de suplemento dietético; su funcionamiento depende del consumo en la dieta de antioxidantes, vitaminas y minerales como la vitamina C, vitamina E, Zinc, taurina, hipotaurina y glutathione (Bansal *et al.*, 2010).

2.4.1 ANTIOXIDANTES PRESENTES EN EL ESPERMATOZOIDE Y PLASMA SEMINAL

Los espermatozoides son protegidos por una variedad de antioxidantes presentes dentro de él y en el plasma seminal, lo cual les ayuda prevenir los daños oxidativos. Los antioxidantes, al reducir el estrés oxidativo, podrían mejorar la motilidad espermática, lo que favorecería al tratamiento de infertilidad en el macho (Bansal *et al.*, 2010).

Antioxidantes enzimáticos

Superóxido Dismutasa (SOD)

Conocida también como una metaloenzima especializada, esta cataliza la dismutación del radical anión superóxido para dar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, de acuerdo a la reacción:



En las células de los organismos eucarióticos, existen dos tipos de superóxido dismutasa: una es citoplásmica y contiene un átomo de Cu²⁺ y uno de Zn²⁺ en su sitio activo. El átomo de cobre es reducido a Cu⁺ y reoxidado a Cu²⁺ durante el ciclo catalítico. La otra es mitocondrial y contiene Mn³⁺ en su sitio activo. (Rodríguez *et al.*, 1997; Fridovich, 1978).

El sistema protector contra la peroxidación de los espermatozoides en la mayoría de las especies de mamíferos depende de la actividad de la SOD. La actividad principal de esta enzima es la de eliminar al radical anión superóxido y perhidroxilo dando origen la formación de agua oxigenada. En el espermatozoide, la peroxidación de los lípidos se realiza en relación inversa a la actividad de la SOD (Rodríguez *et al.*, 1997).

En el espermatozoide, la actividad de la SOD dependiente de Cu y Zn (citosólica) constituye el 95% de la actividad celular de esta enzima. De esta manera la incubación aeróbica del espermatozoide induce la acumulación progresiva de los radicales tóxicos, efecto que se verá potenciado por la inhibición concomitante de la SOD. En otros sistemas celulares de los mamíferos, la presencia de la catalasa y de la SOD mitocondrial, protegen eficazmente a la SOD citosólica contra sus inhibidores, evitando que el proceso de superoxidación lleve a la muerte celular (Rodríguez *et al.*, 1997).

Catalasa

Es una hemoproteína tetramérica que dismuta el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno:



La catalasa se encuentra principalmente en los peroxisomas, así también se ubica en el citosol y en neutrófilos en humanos (Petra Pietarinen-Runtti *et al.*, 2000). La acción combinada de la SOD y la catalasa evitan la formación del oxidante más tóxico, el radical hidroxilo.

Se ha logrado determinar la presencia de catalasa en semen equino (Ball *et al.*, 2000), ovino, conejo y humano (Ochsendorf *et al.*, 1997). Caso contrario ocurre en el perro; sin embargo, la adición de este antioxidante influyó de manera positiva los parámetros post-descongelamiento en semen canino (A. Michael *et al.*, 2007).

Glutation y glutation peroxidasa

Las peroxidases, catalizan la reducción de H₂O₂ por diversos donadores de electrones. En los mamíferos, la glutation-peroxidasa (GP), enzima citoplasmática que contiene selenio, es la más importante ya que cataliza la siguiente reacción:



Esta enzima es importante en la descomposición de peróxido de hidrógeno y de algunos lipoperóxidos, resultando la formación de H₂O y GSSG (Glutation oxidado). Por otro lado, la glutation reductasa convierte el glutation oxidado (GSSG) en glutation reducido (GSH) con intervención del NADPH, impidiendo así que se agoten las reservas de GSH (Rodríguez *et al.*, 1997).

En las mitocondrias de espermatozoides de rata, se ha demostrado que la glutatión peroxidasa juega un papel significativo en la reducción de radicales peróxidos y que mantiene la motilidad espermática (Sikka *et al.*, 1996). El ratio alto entre GSH/GSSG ayudaría a los espermatozoides a combatir el estrés oxidativo. Las enzimas de GSH se encuentran continuamente bajo investigación, ya que se le relaciona a casos de infertilidad en humano (Sikka *et al.*, 1996)

Antioxidantes no enzimáticos

También conocidos como antioxidantes sintéticos o suplementos dietarios. Son influenciados por el consumo de antioxidantes, vitaminas y minerales en la dieta, siendo los más representativos la vitamina E, la vitamina C, zinc, taurina, hipotaurina, etc. (Bansal *et al.*, 2010).

La vitamina E (a tocoferol) es el principal antioxidante soluble en lípidos. Su forma más activa como antioxidante es la de alfa tocoferol. Previene el rompimiento de la cadena, esto es, bloquea a los hidroperóxidos lipídicos que propagan la formación de radicales peróxido en la membrana. Por otra parte, reduce el anión superóxido, el radical hidroxilo y al singlete de oxígeno (Rodríguez *et al.*, 1997). La administración oral de la vitamina E mejora la motilidad espermática en los humanos. Esta mejora está ligada a la disminución de la peroxidación lipídica, lo que sugiere que la vitamina E juega un papel importante como consumidor de especies reactivas de oxígeno, reductor de la peroxidación lipídica y por tanto protector espermático (Suleiman *et al.*, 1996).

La vitamina C es un antioxidante soluble en agua y junto con la vitamina E atrapa los radicales libres así como al singlete de oxígeno. Dentro de sus cualidad tenemos que regenera la forma oxidante y reducida de la vitamina E y que en su forma de ácido ascórbico sirve tanto como antioxidante como prooxidante (Rodríguez *et al.*, 1997). Estudios en semen refrigerado de perro, la adición de vitamina C al dilutor no tuvo efecto sobre los parámetros seminales, debido a que tanto en perro como en gato, producen una cantidad adecuada de esta vitamina (Michael *et al.*, 2009).

Cuadro 3.- Sistemas de defensa celular contra las especies reactivas de oxígeno.

