



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y VETERINARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES
REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) EN ESPERMATOZOIDES
CANINOS REFRIGERADOS CON Y SIN DILUTOR”**

Tesis para optar al Título Profesional de
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

VALERIA CASTRO-POZO GUARDERAS
BACHILLER EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Lima – Perú
2019

Acta de Sustentación de Tesis

Siendo las 18:00 horas del 02 de Mayo de 2019, en el Aula L 204 (Campus Villa II), bajo la presencia del jurado examinador nombrado por **Resolución Directoral Académica de Carrera N° 014-DACMVZ-DAFCVB-U. CIENTÍFICA-2019**, presidido por la M.V. Milena Paola Montenegro Vega, M.V. Jesús Alberto Chanamé Parraguez, M.V. Gianmarco Rojas Moreno y la Mg. Shirley Sujey Evangelista Vargas como Director – Observador. Se procedió en acto público a la sustentación de la tesis titulada: **“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) EN ESPERMATOZOIDES CANINOS REFRIGERADOS CON Y SIN DILUTOR”**.

La presidente concedió el uso de la palabra a la Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia **Castro-Pozo Guarderas Valeria**, para la sustentación de su tesis. Luego de la exposición, la bachiller absolvió las preguntas del Jurado y del público asistente.


El Jurado acordó otorgarle la nota de:

..... Diecisiete 17

El presidente del Jurado dio por culminado el acto de sustentación y levantó la sesión a las 19:00hrs.


.....
M.V. Milena Paola Montenegro Vega
Presidente


.....
M.V. Jesús Alberto Chanamé Parraguez
Miembro


.....
M.V. Gianmarco Rojas Moreno
Miembro


.....
Mg. Shirley Evangelista Vargas
Director - Observador

006-2019

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi hijo Mateo con todo mi amor, quien es el motivo para esforzarme cada día más para alcanzar mis metas.

AGRADECIMIENTO

Quiero darles gracias a mis padres, por todo su apoyo incondicional, su cariño y sus sabios consejos.

A Rafael, mi compañero de vida, por impulsarme siempre y por ser mi soporte para continuar adelante.

A la Dra. Shirley Evangelista de la Facultad de Ciencias Biológicas y Veterinarias de la Universidad Científica de Sur, por guiarme en esta investigación con mucha disciplina y constante motivación.

INDICE DEL CONTENIDO

	DEDICATORIA	ii
	AGRADECIMIENTO	iii
	INDICE	iv
	RESUMEN	vi
	ABSTRACT	vii
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LA LITERATURA	2
	2.1. Inseminación artificial canina	2
	2.2. Manejo de semen canino y opciones de preservación	3
	2.3. Especies reactivas de oxígeno	7
	2.4. Estrés oxidativo	10
	2.5. Estrés oxidativo seminal	10
	2.6. Consecuencias patológicas de ROS en el semen	11
	2.7. Generación de ROS mientras se produce el descenso de Temperatura	14
	2.8. Evaluación de la producción de ROS	16
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
	3.1. Localización y ambiente	18
	3.2. Población y muestra	19
	3.3. Diseño experimental modelo, grupos experimentales, secuencia de operaciones experimentales	19
	3.3.1. Diseño experimental	19
	3.3.2. Colecta de semen	20
	3.3.3. Evaluación básica y manejo de la muestra	21
	3.3.4. Evaluación de la producción de ROS	22
	3.4. Análisis de datos	25
IV.	RESULTADOS	25
	4.1. Peróxido de hidrógeno	25
	4.2. Anión superóxido	28
V.	DISCUSIÓN	30

VI.	CONCLUSIONES	33
VII.	RECOMENDACIONES	34
VIII.	ANEXOS	34
IX.	REFERENCIAS	37

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en espermatozoides caninos refrigerados con y sin dilutor, con el fin de determinar si el uso de dilutor influye sobre la producción de ROS. Se utilizaron 15 muestras seminales con concentraciones mínimas de 60 millones spz/ml, motilidad y viabilidad de 70%, obtenidas por técnica manual de 4 canes sanos, con una abstinencia mínima de dos días. La producción ROS se produce a nivel intracelular en los espermatozoides vivos y es indicativo de estrés oxidativo y una próxima muerte celular. Para evaluar la producción intracelular de ROS en los espermatozoides caninos se utilizó microscopía de fluorescencia, la cual emplea tinciones fluorescentes que se “activan” cuando entran en contacto con las ROS. Las ROS evaluadas fueron peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y anión superóxido (O_2^-), los cuales reaccionaron con las tinciones DCFH-DA y DHE respectivamente. Los datos obtenidos se analizaron utilizando ANOVA de 2 vías. El resultado de la evaluación de los promedios de espermatozoides que producían H_2O_2 con y sin dilutor fue, 76.99% y 66.63% respectivamente, con un P value = 0,0028, lo que indicó diferencia estadística significativa para el uso de dilutor ($P < 0.05$), así mismo el promedio de los espermatozoides que producían H_2O_2 a las 0, 2 y 4 horas fue, 78.92%, 72.03% y 64.47% respectivamente, con un P value= 0.0032, lo que determinó una diferencia estadística significativa entre los tiempos de refrigeración 0 y 2 con respecto al tiempo 4. Por otro lado, la evaluación de los promedios de espermatozoides que producían O_2^- con y sin dilutor fue, 69.65% y 76.25% respectivamente, con un P value= 0,0704, lo que indicó que no hubo diferencia estadística significativa entre el uso o no de dilutor ($P > 0,05$), de igual manera, el promedio de espermatozoides vivos que producían O_2^- a las 0, 2 y 4 horas fue, 76.67%, 72.72% y 69.47% respectivamente, con un P value= 0,2689, lo que mostró que no existe diferencia estadística significativa para los tiempos de refrigeración ($P > 0,05$). Por lo tanto, se puede concluir que con el paso del tiempo la producción de ROS disminuye.

Palabras claves: ROS, semen, caninos.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the production of Reactive Oxygen Species (ROS) in canine sperm cooled with and without dilutor, in order to determine if the use of dilutor influences ROS production. We used 15 seminal samples with minimum concentrations of 60 million spz/ml, motility and viability of 70%, obtained by manual technique of 4 healthy dogs, with a minimum abstinence of two days. ROS production occurs intracellularly in live sperm and is indicative of oxidative stress and an upcoming cell death. To evaluate the intracellular production of ROS in canine sperm fluorescence microscopy was used, which uses fluorescent stains that are "activated" when they come into contact with ROS. The ROS evaluated were hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion (O_2^-), which reacted with DCFH-DA and DHE stains respectively. The data obtained were analyzed using 2-way ANOVA. The result of the evaluation of sperm averages that produced H_2O_2 with and without dilutor was 76.99% and 66.63% respectively, with a P value= 0.0028, which indicated significant statistical difference for the use of dilutor ($P < 0.05$), likewise the average of the spermatozoa that produced H_2O_2 at 0, 2 and 4 hours was 78.92%, 72.03% and 64.47% respectively, with a P value= 0.0032, which determined a significant statistical difference between the times of refrigeration 0 and 2 with respect to time 4. On the other hand, the evaluation of the sperm averages that produced O_2^- with and without dilutor was, 69.65% and 76.25% respectively, with a P value= 0.0704, which indicated that there was no significant statistical difference between the use or not of dilutor ($P > 0.05$), in the same way, the average of live sperm that produced O_2^- at 0, 2 and 4 hours was, 76.67%, 72.72% and 69.47% respectively, with a P value= 0.2689, which showed that there is no Significant statistical difference for cooling times ($P > 0.05$). Therefore, it can be concluded that ROS production decreases over time.

Keywords: ROS, spermatozoa, canine.

I. INTRODUCCIÓN

Cuando se realiza una inseminación artificial en caninos, se debe tener en cuenta la distancia en la cual se encuentran los animales, para decidir si se realizará con semen fresco o con semen refrigerado. Para emplear semen fresco la hembra debe encontrarse en el mismo lugar que el macho o muy cerca de él. Por el contrario, si la hembra se encuentra a un tiempo de viaje no mayor a 24 horas, se emplea semen refrigerado a 5°C. Sin embargo, estas técnicas han sido recientemente más empleadas a nivel mundial en la especie canina, por ello, aún hay cierto desconocimiento sobre las técnicas y las utilidades que proporciona (Lucas, 2011).

Santiani, 2013, señaló que la refrigeración puede producir daño en las células, ya que se produce un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales producen estrés oxidativo; incluso pueden ocasionar la muerte celular (Cárdenas y Pedraza, 2006). En espermatozoides ovinos, se ha demostrado que durante la disminución de la temperatura se produce una elevación en la producción de ROS intracelular (Santiani, 2013). Las ROS en pocas cantidades cumplen funciones fisiológicas (Griveaur y Lannou, 1997).; sin embargo, en cantidades elevadas pueden producir diversas fallas en la funcionalidad espermática (Santiani, 2012).

Por ello, el presente trabajo evalúa la producción de ROS espermatozoides caninos refrigerados en presencia o no de dilutor, con el fin de evaluar si el dilutor influencia la producción de ROS, ya que hasta el momento se considera que el dilutor va a mantener adecuadamente la producción de ROS, sin embargo, no hay estudios que referencien si hay protección sobre la producción de ROS. Para ello, se empleó microscopía de fluorescencia, se utilizaron dos fluorocromos, DCFH-DA y DHE, para evaluar la detección de peróxido de hidrógeno y anión superóxido respectivamente.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CANINA

La inseminación artificial (IA), con sus diversas técnicas según Lucas (2011), es cada vez más utilizada por los médicos veterinarios, reemplazando a la monta natural, sobre todo para la prevención de enfermedades que se transmiten vía sexual, así como para permitir el trabajo con dos reproductores que se localizan a cierta distancia sin necesidad de movilizar a los canes, también se puede optimizar el uso del semen para inseminar 2 o más perras con un mismo eyaculado, lo cual brinda grandes beneficios para los criadores (Stornelli, Stornelli, Arauz, Savignone, García y De la Sota, 2001), otro beneficio importante es que la IA facilita el poder evaluar la calidad del semen, antes de depositarlo en la hembra (Lévy y Fontbonne, 2007).

Para realizar la IA se puede emplear semen fresco, refrigerado o congelado, en cada caso se requiere un manejo y una forma particular de aplicar el semen en la hembra. La IA con semen fresco es la práctica más empleada, es necesaria solo la fracción espermática para el procedimiento, la cual se deposita en la vagina craneal de la hembra. Para la IA con semen refrigerado, también se emplea la fracción espermática, pero es necesario el uso de dilutores para proteger a los espermatozoides del descenso de temperatura (5°C). La IA con semen congelado es la práctica menos habitual, ya que se requiere de equipos especiales para el congelamiento, y la inseminación es intrauterina (Stornelli *et al.*, 2001).

El número de espermatozoides necesarios para fecundar es 10 veces mayor si se coloca el semen en la vagina directamente, que si se colocase en el útero. Por ello, la inseminación vaginal no es recomendada con semen refrigerado y se desaconseja realizarlo con semen congelado (Lévy, 2014).

2.2. MANEJO DEL SEMEN CANINO Y OPCIONES DE PRESERVACIÓN

La colecta de semen por estimulación manual, “mano enguantada”, es una de las técnicas más usada. Generalmente se requiere una hembra en celo para una mayor excitación del can, se realiza una estimulación manual, en parcial erección se masajea y luego se retrae el prepucio, dejando expuesto el bulbo del pene, para darle masajes a pulsos (Keuerk, 2013). Esta técnica logra aislar las 3 fracciones del eyaculado, que son las siguientes:

- Primera fracción es la pre-espermática, su volumen es escaso, de consistencia acuosa y transparente, el tiempo de emisión va de 30 a 50 segundos.
- Segunda fracción, es la espermática, más rica en espermatozoides, proviene del epidídimo, es de color gris a blanco lechoso, el tiempo de emisión es de 50 a 80 segundos y su volumen va de 0.5 a 2 ml.
- Tercera fracción es la post-espermática o prostática, compuesta totalmente por líquido prostático, es de color transparente y acuosa, el tiempo de emisión es de 3 a 30 minutos y su volumen va de 1 a 17 ml (Feldman, 2000).