CATEGORÍA	ESTRUCTURA	LOCALIZACIÓN	FUNCIONES
SISTEMAS ENZIMÁTICOS			
Superóxido dismutasa	Cu/Zn SOD	Principalmente en citosol, menor proporción en el núcleo.	Cataliza la dismutación de O ²⁻ a H ₂ O ₂
	Mn SOD	Principalmente en la mitocondria.	
	Cu SOD	Principalmente en el plasma.	
Catalasa	Tetramética hemoproteína	Peroxisomas	Cataliza la dismutación de H ₂ O ₂
GSH redox GSH peroxidasa	Selenoproteína	Principalmente en el citosol y mitocondria.	Cataliza la reducción de H ₂ O ₂ y otros hidroperóxidos
SISTEMAS NO ENZIMÁTICOS			
A) Compuestos solubles en lípidos			
Vitamina E	Soluble en grasa	Lípidos de membrana, fluidos extracelulares	Convierte el O ₂ ·, ·OH y radicales peróxido a formas menos reactivas. Rompe las reacciones en cadena de la lipoperoxidación

B-caroteno	Precursos metabólico de la vitamina A	Membranas tisulares	Elimina O ₂ ·. reacciona directamente con los radicales peroxilo
Bilirrubina	Producto del catabolismo de la hemoproteína	En sangre y tejidos	Antioxidante que rompe la cadena al reaccionar con ROO-
B) compuestos solubles en agua			
Vitamina C	Vitamina hidrosoluble	Amplia distribución en fluidos intracelulares y extracelulares	Elimina directamente O ₂ · Y OH· Neutraliza los oxidantes de los neutrófilos activados. Contribuye a la regeneración de la vitamina E
Ácido úrico	Base purificada oxidada	Amplia distribución	Elimina O ₂ · Y OH· y radicales peroxilo
Glucosa	Carbohidratos	Amplia distribución	Elimina -OH
Cisteína	Aminoácidos	Amplia distribución	Reduce varios compuestos orgánicos al donar electrones de los grupos sulfidriilo

GSH	Tripéptidos	En grandes cantidades intracelularmente	Reacciona directamente con O ²⁻ Y -OH y radicales libres orgánicos
------------	-------------	---	---

Tomado de Yu *et al.*, 1994 (Rodríguez et al., 1997)

2.4.2 ANÁLOGOS DE SUPERÓXIDO DISMUTASA

Para obtener una protección frente a los efectos perniciosos de los radicales superóxido y para evitar y tratar estados patológicos que implican o tienen como causa el estrés oxidativo, se han generado los análogos sintéticos de superóxido dismutasa, enzimas de bajo peso molecular que mimetizan la acción de este antioxidante natural.

Como sabemos, el radical anión superóxido se forma durante la respiración celular, por células inflamatorias, células endoteliales y en el metabolismo del ácido araquidónico (Salvemini *et al.*, 2002). El desarrollo de los análogos de SOD nace del estudio que involucra al anión superóxido en los procesos inflamatorios, es así que se han detectado niveles altos de este radical en muchas condiciones patológicas como en casos de isquemia, daños por radiación, aterosclerosis, entre otros (Salvemini *et al.*, 2002). De la misma forma, el anión superóxido actúa como pro-inflamatorio en los procesos de peroxidación lipídica, daño del material genético e inactivación del óxido nítrico a través de la saturación del superóxido dismutasa endógeno (Salvemini *et al.*, 2002).

Algunas de las propiedades que debe poseer un análogo de SOD es que deben poseer una acción catalítica activa equivalente (o superior) a la del SOD endógeno, debe ser una molécula pequeña que penetre en las células, debe tener selectividad al superóxido, también ser estable y no desactivarse por peroxinitritos y sobre todo proactiva en los modelos de inflamación aguda (Salvemini *et al.*, 2002).

En 1990 se descubrió que el Tempo (2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil) y Tempol (4-hidroxi 2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil), radicales nitroxido estables, tenían actividad similar a la SOD (Mitchell *et al.*, 1990). El Tempol es ampliamente usado debido a su

actividad tanto intra como extracelular para combatir los radicales libres, lo que resulta en una protección celular sobresaliente. Es por ello que el Tempol es usado en tratamiento relacionados al estrés oxidativo, recientes estudios han indicado que el tempol puede ser usado como antioxidantes en experimentos con animales para prevenir una variedad de enfermedades producidas por los ROS como los daños de reperfusión e isquemia, en la inflamación, el shock y disfunción eréctil causada por diabetes mellitus (Kawakami *et al.*, 2009).

En conclusión los análogos o miméticos del SOD deben ser lo bastante estables como para retener el metal ligado (es decir, Mn) en presencia de los múltiples agentes quelantes presentes en los sistemas vivientes, también lo bastante activos para que dosis razonables puedan servir para aumentar significativamente la actividad SOD total en los espacios extracelulares, que sean capaces de adherirse a las superficies celulares o a los elementos matriciales extracelulares (por ejemplo, colágeno) cuando la protección contra las fuentes extracelulares de O²⁻ sea necesaria, y sean de baja toxicidad.

2.4.3 USO DE ANTIOXIDANTES EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN

Estudios recientes demuestran que el suplemento de antioxidantes a dilutores usados para criopreservación mejoraron los parámetros seminales como motilidad e integridad de membrana post-descongelamiento en muestras de toro, carnero, berraco, etc (Bansal *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2010., Santiani, 2012).

A diferencia de las células somáticas, en el cual la acción de defensa de los antioxidantes proviene de enzimas citoplasmáticas como la catalasa, el SOD y el glutatión peroxidasa, el espermatozoide pierde mucho de su citoplasma inmediatamente después de la maduración (la criopreservación como inductor) y por tanto pierde su protección (Santiani *et al.*, 2010).

Dentro de los antioxidantes enzimáticos, el SOD ha demostrado proteger al espermatozoide de la toxicidad del oxígeno y frente a la peroxidación lipídica (inducida por la criopreservación tras el estrés oxidativo producido). Asimismo, la catalasa juega un papel importante sobre el envejecimiento celular así como en el control del estrés oxidativo celular tras el efecto del peróxido de hidrógeno (Bansal *et al.*, 2010). Se ha demostrado que la adición de catalasa mejora la motilidad en espermatozoides bovinos (Bilodeau *et al.*, 2002).

En espermatozoides refrigerados de ovinos y equinos, el Tempo y Tempol han sido utilizados para prevenir la pérdida de motilidad y viabilidad espermática (Mara *et al.*, 2005; Ball *et al.*, 2001), así como durante el congelamiento de espermatozoides de ovino (Santiani, 2003) obteniéndose resultados positivos. Por otro lado, se obtuvo un resultado diferente al usar concentraciones mayores a 0.2 mM de Tempo y Tempol (Foote *et al.*, 2002), la motilidad disminuyó significativamente durante la criopreservación de semen bovino. Cabe resaltar que la adición del antioxidante fue al finalizar la curva de enfriamiento (5°C) debido a la teoría que su adición en conjunto al dilutor podría tener un efecto tóxico debido a las concentraciones bajas de ROS a los 35°C (Santiani, 2003).

En la criopreservación de semen de alpaca, la adición de Tempo y Tempol a los 5°C de la curva de enfriamiento, se obtuvieron resultados significativamente superiores en la motilidad post-descongelamiento respecto al control, así como mayores porcentajes de integridad funcional de membrana y de integridad del ADN espermático (Santiani, 2012).

Teniendo en cuenta que el Tempo y el Tempol son nitróxidos con actividad similar al SOD, es decir, reaccionan eliminando al anión superóxido al transformarlo en peróxido de hidrógeno (Bansal, *et al.*, 2010); este último compuesto se convierte en radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton, y se convierte en agente causante de la peroxidación lipídica en espermatozoides de humanos y ratones (Aitken, *et al.*, 1994). Sin embargo se podría completar la eliminación del peróxido de hidrógeno al adicionarse Catalasa, ya que esta enzima se encarga de transformar al peróxido de hidrógeno en agua y evitaría, de forma similar a como sucede endógenamente, el estrés oxidativo y consecuente peroxidación lipídica durante la criopreservación de semen en la alpaca.

Teniendo en cuenta la información recaudada, en este trabajo buscó demostrar que el uso en conjunto de Tempol y de Catalasa ejerce un efecto sinérgico frente al estrés oxidativo presente durante la criopreservación de semen de alpaca.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN Y ANIMALES

Se trabajaron con 13 eyaculados provenientes de 4 alpacas mayores de 3 años y con peso oscilante entre 45 a 70 kg, de raza Suri y Huacaya. El entrenamiento de los machos alpaca se llevó a cabo en la Unidad Zootécnica y Tecnológica (UZYT) y las evaluaciones experimentales se realizaron en el Laboratorio de Reproducción Animal. Dichos establecimientos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas de la Universidad Científica del Sur, ubicados en la ciudad de Lima, Perú -12.221742, -76.977119.

3.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Cada eyaculado (n=12) se dividió en 4 partes, y cada una de las alícuotas fue criopreservada de la misma manera. Los grupos formados fueron:

- Grupo control: criopreservación estándar: 95 mL de leche descrematada, 5 mL yema de huevo y 4.85 g de fructosa.
- Grupo antioxidante Tempol: Adicionando un análogo de Superóxido dismutasa (Tempol 1 mM) al dilutor de semen.
- Grupo antioxidante catalasa: Adicionando catalasa (50 µg/mL) al dilutor de semen.

- Grupo interacción Catalasa-Tempol: adicionando catalasa (50 $\mu\text{g/mL}$) y un análogo de SOD (Tempol 1mM) al dilutor de semen.

3.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES

3.3.1 Colecta de Semen

El método que se utilizó fue el de vagina artificial modificada usando como señuelo una hembra receptiva (Dávalos y Olazábal, 2002). La vagina artificial modificada (Bravo *et al.*, 1997), constó de un tubo de PVC de 20 cm de largo por 4 cm de diámetro. La vagina artificial contuvo aire a presión y agua caliente a 55-60°C y se cubrió con una frazadilla eléctrica para mantener una temperatura constante. La temperatura de la vagina artificial cuando el macho introdujo el pene fue entre 40 a 42 °C. Una vez que el macho haya adoptado la posición de cópula sobre la hembra receptiva, el operador desvía el pene hacía la vagina artificial.

3.3.2 Manejo inicial de los eyaculados

Posteriormente a la colecta se procedió a medir el volumen del eyaculado, e inmediatamente después se eliminó la viscosidad del plasma seminal con el fin de favorecer el manejo de muestras seminales. La técnica a utilizar para eliminar la viscosidad del plasma seminal fue la de acción mecánica mediante el paso repetido a través de una aguja de tuberculina (aspirado y eyectado múltiple), para licuar las muestras de semen. Luego se procedió a realizar una evaluación inicial de la muestra en la cual se evaluará motilidad y concentración. Se trabajó solo con aquellos eyaculados que presenten una motilidad $\geq 35\%$ y una concentración $\geq 70 \times 10^6$ espermatozoides/mL.

3.3.3 Proceso de criopreservación

Se utilizó un dilutor preparado con 95 ml de leche descremada, 5 ml de yema de huevo y 4.85 g de fructosa, teniendo una concentración final de dimetilacetamida de 1 M. Los eyaculados y/o alícuotas de eyaculados serán diluidos 1:1 con la fracción A del dilutor en base a leche descremada y divididas en alícuotas de 250 μL por grupo tratamiento (Control, Catalasa, Tempol e interacción Catalasa-Tempol). Estas muestras fueron enfriadas lentamente desde los 35°C hasta los 5°C, en un tiempo aproximado de 60

minutos. A los 15° C se adicionaron los antioxidantes: Catalasa, Tempol, Catalasa-Tempol. Al llegar a los 5°C, se adicionó la fracción B (dimetilacetamida 1 M). Se dejó estabilizar por 30 minutos e inmediatamente se envasaron en pajillas de plástico transparentes de 0.250 mL. Las pajillas se congelaron con el método de vapores de nitrógeno líquido (a boca de tanque) por 15 minutos aproximadamente y almacenadas en el fondo del tanque sometidas a -196°C. El descongelamiento de las pajillas se realizó utilizando un baño maría a 38°C por 1 minuto.

3.3.4 Motilidad

Para evaluar la motilidad espermática se colocó 25 µl de la muestra en una lámina portaobjetos temperada y se observó a 400x. Se determinó el porcentaje de espermatozoides móviles sobre el total de espermatozoides en cada campo, evaluando un total de 10 campos. Los resultados fueron expresados como porcentaje de motilidad. Los valores de motilidad fueron corregidos con respecto al porcentaje de espermatozoides sobrevivientes sobre la motilidad inicial utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Motilidad corregida} = (\text{Motilidad observada} / \text{Motilidad inicial}) \times 100$$

La motilidad observada es aquella obtenida luego haber utilizado los tratamientos a las diversas temperaturas a evaluar (10°C, 5 °C y post descongelamiento).