Una forma sencilla de identificar el momento en que inicia a emisión de la fracción espermática, es observar en el perro la erección completa del pene y la elevación de una extremidad posterior (Keuerk, 2013), y esta termina cuando el perro cesa la eyaculación durante unos segundos, para dar inicio a la emisión de la tercera fracción (Lucas, 2006). Es así como se logra identificar las tres fracciones, para poder seleccionar solo la fracción espermática, para la IA o la crioconservación (Stornelli y De la Sota, 2006).

Fontbonne (2008) recomienda la utilización de 3 tubos de plástico para la colecta de las tres fracciones, evitando el material de vidrio por el riesgo de producir algún corte, también sugiere temperar previamente a 37°C los tubos colectores. Aunque, Root (2010), manifiesta que no es necesario

temperar los tubos colectores debido a que el shock térmico del semen en caninos no es tan marcado como ocurre en otras especies.

Otra técnica de colecta, menos empleada, es la colecta directa del epidídimo, en la cual se obtienen los espermatozoides a nivel testicular, para la criopreservación en animales con alto valor genético que murieron accidentalmente (Hernández, 2004).

Cuando se obtienen las muestras seminales, se debe hacer un correcto manejo de las mismas, para preservar la calidad del semen, ya que esto repercute en el éxito de la IA (Stornelli *et al.*, 2001). Los cuidados básicos son: no exponerlas a cambios bruscos de temperatura, ni cambios mecánicos fuertes como por ejemplo, no agitarlas de manera excesiva, ni ponerlas en contacto con sustancias como el agua o detergentes (Kutzler, 2005). Porque Schulz, Sánchez, Miska y Villegas (2003), refieren que factores externos pueden incrementar la producción de ROS, la cual está asociada con un aumento de apoptosis o muerte celular programada en los espermatozoides. También se sugiere que posterior a la colecta, la muestra sea conservada en baño María a 37°C lo más pronto posible, evitando variaciones de temperatura hasta el momento de su utilización. En dichas condiciones, la viabilidad del semen fresco tras ser colectado es limitada por lo cual se recomienda que sea utilizado inmediatamente, o bien dar comienzo a los procedimientos de dilución, preservación y/o transporte (Lucas, 2014).

Es importante tener en cuenta que ya sea para el uso directo, con semen fresco o si el semen va a ser sometido a criopreservación, es necesario una valoración seminal para establecer la calidad del semen a través de la determinación de parámetros (Root, 2010), como el color, que se considera normal si es blanco lechoso, si es rojo indica la presencia de sangre, si es amarillo indica la presencia de orina y si hay partículas blancas puede indicar leucocitos. También se evalúa el volumen que varía mucho según la raza, edad, tamaño, clima, pudiendo ir desde 1 ml a 40 ml por eyaculado, pero el volumen no tiene relación con la fertilidad del

animal. Del mismo modo se mide el pH que oscila entre los 6.3 - 6.7, está relacionado con la cantidad de líquido prostático recolectado, un pH bajo podría ser por una eyaculación incompleta o por inflamación testicular o de epidídimos (Sorribas, 2000). Asimismo, la motilidad espermática se debe observar rápidamente después de la colecta, cuando todavía se mantiene la temperatura del eyaculado (Bonilla, 2007). Otro parámetro importante es la concentración de espermatozoides, el recuento se realiza utilizando la cámara de Neubauer, donde se considera normal de 200 a 500 millones de espermatozoides por mL. Las anomalías morfológicas se detectan coloreando la fracción espermática (Keuerk, 2013). En humanos se considera normal encontrar solo el 30% de espermatozoides normales en individuos fértiles, las anomalías incluyen defectos en la cabeza, del segmento intermedio, la cola y la presencia de gotas citoplasmáticas mayores de 1/3 a 1/2 del tamaño de una cabeza normal (Toro, 2009).

Para empezar el proceso de preservación de los espermatozoides es necesario la adición de algún dilutor para la sobrevivencia espermática fuera del tracto reproductivo. La muestra colectada (fracción espermática) debe ser diluida lo más pronto posible, en un recipiente estéril y hermético, para proceder a la refrigeración inmediata (Bonilla *et al.*, 2007).

Los dilutores son sustancias que contienen materiales orgánicos como la yema de huevo y la leche (Pineda *et al.*, 2007) y azúcares (Sánchez, Rubilar y Gatica, 2002), y brindan protección a los espermatozoides durante el descenso de temperatura, ya que estos disminuyen la tasa metabólica y prologan su longevidad (Watson, 1995), a su vez los protegen de posibles daños a nivel de membranas, proveen energía, estabilizan el pH y la osmolaridad (Marshall, 1990). Los antibióticos, presentes también en los dilutores, evitan la proliferación bacteriana, especialmente en aquellos que contienen yema de huevo (Rota, Strom y Fosberg, 1995).

Uno de los dilutores más usados en caninos es el Tris-citrato con 20% de yema de huevo (TYH) (Stornelli *et al.*, 2002), el cual permite una tasa de

preñez aceptable, del 62.5% (Aisen, Medina y Venturino, 2002; Fosberg, 1995; Rota *et al.*, 1995). Este dilutor se ha comprado con dilutores preparados a base de leche y yema de huevo; y crema de leche y yema de huevo, observándose resultados similares en motilidad e integridad de membrana (Rota *et al.*, 1995). Los dilutores con base de yema de huevo obtuvieron, en caninos, parámetros seminales significativamente mayores que el TYH en semen refrigerado por 24, 48 y 72 horas a 4°C o a 15°C (Stornelli *et al.*, 2002).

El tipo de dilutor y la temperatura de almacenamiento son factores que influyen directamente en la capacidad fecundante luego de la refrigeración (Watson, 2000). Por ello, el manejo de la temperatura para preservar la calidad del semen es fundamental. Se debe bajar la temperatura de manera controlada y progresiva, para prevenir el shock térmico y permitir la conservación de los espermatozoides por varias horas hasta varios días (Santana, 2015). El descenso de la temperatura a 4°C disminuye la actividad metabólica, manteniendo los espermatozoides con vida, esto debido a que disminuye la utilización de ATP como fuente de energía, y por ende disminuye la producción de ROS, sin embargo, los niveles máximos de producción de ROS durante la criopreservación se han reportado en esta temperatura (Saleh y Agarrwal, 2002). Para poder detener completamente la actividad metabólica es necesario que la temperatura sea inferior a -130°C (Medeiros *et al.*, 2002). La reducción de la temperatura también disminuye el crecimiento bacteriano y prolonga la viabilidad de los espermatozoides (Palma, 2001).

Para el transporte existen cajas acolchadas con dispositivos de frío y espacios para conservar y proteger el semen procesado. Este debe enviarse rápidamente con identificación y certificado sanitario del animal. Siempre teniendo el cuidado necesario ya que se trata de material biológico no peligroso (Kutzler, 2005).

2.3. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), son moléculas producidas como parte de la metabolización del oxígeno, estas se dividen en dos grupos radicales libres y no radicales (Fuchs, Thiele y Ochsendorf, 1997). Los radicales libres de oxígeno son moléculas que poseen uno o más electrones no apareados rotando en sus orbitas externas (Warren, Johnson y Ward, 1987). Debido a esta inestabilidad son sumamente activos y altamente oxidantes porque el electrón no apareado busca escapar de su desequilibrio y debe oxidar, o sea, extraer un electrón a cualquier molécula vecina, modificando su estructura y transformándola a su vez en otro radical libre (Fridovich, 1998). De este modo es capaz de promover reacciones en cadena (Fuchs *et al.*, 1997). En cambio, los no radicales son aquellas moléculas que tienen los electrones apareados rotando en sus orbitas externas, en un inicio por si solas no son altamente oxidantes, pero podrían dar origen a especies reactivas más letales para la célula, como el radical hidroxilo (Cárdenas y Pedraza, 2006).

En las mitocondrias, el oxígeno reacciona con el hidrógeno, en un proceso denominado fosforilación oxidativa. Como parte de esta reacción química el oxígeno molecular (O_2) al formar agua H_2O gracias a una reducción tetravalente del O_2 (Fridovich, 1998). En una reacción secundaria, la fosforilación oxidativa puede tomar un camino alterno, produciendo como consecuencia las ROS por una disminución univalente del oxígeno (Fuchs *et al.*, 1997). Las ROS incluyen superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH) altamente reactivo. El O_2^- puede generarse a partir de los complejos I y III (que se muestran en B de la Ilustración 1) o mediante la oxidación de NADPH por las NADPH oxidasas. La subsiguiente reducción de H_2O_2 es catalizada por la superóxido dismutasa (SOD). El H_2O_2 puede reducirse aún más y formar agua (H_2O) mediante catalasa o puede oxidar el hierro (Fe^{2+}) de forma espontánea para formar el altamente reactivo OH. En condiciones de estrés oxidativo, cuando la generación de ROS supera el sistema de eliminación de ROS, los niveles acumulados de ROS oxidan y dañan varios componentes celulares. La

cadena de transporte de electrones de los complejos I, II, III y IV aprovechan los electrones de NADH en una serie de reacciones redox, que se acoplan para bombear protones (H^+) en el espacio intermembrana mitocondrial. La fuerza motriz protónica, es una combinación del potencial de membrana (carga) y el gradiente de concentración de protones, esta energía potencial es utilizada para la síntesis de ATP (complejo V). Normalmente, el O_2 actúa como el receptor final de electrones del complejo IV, pero una reducción aberrante del O_2 puede ocurrir en los complejos I y III, lo que lleva a la generación de $O_2^{\cdot-}$.

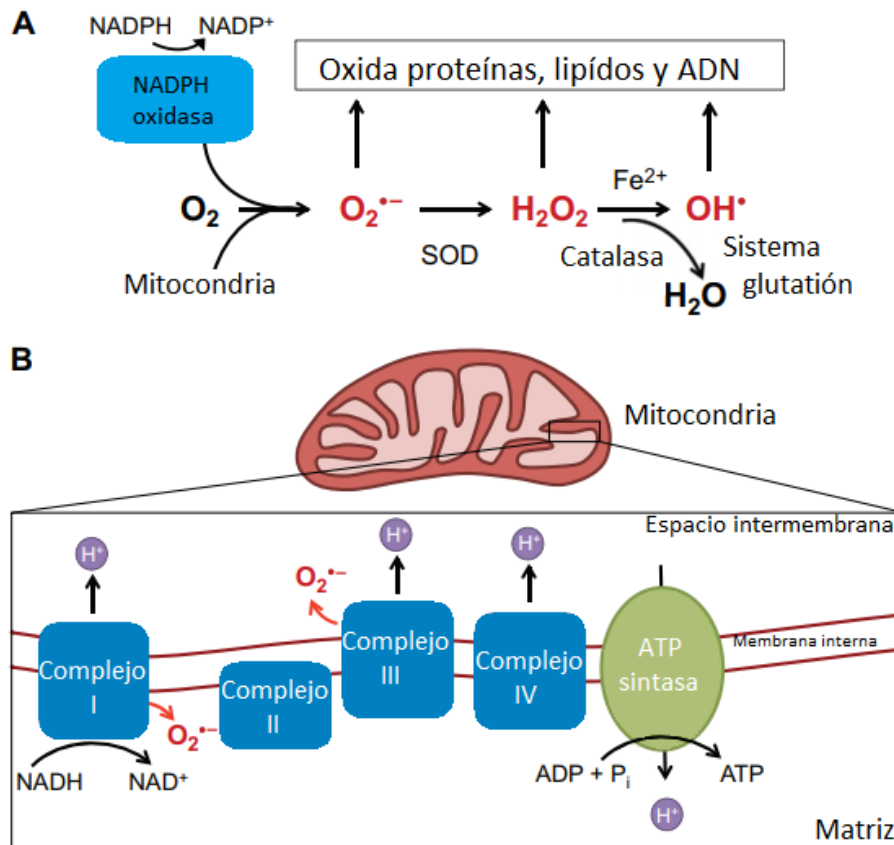


Ilustración 1. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). (A) Secuencia de las Producción de las ROS ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y OH^{\cdot}). (B) Cadena de transporte de electrones de los complejos I, II, III y IV, y la generación de $O_2^{\cdot-}$.

Fuente: Modificado de Bigarella, Liang y Ghaffari, 2014.

La formación de ROS se debe a la toxicidad del oxígeno. Se conoce que el oxígeno es necesario para la vida, pero puede resultar tóxico cuando se encuentra en altas o bajas concentraciones, a este hecho se le conoce como la “paradoja del oxígeno” (Cárdenas y Pedraza, 2006), las principales especies parcialmente reducidas son: anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (Hansberg, 2002).

El anión superóxido (O_2^-), es el radical libre más abundante y común a nivel celular, se origina al añadir un electrón al oxígeno cuando este se encuentra en su estado fundamental (Corrales y Muñoz, 2012), Su generación se da en las mitocondrias (Baker y Aitken, 2004) y el retículo endoplasmático (Fuchs et al., 1997). Fundamentalmente, el deterioro ocasionado por el O_2^- se debe a su conversión hacia especies más reactivas, como el anión radical superóxido (Fuchs et al., 1997).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), no es un radical libre ya que no posee electrones desapareados en sus orbitas externas (Cárdenas y Pedraza, 2006), se produce por la reducción parcial del oxígeno, por aceptación de 2 electrones, sin embargo, la unión entre O-O en el H_2O_2 es muy débil y se puede desintegrar, en presencia de metales de transición como el hierro reacciona dando origen al radical hidroxilo (OH^\bullet) (Corrales y Muñoz, 2012).

El radical hidroxilo (OH^\bullet) posee alta reactividad, tiene vida media corta porque reacciona de manera rápida y específica con blancos celulares como el ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos (Fuchs et al., 1997). La formación del OH^\bullet se puede lograr por la reacción Haber-Weiss, al reaccionar el O_2^- y el H_2O_2 (Halliwell y Gutteriedge, 1999):



Por otro lado, se puede formar OH^\bullet desde el H_2O_2 al ser catalizado por la presencia de iones de metales de transición como lo muestra la reacción de Fenton (Halliwell y Gutteriedge, 1999):



Tiene una capacidad superior de causar daños a nivel celular debido a que las células no cuentan con un sistema enzimático antioxidante contra este radical (Corrales y Muñoz, 2012).

2.4. ESTRÉS OXIDATIVO

Se denomina estrés oxidativo a la exposición de las células a diversas fuentes que producen ruptura del balance entre los factores oxidantes y los mecanismos de defensas antioxidantes, esto puede deberse a un aumento en la producción de ROS o por la disminución en los sistemas antioxidantes o de reparación (Cárdenas y Pedraza, 2006). Esta situación daña las macromoléculas, genera alteraciones estructurales y funcionales en cualquier célula, ocasionando daño celular (Viada *et al.*, 2017).

La forma en que el exceso de ROS produce estrés oxidativo es mediante el daño de la membrana de las células, producido por la alteración de la osmolaridad, formándose fosfatos de calcio poco solubles, agotamiento del ATP, activación de enzimas proteolíticas y fosfoglucolipídicas, lo que produce daño proteico y lipídico, y alteraciones en el ADN, conduciendo a la muerte celular (Villa, 2009).

2.5. ESTRÉS OXIDATIVO SEMINAL

El estrés oxidativo seminal consiste en el daño de los componentes estructurales y fisiológicos en los espermatozoides, como consecuencia de enormes cantidades de ROS o por leucocitos activados presentes en el plasma seminal (Córdova *et al.*, 2009; Santiani, 2013), generando disminución de la capacidad fecundante y de la sobrevivencia (Villa, 2009).

Los espermatozoides son sensibles a las ROS por su poca cantidad de enzimas antioxidantes, su gran contenido de ácidos grasos poliinsaturados presentes en su membrana plasmática y a la presencia del sistema NADPH oxidasa (Wai-Sum, Che, Chow, 2006). La producción de elevadas cantidades de ROS se relaciona con la presencia de espermatozoides con anomalías morfológicas, como el exceso de citoplasma residual durante la formación de los espermatozoides a nivel testicular (Aitken *et al.*, 1994), debido a la presencia de la enzima G6PD, que estimula el complejo multi-enzimático NADPH oxidasa, este sistema está localizado en la membrana espermática, se compone de proteínas, las cuales forman un centro catalizador de la oxidasa (Vélez, Rocha, Arias y López., 2016). Asimismo, se ha descrito en humanos y equinos que la adición de calcio ionóforo (aumenta la permeabilidad de la membrana de lípidos) se relaciona con la producción elevada de ROS (Aitken *et al.*, 1994), así como el tiempo de incubación y la concentración de los espermatozoides (Ball y Vo, 2002).

Según Aitken y Fisher (1994), en los espermatozoides podemos encontrar ROS radicales (radical peróxido (ROO.), radical hidroxilo (OH.) y anión superóxido (O_2^-) y ROS no radical (peróxido de hidrógeno (H_2O_2)). Siendo este último el producto oxidativo más nocivo para los espermatozoides (Córdova *et al.*, 2009).

2.6. CONSECUENCIAS PATOLÓGICAS DE ROS EN EL SEMEN

Las consecuencias patológicas producidas por las ROS en espermatozoides comprenden la disminución de la motilidad de los espermatozoides (Baumber *et al.*, 2002; Bilodeau, Blanchette, Gagnon y Sirard, 2001), incremento de la peroxidación lipídica en la membrana espermática (Santiani, 2012), disminución de la capacidad para la fusión espermatozoide-ovocito (Blondin, Coenen y Sirard, 1997) y aumento de la

fragmentación del ADN (Santiani, 2012), afectando la fertilidad (Aitken, 1994).

Peris, Bolideau, Dufour y Bailey (2007) indican que la presencia de ROS en grandes cantidades genera una disminución en la motilidad espermática. Aitken, Baker y Nixon (2015), señalan que esto se debe a que el aumento de ROS en la mitocondria desencadena la cascada de peroxidación lipídica, donde las ROS atacan a los ácidos grasos poliinsaturados que abundan en los espermatozoides, lo que conlleva a un bloqueo de los complejos I-V de las mitocondrias por lo que el intercambio iónico se detiene y como consecuencia no hay producción de ATP y el espermatozoide queda sin energía, disminuyendo así la motilidad. Las ROS también tienen la capacidad de desencadenar la peroxidación lipídica en la membrana espermática, inhibiendo la actividad fructolítica y respiratoria del espermatozoide y llevándolo a la muerte (Santiani, 2012).

La peroxidación lipídica es el deterioro oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados producido por las ROS (Saleh y Agarwal, 2002). Los espermatozoides son bastante sensibles a las ROS debido a su elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Michael *et al.*, 2007). En la membrana espermática se presentan enlaces dobles y esto debilita la unión C-H en los átomos de carbono adyacentes y facilita la extracción de hidrógeno, lo que conduce al estrés oxidativo (Aitken y Ficher, 1994).

El H_2O_2 y el O_2^- por si solos no inician la cascada de peroxidación lipídica, pero estos pueden formar al radical hidroxilo (OH^*), quien reacciona ante la presencia de metales de transición (Fe y Cu) y desencadena la peroxidación lipídica. El OH^* sustrae un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado de la membrana plasmática y forma un radical lipídico (R^*), luego este interacciona con el oxígeno y forma radical lípido peroxilo (ROO^*), este radical propaga la cadena de peroxidación lipídica al tomar un átomo de hidrógeno de un ácido graso vecino, para estabilizarse como peróxido lipídico ($ROOH$). De esta manera se propaga

el daño en la membrana plasmática (Fuchs *et al.*, 1997), tal como se observa en la Ilustración 2 así se produce la peroxidación lipídica.

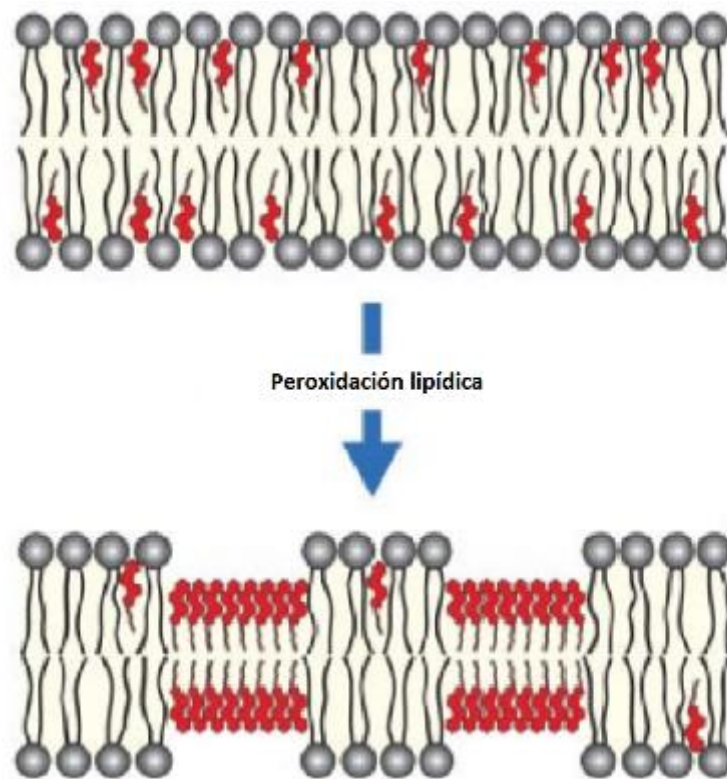


Ilustración 2. Efectos de la Peroxidación Lipídica sobre la Membrana Plasmática.

Fuente: Modificado de Jacob y Manson, 2005.

Otra de las consecuencias más importantes de las ROS en los espermatozoides es la fragmentación del ADN (Membrillo *et al.*, 2003). Se ha demostrado que las ROS originadas por medio de la criopreservación incrementan la desintegración del ADN en ovinos (Peris *et al.*, 2007) y caninos (Sue-Hee, Do-Hyeon y Yong-Jun, 2010). Wai-Sum *et al.* (2006) indicaron que un espermatozoide con daño en el ADN tiene capacidad fecundante, pero puede estar relacionado a pérdidas tempranas del embrión, problemas de implantación y anomalías estructurales embrionarias.

La lesión en el ADN del espermatozoide se origina porque las ROS restan un átomo de H⁺ de las unidades de ribosa del ADN, lo que desestabiliza

la cadena del ADN y la fragmenta. Cuando se produce este daño en el ADN, los espermatozoides inician un proceso de muerte celular, parecido a la apoptosis (Santiani, 2012).

2.7. GENERACIÓN DE ROS MIENTRAS SE PRODUCE EL DESCENSO DE TEMPERATURA.

La disminución gradual de la temperatura en la refrigeración estimula la producción de O_2^- (Chatterjee y Gagnon, 2001). A pesar de que una elevada producción de ROS es dañina para los espermatozoides (Griveau y Lannou, 1997), en presencia de bajas cantidades de ROS, producto del enfriamiento hasta 5°C, se da inicio un proceso similar a la capacitación, produciéndose alteraciones morfológicas y funcionales en los espermatozoides, esto se ha descrito en algunas especies, como en el cerdo (Watson, 1996).

Una investigación reveló que en espermatozoides caninos los niveles de H_2O_2 intracelular incrementan luego del proceso de criopreservación (Sue-Hee, Yong-Jun y Yong-Jun, 2011). También, en humanos, se ha descrito un incremento significativo de ROS durante el enfriamiento, observándose niveles máximos a los 4°C (Wang, Zhang, Ikemoto, Anderson y Loughlin, 1997; Saleh y Agarwal, 2002). Ball y Vo, 2002, reportaron que en espermatozoides equinos incrementa la peroxidación lipídica incrementa cuando son sometidos a refrigeración a 5°C.