3.3.5 Determinación de peroxidación lipídica

El proceso de peroxidación lipídica se midió a través del método del ácido tiobarbitúrico (TBA) de acuerdo a lo descrito por Álvarez y Storey (1982) y modificado por Aitken *et al.* 1989. En un tubo con tapa, 20×10^6 espermatozoides se suspenden en 0,250 mL de medio PBS, al cual se agrega 0,125 mL de sulfato ferroso (0,2 mM) y 0,125 mL de ascorbato de sodio (1 mM). La solución se incubó a 37°C durante 1 hora. Posteriormente se enfrió en baño de hielo por 15 minutos. Manteniendo el tubo en el hielo, se agrega 0,250 mL de PBS y 0,250 mL de ácido tricloroacético al 40%. Luego se centrifugaron los tubos a 2500 g durante 10 minutos a 4°C. Por otro lado, en un tubo de vidrio con tapa, se colocarán 0,125 mL de ácido tiobarbitúrico al 2%, se aclara con 5 µL de hidróxido de sodio 5 M y se agrega 0.5mL del sobrenadante de los tubos centrifugados. Esta mezcla se incubó a 90°C durante 10 minutos. Finalmente, las mezclas son enfriadas a temperatura ambiente por 30 minutos. En esta técnica, el ácido tiobarbitúrico reacciona en la presencia

de un producto de la peroxidación lipídica, malondialdehído. De esta manera, la cantidad de malondialdehído generado por la incubación de espermatozoides con promotores (sulfato ferroso y ascorbato de sodio) va a depender de la cantidad de lipoperóxidos producidos previo al inicio del ensayo (Aitken y Fisher, 1994). La lectura se realizó en un espectrofotómetro UVmini-1240 (Shimadzu) a 532 nm contra un blanco reactivo. Los resultados fueron expresados a través de la longitud de onda con lo cual se estima la cantidad de sustancia (malondialdehído) presente en la muestra.

3.3.6 Análisis Estadístico

Se utilizó el programa estadístico Prism® versión 3.0. Los porcentajes de motilidad fueron transformados a valores angulares ($\text{ángulo} = \arcseno \sqrt{x}$) para acercar los datos a la distribución normal. Se realizó el análisis de varianza para evaluar el efecto de los grupos (Control, Tempol, Catalasa y Catalasa-Tempol) sobre los porcentajes de motilidad y producción de peróxidos lipídicos.

IV. RESULTADOS

Se trabajaron con 13 muestras provenientes de 4 alpacas macho, una alpaca de raza suri aportó 4 muestras y los demás, de raza huacaya, aportaron 3 eyaculados cada uno.

El volumen promedio de todos los eyaculados fue de 1.11 mL, el porcentaje de espermatozoides móviles de todas las colectas en promedio fue de 50.77 ± 16.44 , siendo la concentración promedio de 162.69 ± 105.32 espermatozoides $\times 10^6/\text{mL}$.

Tabla 1.- Valores seminales de alpaca obtenidos mediante vagina artificial

Volumen por eyaculado	Motilidad Inicial	Concentración Espermática
1.11 mL	50.77 ± 16.44	162.69 ± 105.32

Valores son medias \pm desviaciones estándar

Para evaluar los tratamientos, las motilidades se tomaron a los 10°C, 5°C y post descongelamiento, los cuales se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 2.- Efecto de los tratamientos sobre la motilidad a los 5°C, 10°C y post descongelamiento

Tratamientos	10°C	5°C	Post descongelamiento
Control	66.66 ± 34.12 ^a	54.67 ± 38.38 ^a	19.04 ± 16.55 ^a
Catalasa	67.77 ± 35.29 ^a	56.75 ± 37.14 ^a	19.25 ± 11.11 ^a
Tempol	69.10 ± 31.49 ^a	63.17 ± 32.61 ^a	22.66 ± 21.88 ^a
Catalasa-Tempol	71.37 ± 29.93 ^a	60.16 ± 36.60 ^a	14.82 ± 12.95 ^a

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

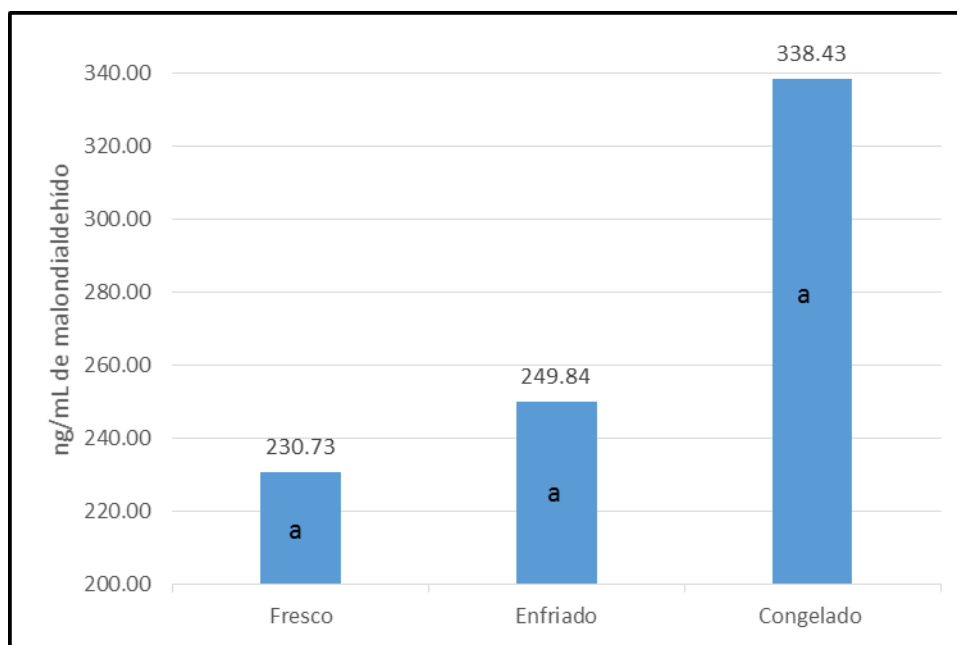
Valores expresados en medias ± desviaciones estándar

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se puede apreciar una tendencia al descenso de la motilidad de los espermatozoides al post descongelamiento. Los mejores resultados de motilidad post descongelamiento fueron del Tempol y Catalasa con 22.66% y 19.25% respectivamente; sin embargo, su interacción tuvo la menor motilidad del experimento (14.82%).

Con respecto a la producción de peróxidos lipídicos, el valor promedio (expresado en ng/mL de malondialdehído) en semen fresco recién colectado fue de 230.73 ± 266.04 ng/mL; a los 5°C se obtuvo un incremento a 249.84 ± 202.25 ng/mL y se observó un mayor nivel al post descongelamiento 338.43 ± 416.48 ng/mL.

A pesar que hay una tendencia al aumento de los niveles de peroxidación lipídica durante el proceso de enfriamiento y criopreservación, no se encontraron diferencias significativas.

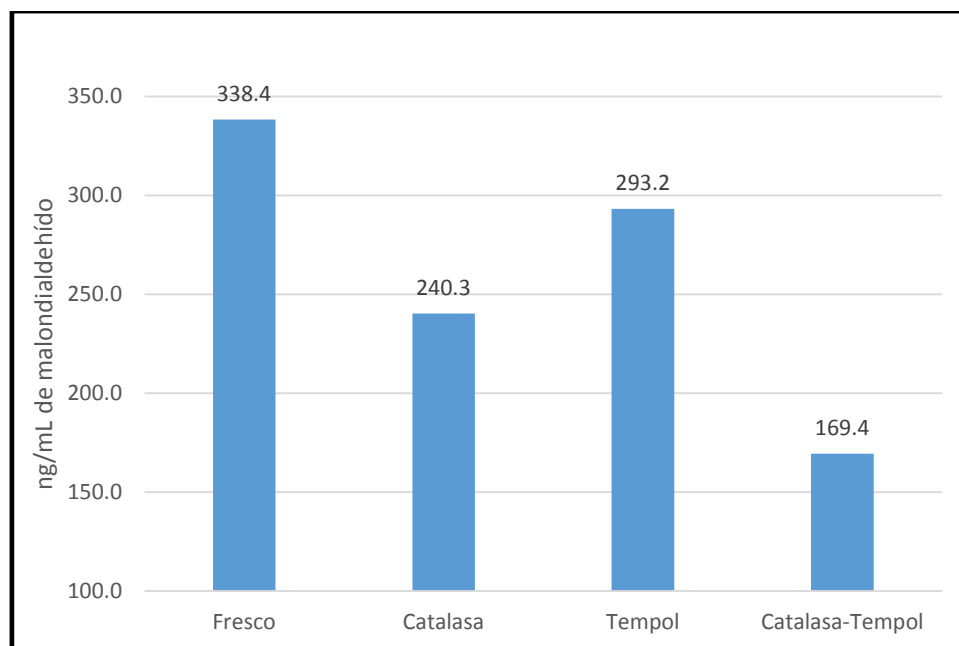
Figura 1.- Producción de Peróxidos Lipídicos (expresados en ng/mL de malondialdehído) en espermatozoides de semen fresco de alpaca (grupo control), al final de la curva de enfriamiento y luego del proceso de criopreservación.



Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

El promedio de la peroxidación lipídica post descongelamiento de los tratamientos utilizados fue menor al valor obtenido por el grupo control (338.43 ± 416.48 ng/mL), siendo el grupo Catalasa-Tempol el de menor producción de malondialdehído (169.4 ± 231.2 ng/mL). Los grupos Catalasa y Tempol obtuvieron 240.3 ± 262.8 ng/mL y 293.2 ± 262.1 ng/mL respectivamente. A pesar de las diferencias de los tratamientos con respecto al grupo control, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$).

Figura 2.- Peroxidación lipídica (ng/mL malondialdehído) en los tratamientos de semen alpaca luego del proceso de criopreservación.



Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

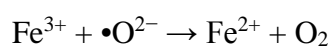
V. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la adición de Tempol y Catalasa al dilutor para la criopreservación de semen de alpaca sobre la motilidad post descongelamiento. Asimismo, se evaluó el efecto de estos antioxidantes sobre la producción de malondialdehído luego del proceso de criopreservación.

En los resultados obtenidos al finalizar el proceso de congelamiento, se observó que al analizar estadísticamente los 4 tratamientos, no se hallaron diferencias significativas para las variables de motilidad. Sin embargo, se observó que la mayor motilidad la obtuvo el grupo Tempol (22.66%); el grupo Catalasa y Control obtuvieron porcentajes de motilidad menores (19.25% y 19.04% respectivamente) y finalmente el grupo Catalasa-Tempol obtuvo la menor motilidad en comparación a todos los demás tratamientos (14.82%).

Durante el proceso de criopreservación, en todos los tratamientos se produjo un descenso considerable de la motilidad, como lo han descrito diversos autores en espermatozoides de mamíferos, el descenso es debido a diferentes factores como el shock de frío, cambio osmótico, formación de cristales, daño en la permeabilidad de la membrana lipídica, la producción de ROS (recientemente descrita por Trelles, 2015 en alpacas) y posterior peroxidación lipídica que ejercen cambios de forma irreversible en el espermatozoide (White, 1993). A pesar que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, el uso del Tempol 1 mM presentó la mayor motilidad post-descongelamiento. Este resultado se asemeja a lo obtenido por Santiani *et al.*, (2012)

quienes utilizaron análogos de superóxido dismutasa, obteniendo 22.1% y 19.7% comparados al grupo control (11.2%). Estos resultados podrían indicar la acción de este antioxidante sobre la producción de ROS (que en exceso ejercen efectos deletéreos sobre la función espermática), debido a que estos análogos de SOD reaccionan en presencia del anión superóxido convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) a través de la reacción de Fenton (Aitken y Fisher, 1994); así mismo al disminuir la cantidad de anión superóxido, este radical no se convertiría en el potencial radical hidroxilo (altamente nocivo) debido a que el Fe^{+3} ya no se reduciría a Fe^{+2} para su posterior conjugación con el peróxido de hidrógeno. Explicándolo esquemáticamente, el primer paso del ciclo catalítico se produce por la reducción del catión férrico a catión ferroso:



Acción de la SOD o análogos

Señalo al anión superóxido porque es ahí su sitio de acción. El segundo paso es una reacción de Fenton:



Reacción que se evitaría

Como se observa, al no tener el paso 1, tampoco se obtendría el paso 2 que contiene al Fe^{2+} , por tanto todo el proceso para obtener al radical hidroxilo ($\bullet OH$) se vería detenido.

La catalasa posee efecto sobre el peróxido de hidrógeno ya que lo dismuta a agua y oxígeno, su presencia se ha demostrado en semen de equino, humano y otras especies; sin embargo, no se ha demostrado su presencia en semen de alpaca. En el experimento, el tratamiento con catalasa no mostró diferencias significativas con respecto al control, aunque su promedio de motilidad fue mayor (19.25%). Este resultado muestra que la catalasa no posee un efecto significativo sobre la motilidad post descongelamiento. Asadpour (*et al.*, 2011) utilizó diferentes concentraciones de catalasa (100 UI/mL y 200 UI/mL) para evaluar motilidad y vitalidad durante el proceso de congelamiento de semen de toro y no encontró diferencias significativas con respecto al grupo control (motilidades de 46.70% y 43.30% con respecto a 40.70%); Ball *et al.*, 2001 en su trabajo en equinos no encontró diferencias significativas al utilizar Catalasa de hígado de bovino al dilutor para refrigeración de semen en esta especie. Sin embargo, algunos autores describen resultados favorales, Fernández-Santos *et al.*, 2008 reportó que la suplementación de

Catalasa al dilutor mejora la motilidad post descongelamiento en los espermatozoides colectados de epidídimo de venado rojo.