Durante la refrigeración, la temperatura de la suspensión espermática se reduce desde la temperatura fisiológica hasta una temperatura por encima ligeramente de los 0°C. Esta situación sensibiliza a los espermatozoides, en especial si el descenso de temperatura se realiza de forma brusca, a eso se le conoce como “shock térmico” (Parks, 1997) o “daño por enfriamiento extremo” (Watson, 1990, 1995).

La sensibilidad al shock térmico está determinada por ciertos componentes como los fosfolípidos y los ácidos grasos de la membrana espermática (Poulos *et al.*, 1973). El shock térmico se produce cuando se altera la organización de los lípidos de la membrana espermática (Drobnis *et al.*, 1993). En una temperatura fisiológica los fosfolípidos están en un estado fluido y sus cadenas de ácidos grasos son flexibles (De Leeuw, Leboeuf, y Chemineau, 1990). Cuando la temperatura de la membrana disminuye por debajo de la temperatura de organización de los lípidos de la membrana espermática, estos sufren la fase de transición termotrófica del estado líquido-cristalino al estado gel, comenzando a juntarse (Quinn, 1989). Esto resulta en rigidez de las cadenas de ácidos grasos y se aíslan de dominios de gel (De Leeuw *et al.*, 1990). Esto afecta las funciones como el reconocimiento del ovocito, afecta el transporte de moléculas y su capacidad fértil, también se afectan los canales celulares, ya que las proteínas de membrana se encuentran unidas por fosfolípidos experimentan cambios estructurales que se traducen en una alteración funcional, haciendo que la membrana se torne más permeable (Cortés *et al.*, 2006).

El shock térmico ocurre al pasar por un enfriamiento rápido de 20 a 0°C, aunque el daño resulta más severo entre los 12 y 2°C (Watson, 1995). Estos daños se pueden atenuar controlando la velocidad de enfriamiento (<10°C/min) hasta cerca de los 4°C (Parks, 1997). Pero a pesar de estas medidas de enfriamiento lento, este también daña al espermatozoide, pero de manera menos severa y extensa (Watson, 1990). Green y Watson (2001), plantearon que el enfriamiento del medio del espermatozoide reduce la vida útil del espermatozoide, y aumenta el número de espermatozoides criocapacitados, la capacitación ocurre de forma fisiológica y se da a nivel del tracto reproductor de la hembra (en el istmo), pero en la criocapitación esto ocurre fuera del tracto reproductor por lo que posteriormente al realizar la IA los espermatozoides no podrán fecundar, produciendo una disminución de la fertilidad.

No obstante, cuando los espermatozoides son incubados a temperaturas inferiores a cero, las cantidades de ROS producidas son considerablemente menores (Wang *et al.*, 1997). Estas baja temperaturas reducen la actividad metabólica de los espermatozoides, porque por efecto de la congelación la formación de ROS disminuye (Hernández, Delgado, López, Martínez y Mallok, 2010). La producción ROS en grandes cantidades en la criopreservación se vincula con la presencia de ROS en semen fresco, así la probabilidad de que exista un aumento significativo de ROS luego del proceso de criopreservación es mayor cuando la muestra de semen tiene presencia de ROS antes de la criopreservación (Mazzilli *et al.*, 1995; Tselkas, Saratsis, Karagianidis y Samoulidis, 2000). Pero también se puede evidenciar que en muestras de semen sin ROS previo a la criopreservación puede haber un incremento de las cantidades de ROS (Mazzilli *et al.*, 1995; Tselkas *et al.*, 2000). Por este motivo, es que es de suma importancia que durante la criopreservación se tomen medidas que disminuyan la producción de ROS, para optimizar la calidad del semen posterior al proceso congelamiento-descongelamiento (Paparella, Pavesi, Feldman y Bouvet, 2015; Eskenazi *et al.*, 2005).

2.8. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ROS

Existen diversos procedimientos para evaluar la presencia de los diferentes tipos de ROS, en el caso de medición intracelular de H_2O_2 y O_2 -se emplea dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA) y dihidroetidio (DHE) respectivamente (Cárdenas y Pedraza, 2006). La evaluación de ambas ROS se realiza en espermatozoides vivos, ya que cuando hay muerte de los espermatozoides estos sufren ruptura de sus membranas y mitocondrias, por lo que las ROS pueden salir al medio (Bansal y Bilaspuri, 2010).

El DCFH-DA se oxida selectivamente por el H_2O_2 libre intracelular, convirtiéndose en diclorofluoresceína (DCF) que se une al ADN y emite fluorescencia verde (Mahfouz *et al.*, 2010). Como se observa en la ilustración 2.

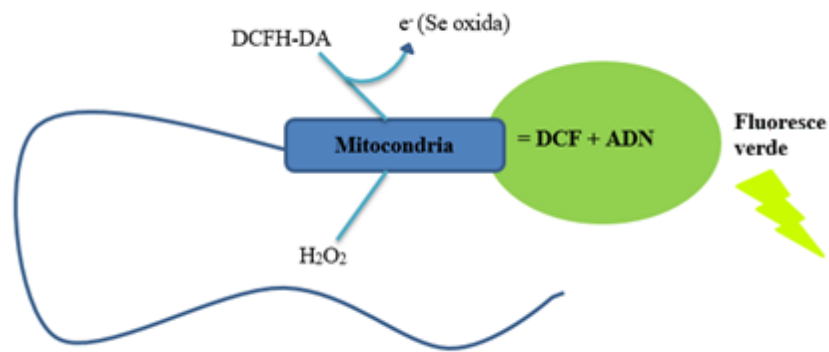


Ilustración 2. Medición de H_2O_2 Mediante DCFH-DA.

Fuente: Elaboración propia.

El DCFH-DA se emplea en combinación de Yoduro de propidio (PI), con el fin de detectar a aquellos espermatozoides que están muertos, es un marcador catiónico para registrar células en apoptosis (Martínez, 2009). Por ello se considera al PI como contra tinción. Por lo tanto, se puede observar a los espermatozoides que producen H_2O_2 fluoresciendo de color verde y los espermatozoides que están muertos fluoresciendo de color rojo.

Para evaluar la producción de O_2^- se emplea la tinción fluorescente DHE. El DHE es oxidado por el O_2^- libre intracelular, resultando en 2-hidroxyetidium, este se une al ADN y emite fluorescencia roja (Mahfouz *et al.*, 2010). Como se observa en la ilustración 4.



Ilustración 4. Medición de O_2^- con DHE.

Fuente: Elaboración propia.

Sánchez, Santiago, Vargas y Mendoza (2004) establecieron que la quimioluminiscencia era el método más específico para determinar la presencia de O_2^- intracelular. Sin embargo, posteriormente en el 2007 (Burnaugh, Sabeur y Ball) y en el 2009 (Martínez) demostraron que el mejor método era emplear DHE, ya que era mucho más certero y se unía específicamente al ADN.

El DHE se emplea en combinación de YO-PRO1, con el fin de detectar a aquellos espermatozoides que están muertos, es un marcador de ADN para evaluar la apoptosis celular (Martínez, 2009). Por ello se considera al YO-PRO1 como contra tinción. Por lo tanto, se puede observar a los espermatozoides que producen O_2^- fluoresciendo de color rojo y los espermatozoides que está muertos fluoresciendo de color verde.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LOCALIZACIÓN Y AMBIENTE

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Reproductiva animal de la Universidad Científica del Sur, ubicada en Villa el Salvador, Lima, Perú.

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

El presente estudio contó con un total de 15 muestras seminales de 4 canes sanos de raza afgano, con un rango de edad entre 1 a 6 años. Para obtener este tamaño muestral se empleó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Dónde:

- N: total de población (4 machos)
- Z α : 1.96 al cuadrado (la seguridad es del 95%)
- P: Proporción esperada (5%=0.05)
- q: 1-p (sería 1-0.05=0.95)
- d: Precisión (5%=0.05)
- Resultando: 14.9856 = 15

La población de animales empleados para el estudio pasó por un periodo de abstinencia y una rotación programada. Todos los animales pertenecieron al mismo criadero por lo que tuvieron el mismo tipo de alimentación, eran animales sanos con controles sanitarios (negativos a cualquier enfermedad) y fértiles (con al menos una preñez registrada), asimismo las muestras seminales pasaron por una evaluación inicial para ingresar al estudio, los criterios de inclusión fueron concentración, motilidad, viabilidad, color, pH y volumen. Así se esperaba que la calidad seminal fuera la misma para todos los animales.

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL MODELO, GRUPOS EXPERIMENTALES, SECUENCIA DE OPERACIONES EXPERIMENTALES.

3.3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se trabajó con un diseño experimental de muestras repetidas. Para dicha investigación cada muestra seminal fue dividida en 2 alícuotas iguales de 0.5 mL y luego cada alícuota fue asignada aleatoriamente a uno de los grupos, con o sin dilutor (G1: con dilutor y G2: sin dilutor). Ambos grupos fueron evaluados a las 0, 2 y 4 horas a fin de evaluar la producción de ROS (H_2O_2 y O_2^-) en los espermatozoides caninos, para determinar su variación en el tiempo. A continuación, se muestra el esquema de trabajo (Ilustración 5):

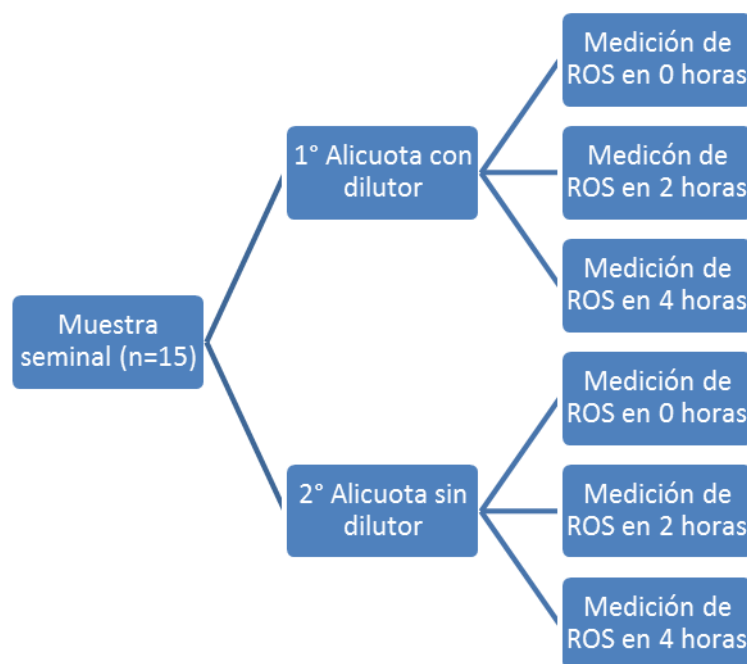


Ilustración 5. Esquema de Trabajo.

Fuente: Elaboración propia.

3.3.2. COLECTA DE SEMEN

La colecta se realizó en un criadero de raza afgana, luego las muestras seminales fueron llevadas inmediatamente al laboratorio de biotecnología reproductiva animal de la universidad científica del sur. Antes de realizar la colecta se realizó la higienización de la región abdominal y prepucial del perro, con el fin de evitar cualquier contaminación, la colecta se realizó

por estimulación manual del bulbo del pene, el eyaculado se colectó en un beaker de vidrio de 50 ml previamente entibiado a 37°C y luego se almacenó en un tubo de propiopileno de 15 mL también temperado.

3.3.3. EVALUACIÓN BÁSICA Y MANEJO DE LA MUESTRA

A la muestra colectada se le realizó una evaluación macro y microscópica básica, con el fin de para determinar si se incluiría o no en el estudio. Las muestras que se incluyeron en el estudio debían cumplir con los siguientes parámetros: concentración mínima de 60 millones spz/ml, motilidad del 70% y viabilidad del 70%, las muestras que no estaban dentro de estos parámetros fueron descartadas.