La interacción Catalasa-Tempol obtuvo el menor porcentaje de motilidad, sin embargo no se encontraron diferencias significativas. La interacción de estos dos antioxidantes se encuentra extensamente detallada en la bibliografía, asimismo algunos estudios sobre el uso de análogos de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa muestran resultados favorables sobre la protección que ambos ofrecen sobre la actividad mitocondrial (Fernández-Santos *et al.*, 2007); en humanos, Rossi T *et al.*, (2001) demuestra que esta interacción mejora la motilidad en hombres con problemas de fertilidad. En la alpaca, esta interacción se ha experimentado por primera vez en este experimento, lo que daría pie a futuras trabajos en los cuales se varíe algunos de los factores como la concentración de antioxidante para obtener resultados significativos. Estas diferencias en los resultados pueden tener diversos orígenes, como los protocolos de criopreservación, la concentración de enzima utilizada, los dilutores y las características del semen de la especie.

Con respecto a la producción de peróxidos lipídicos, hubo una tendencia al aumento de la producción de MDA tras el proceso de criopreservación, esto podría deberse a la alta cantidad de ácidos grasos poliinsaturados presentes en la membrana de los espermatozoides en los mamíferos, susceptibles a una peroxidación lipídica el cual es ocasionado por el efecto de los radicales oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos) (Bansal *et al.*, 2010). En alpacas, los primeros valores registrados de peróxidos lipídicos fueron reportados por Trelles, *et al.*, 2013 quien obtuvo un promedio de 544 ng/mL de malondialdehído producido en espermatozoides de esta especie; Santiani (2003) reporta valores de 671 ng/mL de MDA en espermatozoides de ovinos. En nuestro estudio, los grupos antioxidantes y su interacción, dieron lecturas menores de MDA en comparación a las del grupo control, sin embargo no dieron diferencias significativas. Resultado similar fue reportado por Bucak *et al.*, 2010 quien utilizó antioxidantes para criopreservar semen de caprino, sin obtener efectos significativos sobre parámetros seminales como la peroxidación lipídica. En nuestro trabajo, el grupo Catalasa-Tempol obtuvo la menor producción de MDA, podría decirse que en este grupo se produjo el menor estrés oxidativo, el mecanismo mediante el cual esta interacción obtuvo un resultado favorable se explicaría a través de la reacción de

Fenton y la actividad que el Tempol posee sobre este y la conversión del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno dada por la Catalasa (Aitken y Fisher, 1994).

Conocemos que las especies reactivas de oxígeno poseen el potencial para iniciar la cascada de la peroxidación lipídica en la membrana espermática y ésta a su vez muy ligada a reducción de la motilidad espermática (Bansal *et al.*, 2010). Diversos daños producto de estos ROS estarían generando un daño espermático estructural y funcional, es probable que los daños estructurales, resaltando más a peroxidación lipídica de membrana, hayan sido los responsables de la poca efectividad de los antioxidantes adicionados, y por tanto los resultados obtenidos de motilidad post-descongelamiento y la no reducción de las lecturas de malondialdehído no hayan sido las esperadas.

VI. CONCLUSIONES

- El uso de los antioxidantes análogos de superóxido dismutasa (Tempol 1mM), Catalasa 50 ug/mL y su interacción como parte del dilutor para la criopreservación de espermatozoides de alpaca no poseen efectos significativos sobre la pérdida de motilidad espermática.
- La producción de malondialdehído durante el proceso de criopreservación de semen de alpaca no se ve reducido al utilizar antioxidantes Tempol, Catalasa y su interacción.

VII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Aitken RJ Founders' Lecture. Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt. *Report Fertil Dev.* 2004; 16(7): 655-664.
2. Aitken RJ, Buckingham D, Harkiss D. Use of a xanthine oxidase free radical generation system to investigate the cytotoxic effect of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 97(2): 441-450.
3. Aitken R, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays.* 1994; 16(4): 259-267.
4. Anghel A, Szamfirescu S. Role of antioxidant additives in the protection of the cryopreserved semen against free radicals. *Romanian Biotechnological Letters.* 2010; 15(3).
5. Alarcón V, García W, Bravo W. Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *Rev Investig Vet. Perú.* 2012; 23: 58-64.
6. Aller J, Rebuffi G, Cancino K, Alberio R. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, Viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Arch Zootec.* 2003; 52: 15-23.
7. Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl.* 1992; 13(3): 232-241.
8. Avila-Portillo LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, et al.

- Fundamentos de Criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 2006; 57(4): 291-300.
9. Bansal A, y Bilaspuri G. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International*. 2010.
 10. Awda, B.J., Mackenzie-Bell, M., Buhr, M.M. Reactive oxygen species and boar spermfunction. *Biol Reprod* 2009; 81(3): 553–561.
 11. Bailey J., Jean-Franc, Ois Bilodeau, Cormier N. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. *Minireview. J. Androl*. 2000; 21(1).
 12. Ball BA, Medina V, Gravance CG, et al. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 °C. *Theriogenology* 2001; 56: 577–589.
 13. Ball BA, Vo AT, Baumber J. Reactive oxygen species generation by equines espermatzoa. *Am J Vet Res*. 2001; 62(4): 5508-5515.
 14. Banda J, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, Santiani A. Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Rev Investig Vet Perú*. 2010; 21:145-153
 15. Baumber, J., Sabeur, K., Vo, A., Ball, B.A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology*. 2003; 60(7): 1239–1247.
 16. Bilodeau J-F, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Level of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev*. 2000; 55(3): 282 288.
 17. Bravo PW, Flores U, Garnica J, Ordoñez C. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*. 1997; 47(3): 619–26.
 18. Bravo PW, Skidmore JA, Zhao XX. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Anim Reprod Sci*. 2000; 62(1-3): 173–93.
 19. Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*. 2010 63(3), pp.248–253.
 20. Burgel H, Erhardt G, Gauly M. Cryopreservation of llama (*Lama glama*) spermatozoa with an egg yolk free extender, in Gerken M., Renieri C. (eds),

- Progress in South American Camelids Research Wageningen Pers, Wageningen Netherlands. 2001.
21. Dávalos R, Olazábal J. Evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. *Rev Inv Vet Perú*. 2002; 13(2): 98-99.
 22. De Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Gagnon, C., Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod*. 1997; 2(1): 48–54.
 23. De Lamirande E, Lamothe G. 2009. Reactive oxygen-induced formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* 46:502-510.
 24. De Leeuw F, De Leeuw A, Den Daas H, Colenbrader B, Werkleij A. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*.1993; 30: 32 - 44.
 25. Donoghue AM, Donoghue DJ. Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poult Sci*. 1997; 76(10):1440–5.
 26. Fernández Baca, S.; W. Calderón. Métodos de colección de semen de alpaca. *Bol. IVITA*. 1965.
 27. Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, García-Macias V, et al. Sperm characteristics and DNA integrity of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and nonenzymatic antioxidants. *Journal of Andrology* 2007; 28: 294–305.
 28. Foote, R., Brockett, C. y Kaproth, M. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Repro Sci*. 2002; 71, 13-23.
 29. Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*. 1997; 272:18515-18517
 30. Fuchs J, Thiele J, Ochsendorf F. Oxidants, antioxidants and oxidative injury. En: Ochsendorf, F.R. and Fuchs, J (eds), *Oxidative stress in male infertility*, Michael Itschert, Gardez Verlag. 1997; pp 21-40.
 31. Hafez E, Jainudeen M, Rosnina Y. 2000. Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. En: Hafez E y Hafez B (eds.) 2000. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales Domésticos*. 7^o Edición. Interamericana-McGraw Hill, pp 33-55.
 32. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm:

- what we ask them to survive. *J Androl.* 1990; 11:73-88.
33. Huanca W. Los desafíos en el manejo reproductivo de los camélidos sudamericanos. XXII Reunión ALPA. 2011. 2-9.
 34. Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acids peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil steril.* 1979; 31(5): 531-7.
 35. Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology* 2005; 63:1354-1365.
 36. Kasimanickam R, Pelzer K, Kasimanickam V, Swecker W, Thatcher C. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. *Theriogenology.* 2006; 65(7): 1407-1421.
 37. Kawakami T, Urakami S, Hirata H, Tanaka Y, Nakajima K, Enokida H, Shiina H, Ogishima T, Tokizane T, Kawamoto K, Miura K, Ishii N, Dahiya R. Superoxide dismutase analog (Tempol: 4-hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine 1-oxyl) treatment restores erectile function in diabetes-induced impotence. *Int J Impot Res.* 2009. 21(6):348-55
 38. Maia S, Bicudo S, Sicherle C, Rodello L, Gallego I. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Animal Reprod Sci.* 2010; 122(1-2):118-23.
 39. Mahfouz R, Sharma R, Lackner J, Aziz N, Agarwal A. Evaluation of chemiluminescence and flow cytometry as tool in assessing production of hydrogen peroxide and superoxide anion in human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2009; 92(2): 819-827.
 40. Mara L, Dattena M, Pilichi S, Sanna D, Branca A, Cappai P. Effect of different diluents on goat semen fertility. *Anim Reprod Sci.* 2007; 102(1-2):152-7.
 41. Mara L, Accard C, Pilichi S, Dattena M, Chessa F, Chessa B, et al. Benefits of TEMPOL on ram semen motility and in vitro fertility: a preliminary study. *Theriogenology.* 2005; 63(8): 2243-53.
 42. Mata-Campuzano M, Alvarez-Rodriguez M, Del Olmo E, Fernández-Santos MR, Garde JJ, Martínez-Pastor F. Quality, oxidative markers and DNA damage (DNA) fragmentation of red deer thawed spermatozoa after incubation at 37°C in

- presence of several antioxidants. *Theriogenology*. 2012. 78(5): 1005-19.
43. Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*. 2002; 57:327-344.
 44. Mitchell J, Samuni A, Krishna MJ, Degraff W, Ahn M, Samuni U, Russo A. Biologically active metalindependent superoxide dismutase mimics. *Biochemistry*. 1990; 29: 2802-2807.
 45. Mogrovejo D. Estudio del semen de la alpaca. Tesis Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 1952; 39 p.
 46. Moreira da Silva F, Marques A. and Chaveiro A. Reactive Oxygen Species: A Double-Edged Sword in Reproduction *The Open Veterinary Science Journal*, 2010; 4: 127-133
 47. Morton K, Evans G, Maxwell W. 2010. Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology* 74:311-316.
 48. Papas AM. Diet and antioxidant status. *Food Chem Toxicol* 1999; 37:999-1007.
 49. Pérez Durand M, García W, Capcha A, Pacheco J. Evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides (conducto deferente) conservado en alpacas. *Proceedings of the IV Congreso Mundial sobre Camélidos*. 2006.
 50. Peris, S.I., Bilodeau, J.F., Dufour, M. Impact of Cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 2007; 74(7): 878–892.
 51. Raymundo F. 2004. Efecto de tres dilutores en la conservación del semen de alpaca. Tesis Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 47 p.
 52. Rossi T, Mazzilli F, Delfino M, Dondero F. Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure. *Cell Tissue Bank*. 2001; 2: 9–13.
 53. Ruiz L, Santiani A, Sandoval R, Huanca W, Coronado L, Alzamora C. Effect of two antioxidants (tempo y tempol) on ram semen cryopreservation using the tris extender (Spanish). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2007; 18: 99–106.
 54. Santiani A. 2003. Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis Magister en Ciencias. 95p.