Dentro del estudio macroscópicos que se evaluó el color, el pH (utilizando cinta colorimétrica) y el volumen del eyaculado (se midió por medio del tubo colector). Los parámetros microscópicos medidos fueron evaluados en el laboratorio de biotecnología reproductiva animal, donde se observó motilidad y viabilidad, en una lámina porta objeto temperada mediante un microscopio a objetivo 40X se evaluó los movimientos de los espermatozoides, también se evaluó la concentración espermática, utilizando la cámara de Neubauer para el conteo de espermatozoides.

Inmediatamente después, se realizó la preparación del dilutor a base de leche descremada (50 ml), 5% v/v de yema de huevo (2.5 mL), y fructosa a una concentración final de 50 mmol (1.1260 gr). Lo primero que se hizo fue temperar a 37°C la leche, luego en un beaker de vidrio se midió 40 mL de leche a la cual se le añadió la fructosa, luego se completó con leche hasta los 50 mL, se homogenizó y se extrajo el 5% del volumen total (2.5 mL) y se repuso la misma cantidad de yema de huevo (2.5 mL) y se volvió a homogenizar el preparado.

Finalmente, las 15 muestras seminales se dividieron en 2 alícuotas de 0.5 mL cada una, y se asignaron aleatoriamente en uno de los dos grupos, con dilutor (tratamiento) y sin dilutor (control), como se muestra en la ilustración 4. Al grupo con dilutor se procedió a hacer la dilución, la relación fue de 1:1, 1 mL de semen con 1 mL de dilutor. Ambos grupos se almacenaron en tubos de prolipropileno de 15 mL y se llevaron inmediatamente a refrigeración (5°C). Posterior a esto, se realizaron las mediciones de ROS a las 0, 2 y 4 horas.

3.3.4. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ROS

Para evaluar la producción de ROS en los espermatozoides cada alícuota (sin dilutor y con dilutor) fue procesada de la siguiente manera: se lavaron, con el fin de retirar tanto el dilutor como el plasma seminal. Se tomó 200 µL de semen de cada alícuota y se les añadió 1.5 ml de PBS temperado, para luego centrifugarlas a 600 rpm por 5 minutos. Posterior a esto, se extrajeron los sobrenadantes con una pipeta, con cuidado de no atraer el pellet formado (espermatozoides aglomerados). Luego se reconstituyeron los pellets obtenidos con 500 µL de PBS.

Para evaluar la producción de peróxido de hidrógeno en los espermatozoides, se procedió a tomar 100 µL de la muestra y se le añadió 1 µL de la solución stock de DCFH-DA, se incubó a 25°C por 40 minutos en oscuridad. Después a la incubación, se le agregó 1 µL de Yoduro de propidio (PI) y se homogenizó, como contra tinción para detectar espermatozoides muertos. Para la lectura se colocó 20 µL de la solución final en una lámina porta objeto, se extendió y leyó inmediatamente en oscuridad. Los espermatozoides que se veían con fluorescencia verde eran los que estaban produciendo peróxido de hidrógeno, lo que significaría que estaban vivos, en cambio si fluorescían rojo se interpretaría como muertos, que no producen peróxido de hidrógeno. Como se muestra en la ilustración 6 y 7.

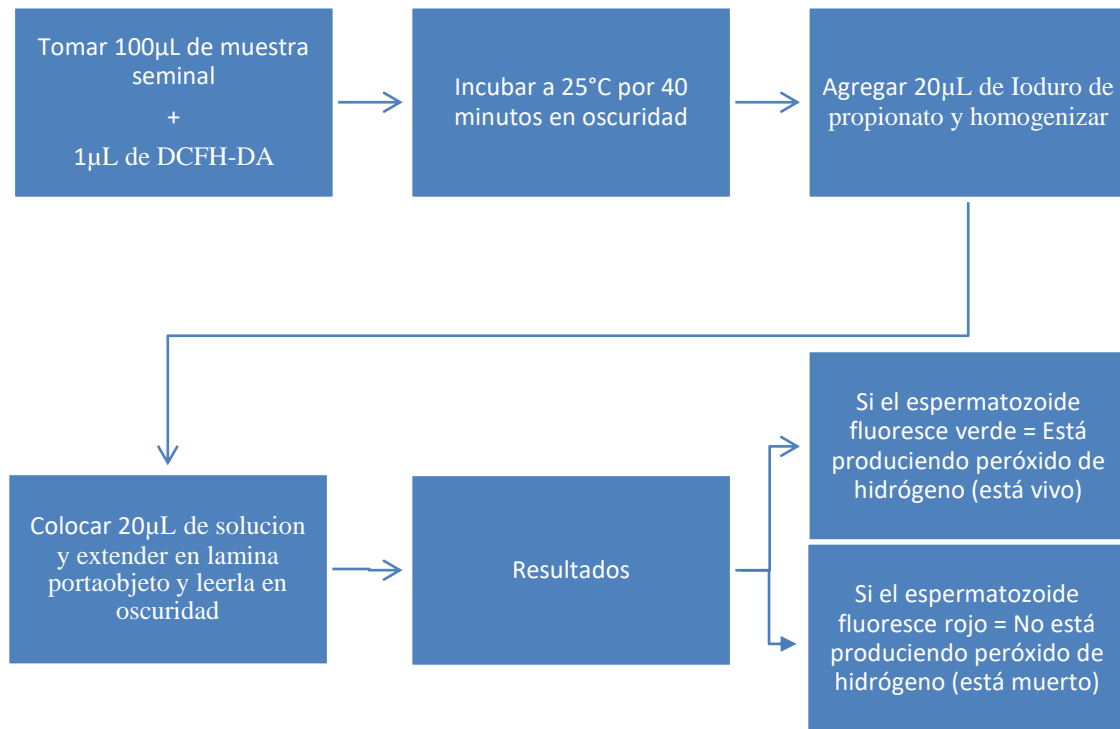


Ilustración 6. Protocolo de Evaluación de H₂O₂.

Fuente: Elaboración propia.

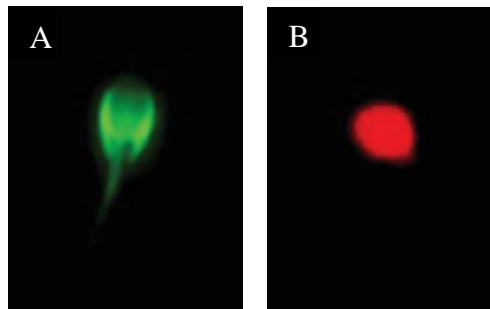


Ilustración 7. A) Fluorescencia Verde en el Espermatozoide vivo con de H₂ O₂. B) Fluorescencia Roja Indica Espermatozoide Muerto sin Produccion de H₂ O₂.

Fuente: Elaboración propia.

Para evaluar la producción de anión superóxido en espermatozoides, se procedió a tomar 100 µL de muestra y se le añadió 10 µL de la solución de stock de DHE y se incubó a 25°C por 20 minutos en oscuridad.

Después de la incubación, se le agregó 1 μL de YO-PRO1 como contra tinción para detectar espermatozoides muertos. Para la lectura se colocó 20 μL de la solución final en una lámina porta objeto, se extendió y se leyó inmediatamente en oscuridad. Los espermatozoides que se veían con fluorescencia roja estarían produciendo anión superóxido, lo que significaría que estaban vivos, en cambio si fluorescían verde se interpretaría como muertos, que no producen anión superóxido. Como se observa en la ilustración 8 y 9.

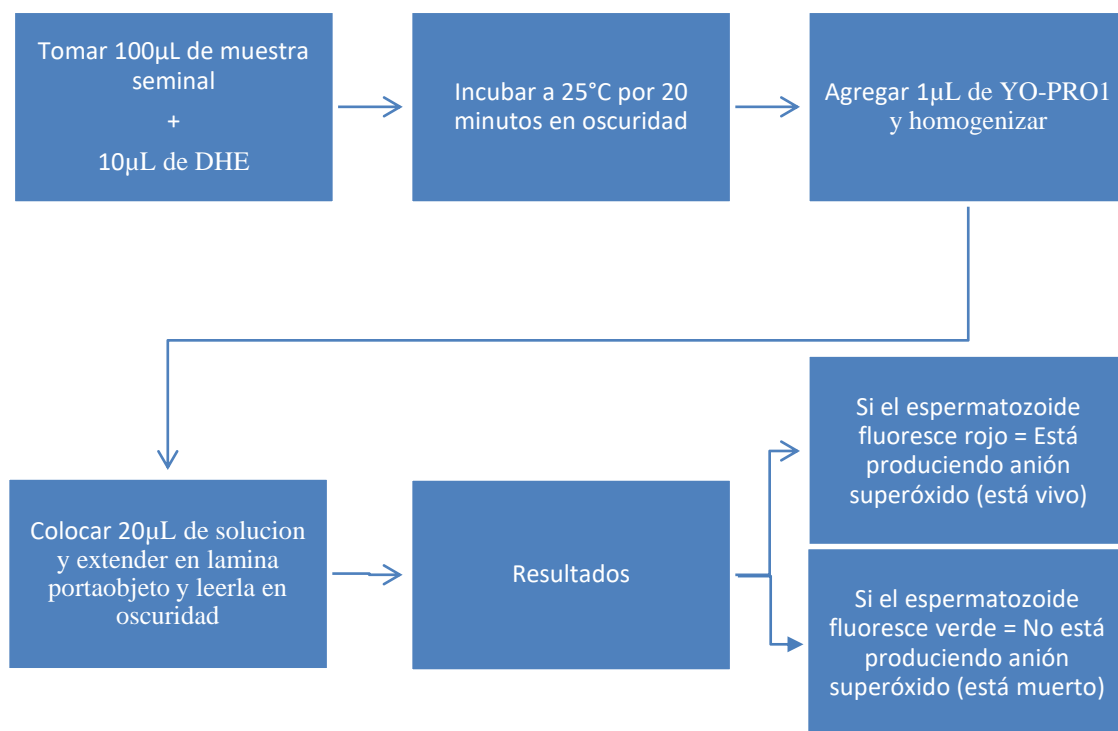


Ilustración 8. Protocolo de Evaluación de O_2^- .

Fuente: Elaboración propia.

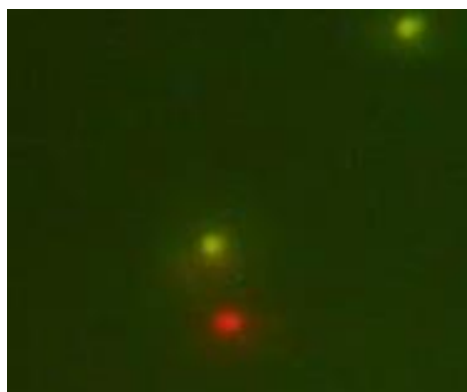


Ilustración 9. Espermatozoides Fluoresciendo: Fluorescencia Verde en Espermatozoides Muertos que Indica que no Producen O₂⁻, Fluorescencia Roja en Espermatozoides Vivos que Indica que Producen O₂⁻.

Fuente: Elaboración propia.

3.4. ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis de datos se empleó el programa estadístico Prism® (V3.0, EE.UU.). Los datos se ajustaron empleando la fórmula del Arcoseno.

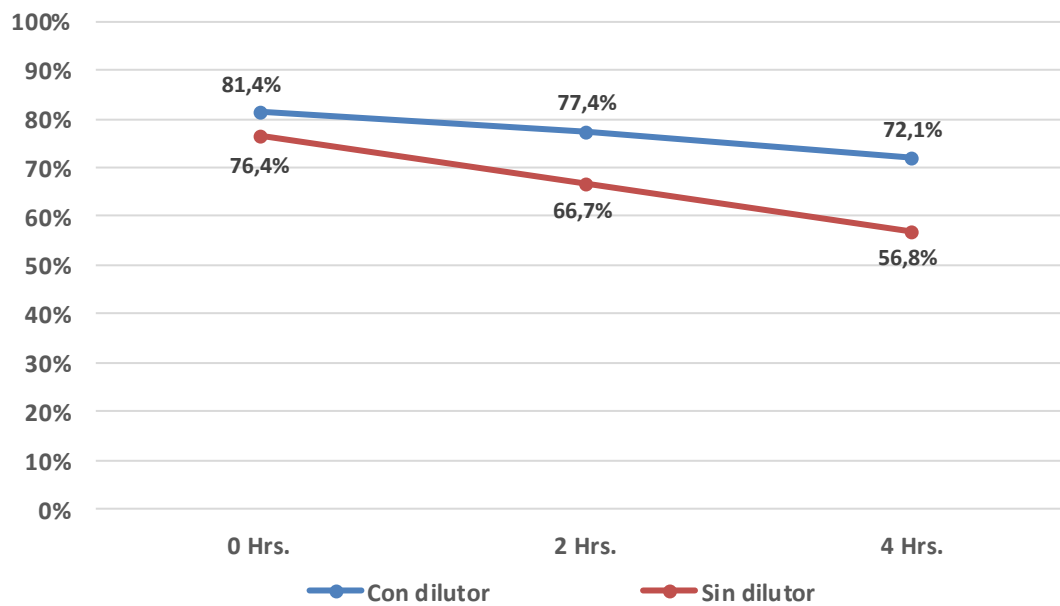
La finalidad del trabajo fue evaluar simultáneamente si la presencia o ausencia de dilutor influyó en la producción de ROS en los espermatozoides, para esto se trabajó cada grupo y se dividió en 3 tratamientos, dando en total 6 grupos. Luego se realizó un ANOVA de 2 vías para estudiar simultáneamente el uso o no de dilutor. Posteriormente a estos resultados se les aplicó el post-test de Bonferroni para comparar y determinar si existe diferencia significativa entre uno y otro.

IV. RESULTADOS

4.1. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Se observa, que a medida que avanza el tiempo de refrigeración a una temperatura de 5°C, el porcentaje de producción de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en los espermatozoides va disminuyendo en ambos grupos (con y sin dilutor). Asimismo, se logra visualizar que las muestras que contenían dilutor, a lo largo del tiempo, presentaron un mayor porcentaje de espermatozoides que produjeron H₂O₂, a diferencia del grupo sin dilutor (cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentaje de espermatozoides que producían peróxido de hidrógeno en los grupos con y sin dilutor a las 0, 2 y 4 horas a 5°C.



Para evaluar la influencia de la presencia o ausencia del dilutor se analizaron los promedios de los porcentajes de espermatozoides que producían H₂O₂ en ambos grupos, sin tomar en cuenta el tiempo de exposición. Observándose que los grupos que no presentaban dilutor tenían un promedio de producción de H₂O₂ de 66.63%, mientras que el grupo que con dilutor tenía un 76.99% de producción de H₂O₂, lo cual numéricamente es muy similar, pero desde el punto de vista estadístico existe una diferencia estadística significativa, con un P=0,0028 (cuadro 2).

Cuadro 2. Promedio los porcentajes de espermatozoides que producían peróxido de hidrógeno en el tiempo, en los grupos con y sin dilutor a 5°C.

	Espermatozoides sin dilutor	Espermatozoides con dilutor	P value
Promedio	66.63 % ^a	76.99 % ^b	0,0028

*ab letras diferentes en columnas muestran diferencia estadística significativa

Para evaluar la influencia de los tiempos se analizaron los promedios de los porcentajes de espermatozoides que producían de H₂O₂ en las 0, 2 y

4 horas, sin tomar en cuenta la presencia o ausencia del dilutor, observándose que a las 0 horas el 78.92% de los espermatozoides producía H₂O₂, a las 2 horas el 72.03% producía H₂O₂ y a las 4 horas el 64.47% producía H₂O₂, lo cual indica que existe una diferencia no solo numérica sino también estadística significativa, P=0,0028 (Cuadro 3).

Cuadro 3: Promedio de los porcentajes de espermatozoides que producían peróxido de hidrógeno en las 0, 2 y 4 horas de los dos grupos a 5°C.

	0 horas	2 horas	4 horas	P value
Promedio	78.92 % ^a	72.03 % ^a	64.47 % ^b	0,0032

*ab letras diferentes en columnas muestran diferencia estadística significativa

Se realizó como post-test el test de Bonferroni y se demostró que existe diferencia estadística significativa (P<0.05) entre el tiempo 4 horas con los otros dos tiempos (0 y 2 horas), lo cual indica que a las 4 horas hay una menor producción de peróxido de hidrógeno en espermatozoides en ambos grupos, ya que los espermatozoides van muriendo con el paso del en el tiempo (cuadro 4).

Cuadro 4: Test de Bonferroni

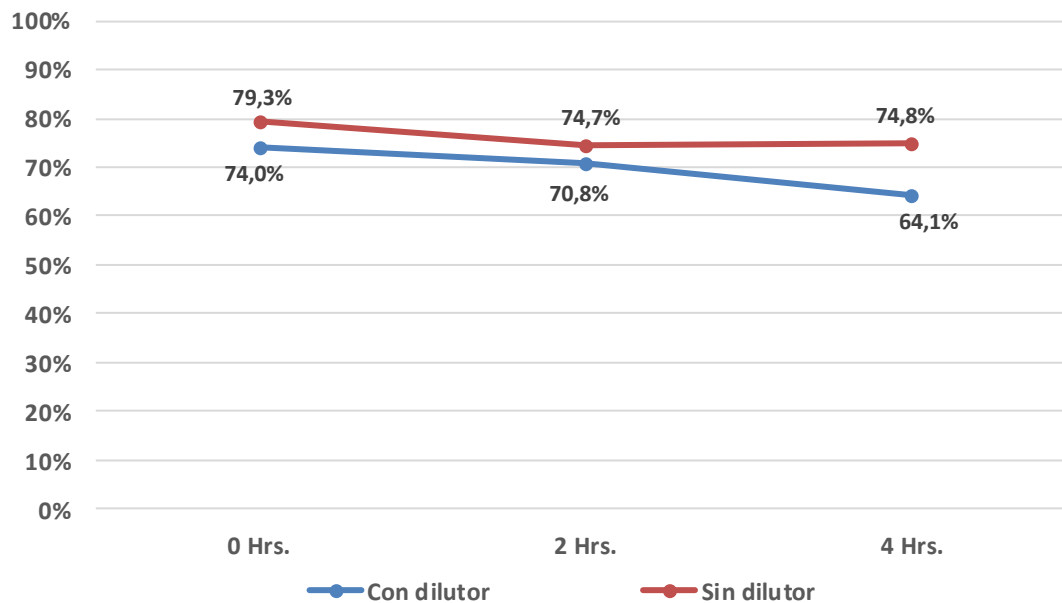
Tiempo	Sin dilutor	Con dilutor	Difference	95% CI of diff.
0	76,43 %	81,41 %	4,979	-9.265 to 19.22
2	66,65 %	77,41 %	10,76	-3.483 to 25.00
4	56,81 %	72,13 %	15,32	1.081 to 29.57

Tiempo	Difference	T	P value	Summary
0	4,979	0,8539	P>0.05	Ns
2	10,76	1,846	P>0.05	Ns
4	15,32	2,628	P<0.05	*

4.2. Anión superóxido

Se observa, que a medida que avanza el tiempo de refrigeración a una temperatura de 5°C, el porcentaje de espermatozoides que produce anión superóxido (O_2^-) permanece estable en ambos grupos (con y sin dilutor). Asimismo, se logra visualizar que las muestras que no contenían dilutor, a lo largo del tiempo, presentaron un mayor porcentaje de espermatozoides que produjeron O_2^- , a diferencia del grupo con dilutor (cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentaje de espermatozoides que producían anión superóxido en los grupos con y sin dilutor a las 0, 2 y 4 horas a 5°C.



Para evaluar la influencia de la presencia o ausencia del dilutor se evaluaron los promedios de los porcentajes de espermatozoides que producían O_2^- en ambos grupos, sin tomar en cuenta el tiempo de exposición. Observándose que los grupos que no presentaban dilutor

tenían un promedio de producción de O_2^- de 76.25%, mientras que el grupo que tenía dilutor tenía un 69.65% de producción de O_2^- , lo cual numéricamente es muy similar, pero desde el punto de vista estadístico no demostró diferencia estadística significativa (Cuadro 6).

Cuadro 6. Promedio de los porcentajes de espermatozoides que producían anión superóxido en los grupos sin y con dilutor a 5°C.

	Sin dilutor	Con dilutor	P value
Promedio	76,25 %	69,65 %	0,0704

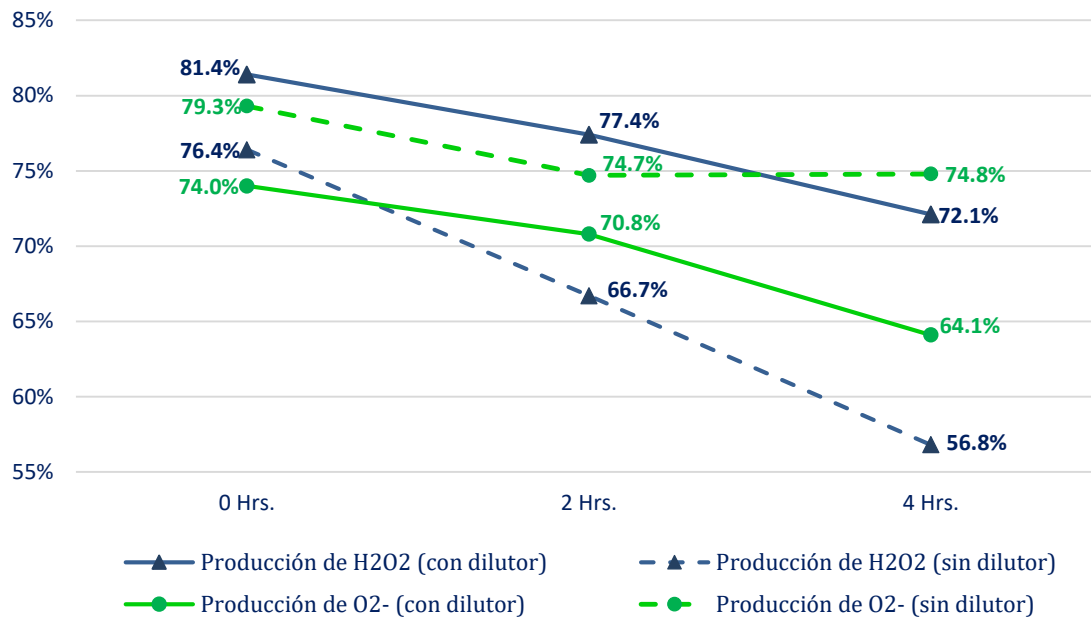
Para evaluar la influencia de los tiempos se analizaron los promedios de los porcentajes de espermatozoides que producían O_2^- en las 0, 2 y 4 horas, sin tomar en cuenta la presencia o ausencia del dilutor. Observándose que a las 0 horas el 76.67% de los espermatozoides producía O_2^- , a las 2 horas el 72.72% producía O_2^- y a las 4 horas el 69.47% producía O_2^- , lo cual indica solo una diferencia numérica ya que no hay diferencia estadística significativa, $P=0,2689$ (Cuadro 7).

Cuadro 7: Promedio de los porcentajes de espermatozoides que producían anión superóxido en las 0, 2 y 4 horas de los dos grupos a 5°C.

	t0	t2	t4	P value
Promedio	76,67 %	72,72 %	69,47 %	0,2689

Se puede observar que a medida que avanza el tiempo de refrigeración a una temperatura de 5°C, los grupos en los que se aplicó dilutor presentaron mayor porcentaje de espermatozoides que producían H_2O_2 que de O_2^- . Por lo contrario, los grupos sin dilutor presentaron mayor producción de O_2^- que de H_2O_2 . Tal como se observa en el cuadro 8.

Cuadro 8: Porcentaje de espermatozoides que producían anión superóxido y peróxido de hidrógeno en los grupos con y sin dilutor a las 0, 2 y 4 horas a 5°C.