55. Santiani A, Huanca W, Sapan R, Huanca T, Sepúlveda N, Sanchez R. Effects on the quality of frozenthawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J. Androl.* 2005; vol. 7, pp. 303-309.
56. Santiani A, Evangelista S, Valdivia M, Risopratón J, Sánchez R. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. *Theriogenology.* 2012; 79: 842–846.
57. Seidel GE Jr. Modifyng oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Therioqenology* 2006;65:228-35.
58. Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal spermfunction. *Frontiers in Bioscience.* 1996; 1, pp. 78–86.
59. D. Sanocka and M. Kurpisz, “Reactive oxygen species and sperm cells,” *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2004; 2, pp. 12–26.
60. Reza Asadpour, Razi Jafari y Hossein Tayefi-Nasrabadi. “Effect of various levels of catalase antioxidant in semen extenders on lipid peroxidation and semen quality after the freeze-thawing bull semen”. *Veterinary Research Forum.* 2011; 2 (4) 218 – 221.
61. Rodríguez Vidal M. Estudio comparativo de la lipoperoxidación basal (producción de malondialdehído) en semen y espermatozoides lavados de mamíferos. Tesis de Grado. Universidad Autónoma Metropolitana. 1997.
62. Sumar, J., Leyva, V. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca *Lama pacos*. Resumenes IV Conv. Int. Sobre Camelidos Sudamericanos, 3. 1981.
63. Trelles, X., Muchotrigo, D., Choez, K., Pantoja C., Solis R., Evangelista S., Santiani, A. Evaluación de la peroxidación lipídica en espermatozoides de alpaca mediante el método del ácido tiobarbitúrico modificado. *Spermova.* 2013; 3(1): 89 – 90.
64. Trelles, X. Determinación de la producción intracelular de anión superóxido y peróxido de hidrógeno durante el proceso de criopreservación de semen de alpaca. Tesis de Médico Veterinario. Universidad Científica del Sur. 2015.
65. Vaughan J, Galloway D, Hopkins D. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). Rural Industries Research and Development Corporation, Kingston, ACT, Australia. 2003.
66. Venereo G. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana*

- Med Militar 31:126-133.
67. Villegas, J., Kchr, K., Soto, L., Henkel, R., Miska, W., Sánchez, R. Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. *Andrologia*. 2003; 35(4): 227–232.
 68. .Villegas I, Villegas JA. Soporte nutricional al tratamiento convencional de las enfermedades del espectro esquizofrénico [accedido 25 Ago 2004]. Disponible en: http://www.onlinepsiquiatria.com/page_artinfo.php?
 69. White IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev*. 1993;5:639–658.

VIII. ANEXOS
1.- Valores seminales generales obtenidos mediante vagina artificial

Macho	Volumen mL	Motilidad %	Concentración x10(6) mL
3	0.5	80	450
Légolas	0.8	40	160
6	0.8	45	160
2	2.3	50	109
Légolas	1	45	273
6	0.6	50	70
Légolas	0.5	35	84
6	1.2	55	70
3	0.8	40	230
6	1.3	35	170
2	1.6	90	120
3	1.8	50	115
2	1.2	45	104
PROMEDIO	1.11	50.77	162.69
DESV. STND.	0.54	16.44	105.32

2.- Motilidades de los tratamientos a las 10 °C, 5 °C y Post Descongelamiento (valores corregidos)

Macho	10 °C			
	Control	Catalasa	Tempol	Catalasa – Tempol
3	81.25	87.50	81.25	87.50
Légolas	25.00	7.50	25.00	15.00
6	71.11	62.22	62.22	71.11
2	90.00	90.00	86.00	86.00
Légolas	0.00	2.22	6.67	13.33
6				
Légolas	57.14	80.00	80.00	71.43
6	81.82	81.82	81.82	81.82
3	62.50	75.00	75.00	75.00
6		91.43	91.43	
2	33.33	38.89	44.44	50.00
3				
2	44.44	44.44	44.44	66.67
PROMEDIO	66.66	67.77	69.10	71.37
DESV. STND	34.12	35.29	31.49	29.93

	5 °C			
Macho	Control	Catalasa	Tempol	Catalasa - Tempol
3	81.25	87.50	87.50	87.50
Légolas	15.00	20.00	25.00	20.00
6	55.56	51.11	62.22	62.22
2	80.00	80.00	76.00	86.00
Légolas	0.00	0.00	2.22	4.44
6			92.00	
Légolas	34.29	42.86	37.14	34.29
6	1.82	1.82	63.64	7.27
3	62.50	75.00	75.00	70.00
6	91.43	85.71		91.43
2	33.33	33.33	33.33	50.00
3				
2	35.56	44.44	51.11	48.89
PROMEDIO	54.67	56.75	63.17	60.16
DESV. STND	38.38	37.14	32.61	36.60

	Post descongelamiento			
Macho	Control	Catalasa	Tempol	Catalasa/Tempol
3	43.75	31.25	22.50	6.25
Légolas	25.00	12.50	25.00	2.50
6	2.22	6.67	2.22	6.67
2	34.00	20.00	40.00	26.00
Légolas	2.22	26.67	6.67	6.67
6	20.00	30.00	34.00	26.00
Légolas	51.43	34.29	80.00	45.71
6	10.91	7.27	3.64	3.64
3	5.00	15.00	15.00	17.50
6	8.57	28.57	22.86	22.86
2	3.33	3.33	4.44	6.67
3	30.00	28.00	36.00	20.00
2	11.11	6.67	2.22	2.22
PROMEDIO	19.04	19.25	22.66	14.82
DESV. STND.	16.55	11.11	21.88	12.95

2.- Producción de peróxidos lipídicos expresados en ng/mL de Malondialdehído a los 5 °C y Post descongelamiento

	5 C			
Macho	Control	Catalasa	Tempol	Catalasa/Tempol
3	582.3	243.3	766.0	986.0
Légolas	652.2	484.0	515.0	333.9
6	390.8	38.8	437.4	359.7
2	217.4	144.9	326.1	90.6
Légolas	147.5	251	67.3	207.0
6	315.7	147.5	274.3	499.5
Légolas	85.4	82.8	51.8	75.1
6	377.8	235.5	217.4	-15.5
3	201.9	121.6	196.7	152.7
6	72.5	124.2	152.7	165.6
2	126.8	264.0	196.7	308.0
3	64.7	67.3	82.8	41.4
2	12.9	173.4	0.0	-20.7
PROMEDIO	249.8	183.0	252.6	244.9
DESV. STND.	202.2	116.3	215.5	272.0

Post descongelamiento				
Macho	Control	Catalasa	Tempol	Catalasa/Tempol
3	1503.6	709.1	929.1	789.3
Légolas	859.2	603.0	582.3	512.4
6	442.5	31.1	170.8	238.1
2	359.7	680.6	530.5	163.0
Légolas	38.8	85.4	-51.8	59.5
6	80.2	2.6	186.3	49.2
Légolas	235.5	225.2	349.4	103.5
6	207.0	256.2	142.3	-28.5
3	305.4	333.9	305.4	108.7
6	108.7	90.6	36.2	10.4
2	170.8	54.3	331.3	106.1
3	72.5	46.6	144.9	64.7
2	15.5	5.2	155.3	25.9
PROMEDIO	338.4	240.3	293.2	169.4
DESV. STND.	416.5	262.8	262.1	231.2