V. DISCUSIÓN

Según lo obtenido en el presente estudio podemos ver que la presencia o ausencia de dilutor no influyó sobre la sobrevivencia de los espermatozoides caninos, esto contradice lo observado en cerdos (Torres *et al.*, 2014) y equinos (Sandoval, 2010), quienes suelen tener mayor tasa de sobrevivencia espermática en muestras que emplean dilutor.

Algo que resalta en este estudio es que la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) fue elevada desde el inicio del descenso de la temperatura, lo cual coincide con lo señalado por Watson (1995) quien especifica que muestras refrigeradas sin un descenso adecuado de la temperatura presentan shock térmico entre los 12 y 4 °C, cabe resaltar que el manejo que se le dio a las muestras buscó simular el realizado por criadores o veterinarios, que como parte de la práctica diaria colectan el semen canino y lo transportan sin dilutor en cajas de

refrigeración o coolers. Es debido a que los espermatozoides pasaron por un shock térmico, que estos antes de entrar en un estado de disminución metabólica, necesitan activar diversas fuentes energéticas como las obtenidas por la metabolización del oxígeno o de algún azúcar si es que estuviera a disposición, lo cual según lo referido por Parks (1997), activa la cadena de producción de ROS.

Cabe resaltar, que según lo referido por Chatterjee y Gagnon (2001) durante la disminución gradual de la temperatura en la refrigeración se estimula primero y en mayor proporción la producción de O_2^- , lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Debemos recordar que el oxígeno genera toxicidad cuando se produce la cadena respiratoria, esto debido a la formación de sub-productos radicales como el O_2^- o no radicales, como el H_2O_2 , el cual es producido en base al primero y siendo el responsable de causar daños los primeros daños (Cárdenas y Pedraza, 2006).

Por otro lado, hemos logrado demostrar que la presencia o ausencia de dilutor no influye sobre el porcentaje de espermatozoides que producen O_2^- . Lo cual, como ya se mencionó, se desencadenó por el descenso no controlado de la temperatura durante la refrigeración (Chatterjee y Gagnon, 2001). Debemos recordar que por más que el O_2^- no genera daños en el espermatozoide, el principal problema con la producción de este es que el H_2O_2 se genera a partir de él, siendo esta última la más dañina puesto que inicia el estrés oxidativo y genera la peroxidación lipídica (Fuchs, 1997).

Con respecto a la producción de H_2O_2 , observamos que las muestras que contenían dilutor tuvieron mayor porcentaje de espermatozoides que producían H_2O_2 . Cárdenas y Pedraza (2006) indican que la producción de ROS se da en el espacio intracelular de los espermatozoides vivos, por lo que podemos pensar que el dilutor estaría brindando protección para la sobrevivencia de los espermatozoides; sin embargo, a su vez favorecen que la cadena de producción de ROS siga su curso, es decir, que a partir

del O_2^- que inicialmente se formó, se comience a producir H_2O_2 , lo cual indicaría que el dilutor empleado no brindó protección ante la producción de H_2O_2 , sino que al parecer la estimuló. Lo cual contrastaría con lo descrito por Watson (1995) y Marshall (1990), quienes estudiaron permatozoides de animales mamíferos y de seres humanos, demostraron que los dilutores proporcionan protección a los espermatozoides de posibles daños producidos por ROS durante la refrigeración.

Recordemos que el H_2O_2 generar peroxidación lipídica, ruptura de membranas y muerte celular; es por ello, que al escapar el H_2O_2 al medio extracelular pudo generar estos daños en otros espermatozoides no dañados. Así mismo, se considera que el dilutor brindó un ambiente favorable para la producción de H_2O_2 , ya que contenía leche descremada, yema de huevo y fructosa, por lo que estos componentes, especialmente el azúcar facilitaría otra ruta metabólica para obtener energía, la glicólisis, durante el estrés térmico (Ruiz, Sandoval y Santiani, 2015), y por ende estimularían una mayor producción de H_2O_2 tanto intra como extracelularmente.

Si nosotros tomamos en cuenta el paso del tiempo en relación con la sobrevivencia de los espermatozoides, como se mencionó anteriormente, ante la presencia o ausencia de dilutor la sobrevivencia va a ser muy similar; sin embargo, lo que podemos ver es que cuando llegamos a las 4 horas en ambos grupos los espermatozoides comienzan a morir, y esto coincide con lo señalado por Cárdenas y Pedraza (2006), quienes encontraron que la producción de ROS se da en los espermatozoides vivos y su acumulación excesiva conllevaría a la muerte celular. Bansal y Bilaspuri (2010), también señalaron que cuando un espermatozoide con alto contenido de ROS en su interior muere, el H_2O_2 va a atacar las membranas celulares por lipofilidad, generando peroxidación lipídica. Esta peroxidación lipídica ocasionará la ruptura de la membrana mitocondria interna, membrana mitocondria externa y la membrana celular, generando de esta manera el escape de las ROS al medio extracelular. Cabe resaltar que no hemos realizado una evaluación de la

producción o acumulación de ROS en el medio extracelular, sin embargo, debido a la baja cantidad de espermatozoides vivos y debido que los espermatozoides vivos están produciendo H_2O_2 se puede deducir que el dilutor no está brindando protección antioxidante, o esta protección es muy baja, lo que conllevaría a un aumento del estrés oxidativo y nos permitiría inferir que el uso rutinario de este dilutor no necesariamente va a mejorar el proceso de refrigeración.

Es preciso indicar que la evaluación de la producción de O_2^- en espermatozoides es un poco más dificultosa debido a que el dihidroetidio en contacto con el O_2^- se convierte en 2- hidroxyetidium que fluoresce de color rojo, esta molécula fluorescente tiene afinidad por el núcleo, específicamente por el ADN (Mahfouz *et al.*, 2010) entonces va a tener que atravesar todas las membranas (mitocondrial interna, mitocondrial externa, la vaina mitocondrial y la membrana nuclear), lo cual difiere a lo ocurrido en otras células, ya que las mitocondrias y no empaquetadas, y por ende este fluorocromo podrá atravesar la membrana nuclear con mayor facilidad ya que no existen muchas barreras que se lo impidan. Consideramos que el motivo por el cual la fluorescencia no es tan nítida en los espermatozoides, es porque el fluorocromo necesita que existan poros en todas las membranas descritas anteriormente, las cuales posiblemente puedan producirse por la peroxidación causada por acción del H_2O_2 (Membrillo *et al.*, 2003)

VI. CONCLUSIONES

- Sí se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) en los espermatozoides de canino que son sometidos al proceso de refrigeración.
- Esta producción de ROS disminuye conforme pasan las horas, porque la cantidad de espermatozoides vivos va disminuyendo producto del estrés oxidativo y la muerte del espermatozoide.

- El uso de dilutor para la refrigeración y conservación de las muestras seminales de canino, no detiene la producción de ROS.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar también la evaluación de las especies reactivas presentes en el plasma seminal y el medio de transporte.
- Se recomienda hacer más estudios sobre el radical hidroxilo en espermatozoides caninos, ya es el radical más letal.
- Se aconseja hacer estudios sobre la adición de antioxidantes en los dilutores para evaluar si su uso impacta en la producción de ROS.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Peróxido de hidrógeno (resultados porcentuales)

Rep.	Sin			Con		
	0h	2h	4h	0h	2h	4h
1	87.50	51.85	62.50	89.47	77.78	48.21
2	69.33	74.14	75.86	77.78	84.16	80.49
3	66.67	86.96	69.57	54.17	76.00	83.33
4	84.62	90.48	0.00	90.91	93.18	100.00
5	65.38	72.60	44.90	83.72	59.18	77.14
6	68.12	79.21	27.69	84.62	90.91	41.18
7	82.22	54.55	76.19	65.52	87.10	95.12
8	83.75	50.54	72.73	73.68	51.35	80.73
9	62.32	71.33	83.33	93.33	77.38	72.00
10	84.38	42.11	76.92	72.00	56.25	80.65
11	80.00	53.13	51.06	75.00	94.44	50.00
12	57.89	53.57	67.27	80.95	85.71	73.08
13	89.25	57.50	39.62	95.00	65.52	53.85
14	78.72	68.24	47.69	88.89	76.00	55.32
15	86.36	93.55	56.82	96.15	86.21	90.91

Anexo 2: Análisis de significancia dilutor, tiempos, interacción para los valores de producción de peróxido de hidrógeno

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	1,47	0,4569
Dilutor	8,81	0,0028
Tiempos	11,45	0,0032

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	Ns	No
Dilutor	**	Yes
Tiempos	**	Yes

Anexo 3: Anión superóxido (resultados porcentuales)

Rep.	Sin			Con		
	0h	2h	4h	0h	2h	4h
1	53.85	64.29	82.14	95.73	68.42	69.09
2	88.68	66.67	79.49	86.00	74.19	81.69
3	69.51	68.33	62.50	80.95	69.77	66.67
4	89.02	69.77	74.36	42.31	16.67	0.00
5	79.31	75.29	70.45	60.00	50.00	53.73
6	81.48	62.90	70.59	82.61	63.64	47.44
7	73.58	45.24	85.19	50.00	79.31	44.44
8	99.21	87.50	52.00	66.04	74.07	73.68
9	75.00	75.00	80.00	91.11	73.68	56.00
10	93.75	85.71	83.33	56.25	60.00	62.50
11	84.62	87.50	60.00	85.71	78.26	85.71
12	81.25	59.26	96.30	61.54	90.00	71.43
13	91.67	95.83	90.91	88.89	83.33	88.00
14	87.50	98.70	63.33	73.68	100.00	86.67
15	41.18	77.78	71.43	89.58	80.43	75.00

Anexo 2: Análisis de significancia dilutor, tiempos, interacción para los valores de producción de anión superóxido

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	0,73	0,7197
Dilutor	3,7	0,0704
Tiempo	2,94	0,2689

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	Ns	No
Dilutor	Ns	No
Tiempo	Ns	No

Anexo 7: Post test de Bonferroni para anión superóxido.

Tiempo	Sin	Con	Difference	95% CI of diff.
0	79,31	74,03	5,281	-20.53 to 9.967
2	74,65	70,78	3,867	-19.11 to 11.38
4	74,8	64,14	10,66	-25.91 to 4.583

Tiempo	Difference	T	P value	Summary
0	5,281	0,846	P>0.05	Ns
2	3,867	0,6195	P>0.05	Ns
4	10,66	1,709	P>0.05	Ns

IV. REFERENCIAS

- Aisen, E. G.; Medina, V. H.; Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram frozen in different trealose concentrations. *Theriogenology*, 57(1), 1801-1808.
- Aitken, R. (1994). A Free Radical Theory of Male Infertility. *Reproduction, Fertility, and Development*, 6(1), 19-23.
- Aitken, R. y Fisher, H. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *BioEssays*, 16(4), 259-67.
- Aitken, R. Baker, M. y Nixon, B. (2015). Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum drive by oxidative stress? *Asian Journal of Antropology*, 2015(17), 633-639.
- Baker, M. A., y Aitken, R. J. (2004). The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 216(1), 47-54.
- Ball, B. y Vo, A. (2002). Determination of lipid peroxidation in equine spermatozoa during cooled storage. *Journal of Andrology*, 23(2), 259-269.
- Bansal, A. K., Bilaspuri, G. S. (2010). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*. doi: 10.4061/2011/686131
- Bigarella, C., Liang, R. y Ghaffari, S. (2014). Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development*, 141, 4206-4218.
- Bilodeau, J., Blanchette, S., Gagnon, C. y Sirard, M. (2001). Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 56(2), 275-286.
- Blondin, P., Coenen, K. y Sirard, M.A. (1997). The Impact of Reactive Oxygen Species on Bovine Sperm Fertilizing Ability and Oocyte Maturation. *Journal of Andrology*, 18(4), 454-60.
- Bonilla, R. B. (2007). *Evaluación de la capacidad fecundante del semen canino congelado, comparando glicerol, etilenglicol y DMSO como*

- crioprotectores en el diluyente Tris-glucosa-yema de huevo.* (Tesis de grado). Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia.
- Burnaugh, L., Sabeur, K. y Ball, B.A. (2007). Generation of Superoxide Anion by Equine Spermatozoa as Detected by Dihydroethidium. *Theriogenology*, 67(3), 580-589.
- Cárdenas, N., Pedraza, J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*, 17(2), 165-173.
- Córdova, A., Córdova, M., Ruiz, C. G., Córdova, C., Guerra, J. E, Rodríguez, B. y Arancibia, K. (2009). Estrés oxidativo y antioxidante en la conservación espermática. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 3(1), 33-38.
- Corrales, L., Muñoz, M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencia de la toxicidad del oxígeno. *Nova-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10(18), 135-250.
- Cortés, C., Codelia, V., Manosalva, I., De Lange, J., De Los Reyes, M. y Moreno, R. (2006). Proacrosin/acrosin quantification as an indicator of acrosomal integrity in fresh and frozen dog spermatozoa. *Anim Reprod sci*, 93, 165-175.
- Chatterjee, S. y Gagnon, C. (2001). Production of reactive species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. *Mol Reprod Dev*, 59(4), 451-458.
- De Leeuw, F. E.; Leboeuf, B.; Chemineau, P. (1990). The role membrane plays in cold shock and freezing injury. *Reprod Dom Anim*, 1, 95-104.
- Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchoroguy, T. J., Overstreet, J. W. y Crowe, J. H. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transicions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *The Journal Exp Zool*, 265(3), 432-437.
- Eskenazi, B., Kidd, S. A., Marks, A. R., Slotter, E., Block, G. y Wyrobek, A. J. (2005). Antioxidant Intake Is Associated with Semen Quality in Healthy Men. *Human Reproduction*, 20(4), 1006-12.

- Feldman, E. (2000). *Endocrinología y reproducción canina y felina*. Buenos Aires: Mc Graw Hill.
- Fontbonne, A. (2008). Contrastación seminal, espermograma. En Fontbonne, A. (Presidencial), *Inseminación artificial con semen fresco*. Congreso llevado a cabo en la AMVAC, Madrid, España.
- Fosberg, C.L. (1995). Artificial Insemination with semen fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Seminar in Veterinary Medicine and Surgery*, 10(1), 48-58.
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal Exposition of Biology*, 201(8), 1203-1209.
- Fuchs, J., Thiele, J. y Ochsendorf, F. (1997). Oxidants, antioxidants and oxidative injury. En: Ochsendorf, F.R. and Fuchs, J (Eds), *Oxidative stress in male infertility*, Michael Itschert, Gardez Verlag, Germany, 21-40.
- Green, C. E. y Watson, P. F. (2001). Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122(6), 889-898.
- Griveau, J. F. y Le Lannou, D. (1997). Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa: Physiology and Pathology. *International Journal of Andrology*, 20(2), 61-69.
- Halliwell, B. Gutteridge, M. (3rd Ed). (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Nueva York, USA: Oxford University Press.
- Hansberg, W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímica*, 26, 19-54.
- Hernández, P. (2004). Obtención y caracterización de espermatozoides procedentes de tres zonas del epididimo en caninos. *Revista salud animal*, 53-57
- Hernández, Y., Delgado, L., López, R., Martínez, G. y Mallok, A. (2010). Impacto de las especies reactivas del oxígeno sobre la fertilidad masculina. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 18(3), 153-158.

- Jacob, R. y Manson, R. (2005). Lipid peroxidation induce sholesterol domain formation in model membranes. *The Journal Biological Chemistry*, 280(47), 39380-39387.
- Keuerk, M. E. (2013). *Utilización de mediciones testiculares y evaluación seminal estacional en perros ovejero alemán* (tesis de grado). Universidad de la Republica Uruguay, Montevideo.
- Kutzler, M. (2005). Semen collection in the dog. *Theriogenology*, 64(3), 747-754.
- Lévy, X. (2014). IA con semen congelado. *Transporte de semen peculiaridades y normativas*. Congreso llevado a cabo en la AMVAC, Madrid, España.
- Lévy, X., Fontbonne, A. (2007). Determining the optimal time of mating in bitches: particularities. *Revista Brasileira de Reproducción Animal*, 31(1), 128-134.
- Lucas, X. (2006). Apuntes de reproducción: Extracción seminal en eñ perro. Clínica veterinaria de pequeños animales. *Revista Oficial de AVEPA*, 26(4), 380-381.
- Lucas, X. (2011). Estado actual de las técnicas de inseminación artificial en la especie canina. *Revista de la Asociación Madrileña de Veterinarios de Animales de Compañía. AMVAC*, 46.
- Lucas, X. (2014). *¿Podemos mejorar la inseminación artificial con semen fresco y/o refrigerado?*. Congreso llevado a cabo en la AMVAC, Madrid, España.
- Marshall, F. y Hugh, A. (1990). *Reproduction in the male in Marshall's physiology of reproduction*. United States: Churchill Livingstone.
- Martínez, M. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular *in vitro* y su importancia en biotecnología de la salud. *Rev Colomb Biotecnol*, 11(2), 152-166.
- Mazzilli, F., Rossi, T., Sabatini, L., Pulcinelli, F., Rapone, S., Dondero, F. y Gazzaniga, P. (1995). Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Act Eu Fertil*, 26, 145-148.

- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., Rodriguez, J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better?. *Theriogenology*, 57, 327-344.
- Membrillo, A., Córdova, A., Hicks, J. J., Olivares, I. V., Martínez, V. M. y Valencia, J. J. (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. *Interciencia*, 28(12), 699-704.
- Michael, A., Alexopoulos, C., Pontiki, E., Hadjipavlou, D., Saratsis, P., Boscós, C. (2007). Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine. *Theriogenology*, 68(2), 204-212.
- Palma, G. (2001). *Bioteconología de la reproducción*. Argentina: Instituto nacional de tecnología agropecuaria.
- Paparella, C., Pavesi, A., Feldman, R. y Bouvet, B. (2015). Importancia de la evaluación del estrés oxidativo en el semen humano. *Arch Med Interna*, 37(1), 7-14.
- Peris, S. I., Bolideau, J. F., Dufour, M. y Bailey, J. L. (2007). Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm Molecular Reproduction and Development. *Mol Reprod Dev*, 74(7), 878-92.
- Pineda, S., Pinilla, S. (2007). *Comparación de dos diluyentes (lactosa-glycerol- yema de huevo)*. (Tesis de grado). Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia.
- Quinn, P.J. (1989). Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 21, 3-19.
- Root, M. (2010). *Clinical Canine and Feline Reproduction: Evidence-Based Answers*. United States: Wiley-Blackwell.
- Rota, A., Strom, B. y Fosberg, C.L. (1995). Effects of seminal plasma and three extender on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, 44(6), 885-900.
- Ruiz, L., Sandoval, R. y Santiani, A. (2015). Evaluación de la calidad espermática del semen ovino posdescongelamiento al emplear dos

- fuentes energéticas y dos crioprotectores. *Rev Inv Ve Perú*, 26(1), 49-56.
- Saleh, R. y Agarwal, A. (2002). Oxidative Stress and Male Infertility: From Research Bench to Clinical Practice. *Journal of Andrology*, 23(6), 737-52.
- Sánchez, A., Rubilar, J., Gatica, R. (2002). Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de la fertilidad de semen canino fresco y refrigerado. *Archivo de Medicina Veterinaria*, 34(1), 123-130.
- Sánchez, M., Santiago, E., Vargas, L. y Mendoza, N. (2004). Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica*, 29(3), 81-90.
- Sandovál, C. (2010). *Efecto sobre motilidad espermática de distintas leches descremadas comerciales utilizadas como diluyente de refrigeración de semen equino* (tesis de grado). Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Santana, M. (2015). Revisión de las técnicas de reproducción asistida en perros. *Argos Portal Veterinaria*. Recuperado de <https://argos.portalveterinaria.com/noticia/12175/articulos-archivo/revison-de-las-tecnicas-de-reproduccion-asistida-en-perros.html>
- Santiani, A. (2012). *Uso de dos análogos de superóxido dismutasa para prevenir la desestabilización espermática prematura durante la criopreservación y vitrificación en espermatozoides de alpaca* (tesis doctoral). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
- Santiani, A. (2013). Uso de antioxidantes para mejorar la calidad del semen criopreservado. *Asociación Peruana de Reproducción Animal – Spermova*, 154-157.
- Schulz, M., Sánchez, R., Miska, W. y Villegas, J. (2003). Efecto de ROS producido por leucocitos activados sobre el nivel de apoptosis en espermatozoides humanos. *International Journal Of Morphology*, 172.
- Sorribas, C. (2000). *Reproducción en los animales pequeños*. Buenos Aires: Inter-Medica.

- Stornelli, M. A., Stornelli, M. C., Arauz, M. S., y De la Sota, L. (2001). Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado. aplicación y desarrollo en caninos. *Analecta Veterinaria*, 21(1), 58-66.
- Stornelli, M. A., Stornelli, M. C., Arauz, M. S., Savignone, C. A., García, M. y De la Sota, R. (2001). Estudio comparativo del efecto de tres diluyentes sobre la supervivencia de semen canino almacenado a 4°C. *Revista Brasileira de Reproducción Animal*, 25(3), 468-470.
- Stornelli, M. A., Stornelli, M. C., Arauz, M. S., Savignone, C. A., García, M. y De la Sota, R. (2002). Effects of two different temperatures and three different extenders on survival and longevity of chilled canine semen. *Theriogenology*, 57, 483 abstr.
- Stornelli, M. A. y De la Sota, R. (2006). Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. *Analecta Veterinaria*, 26(2), 29-38.
- Sue-Hee, K., Do-Hyeon, Y. y Yong-Jun, K. (2010). Effects of cryopreservation on phosphatidylserine translocation, intracellular hydrogen peroxide, and DNA integrity in canine sperm. *Theriogenology*, 73, 282-292.
- Sue-Hee, K., Yong-Jun, L. y Yong-Jun, K. (2011). Changes in sperm membrane and ROS following cryopreservation of liquid boar semen stored at 15°C. *Anim Reprod Sci*, 124, 1118-124.
- Toro, A. (2009). Espermograma. *Medicina & Laboratorio*, 15, 145-169.
- Torres, P., Fischman, M., Acerbo, M., García, C., Míguez, M., Domínguez, J., Cisale, H. (2014). Análisis de diluyentes comerciales de semen porcino refrigerado durante 4 días: resultados preliminares. *Zootec*, 63(243), 547-550.
- Tselkas, K., Saratsis, P., Karagianidis, A. y Samoulidis, S. (2000). Extracellular presence of reactive oxygen species (ROS) in fresh and frozen-thawed semen and their effects on some semen parameters. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 107, 69-72.
- Vélez, G., Rocha, Y., Arias, A. y López, J. (2016). Unión del Sistema NADPH oxidasa en la formación de trampas extracelulares de los neutrófilos (NETs). *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, 32(1), 43-56.

- Villa, C. (2009). Enfoque sobre semen, estrés oxidativo y antioxidantes. *Reproducción Animal Argentina*. Recuperado de http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/162-semen_stres.pdf.
- Wai-sum, o., Che, H. y Chow, P. (2006). Male genital tract antioxidant enzyme- Their ability to preserve sperm DNA integrity. *Mol Cell Endocrinol*, 250, 80-83.
- Wang, A. W., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D. y Loughlin, K. R. (1997). Reactive Oxygen Species Generation by Seminal Cells during Cryopreservation. *Urology*, 49(6), 921-5.
- Warren, J. S., Johnson, K. J. y Ward, P. A. (1987). Oxygen Radicals in Cell Injury and Cell Death. *Pathology and Immunopathology Research*, 6(6), 301-15.
- Watson, P. F. (1990). Artificial insemination and the preservation of semen. En: "Marshall's Physiology of reproduction (4th ed): Reproduction in the male". United States: Churchill Livingstone, 747-869.
- Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fert Dev*, 7, 781-791.
- Watson, P.F. (1996). Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Dom Anim*, 31, 135-140.
- Watson, P.F. (2000). The cause of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 60(61), 481-492.