

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

UNIDAD DE POST GRADO

**Uso de dos Análogos de Superóxido Dismutasa para
prevenir la Desestabilización Espermática Prematura
durante la Criopreservación y Vitrificación en
espermatozoides de Alpaca**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Medicina Veterinaria

AUTOR

Alexei Vicent Santiani Acosta

Lima – Perú

2012

DEDICATORIAS

A Dios, por cada día que me regala para seguir disfrutando esta vida con la cual he sido bendecido.

A la memoria de mi madre, quien brindo todo su tiempo, su amor y su vida por sus hijos y aún desde el cielo continúa guiando cada uno de mis pasos.

A mi padre, por todo su apoyo, todo su cariño y sus sabios consejos

A Shirley, mi compañera, quien a mi lado sabe apoyarme en todo momento, sabe alentarme a seguir adelante, sabe levantarme cuando se presentan obstáculos en mi camino y sabe alegrarse por cada uno de mis pequeños éxitos.

A mis hijitas María Isabel y Sofía Fernanda, los motivos que hacen que tanto trabajo y esfuerzo tenga sentido en esta vida, quienes con unas dulces palabras, una sonrisa, un abrazo ó un beso pueden alegrar mi existencia en cualquier circunstancia.

A mi hijo Daniel Alejandro, quien acaba de llegar a este mundo, y su sola presencia es suficiente para darme más fuerza y energía para salir adelante con mi familia. Daniel, se que nos brindarás muchas alegrías.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) por haberme otorgado el financiamiento para poder realizar mis estudios de doctorado.

Al IVITA-Maranganí por haberme acogido unos meses para realizar mis experimentos y por las experiencias compartidas. Un reconocimiento especial al Ing. Juan Olazábal por su tiempo y compromiso en sacar adelante este proyecto.

A la Dra. Martha Valdivia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, por integrarme en su equipo para realizar investigaciones conjuntas y que gracias a ello pude obtener las muestras para este trabajo.

Al Centro de Biotecnología de la Reproducción (CEBIOR) de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, por haberme apoyado en la realización de mis experimentos en citometría de flujo. Un reconocimiento especial a la Dra. Jennie Risopatrón quien fue la artífice de que pudiera compartir nuevamente un tiempo en mi querida ciudad de Temuco. Gracias a Carolina, Osvaldo y Paola por haber dedicado su valioso tiempo en apoyarme con mi trabajo.

A cada unos de mis tesisistas, amigos y alumnos que a lo largo de estos años han contribuido con su esfuerzo y tiempo en ir culminando cada uno de mis experimentos. Gracias Luis Ruiz, Jorge Banda, Gino Carlotto, Ricardo Castillo, José Luis Delgado, William Bocanegra y Katherine Choez.

A mi alma mater, la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y al Dr. Víctor Leyva, porque desde hace más de una década me guía en este fascinante mundo de la investigación en la disciplina de la reproducción animal.

ÍNDICE

CONTENIDO	Pág.
Dedicatorias	ii
Agradecimientos	iii
Índice de contenido	iv
Resumen	vi
Abstract	vii
Lista de cuadros	viii
Lista de figuras	x
Lista de anexos	xi
Lista de abreviaturas	xii
Lista de fórmulas químicas	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Fisiología reproductiva en alpaca macho	5
2.1.1. Métodos de colección de semen	6
2.1.2. Características del semen de alpacas	9
2.2 Fisiología del espermatozoide	11
2.2.1. Capacitación espermática	12
2.2.2. Reacción acrosomal	13
2.3 Evaluación de la función espermática	14
2.3.1. Evaluación de la motilidad espermática	14
2.3.2. Evaluación de la integridad funcional de membrana	15
2.3.3. Evaluación de la vitalidad e integridad acrosomal	16
2.3.4. Evaluación de la fragmentación de ADN	17
2.4 Criopreservación de semen	18
2.4.1. Principios de criopreservación	19
2.4.2. Proceso de criopreservación	20
2.4.3. Criopreservación de espermatozoides en alpacas	22
2.4.4. Dilutores y agentes crioprotectores	24

2.4.5.	Efectos de la criopreservación en la función espermática	27
2.5	Vitrificación de semen	28
2.6	Especies reactivas de oxígeno	29
2.6.1.	Estrés oxidativo seminal	31
2.6.2.	Producción de ROS en el semen	31
2.6.3.	Efectos fisiológicos de ROS en espermatozoides	32
2.6.4.	Efectos patológicos de ROS en espermatozoides	35
2.6.5.	Producción de ROS durante criopreservación	39
2.7	Antioxidantes	41
2.7.1.	Antioxidantes presente en espermatozoides y plasma seminal	42
2.7.2.	Análogos de superóxidodismutasa	45
2.7.3.	Efecto de antioxidantes en la función espermática	47
2.7.4.	Criopreservación de semen con antioxidantes	50
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	53
3.1.	Lugar de estudio	53
3.2.	Animales y muestras biológicas	54
3.3.	Fase Experimental	55
3.4.	Procedimiento metodológico	58
3.5.	Evaluación de características seminales	61
3.6.	Análisis estadístico	68
IV.	RESULTADOS	70
4.1.	Experimento 1: Vitrificación de espermatozoides de alpaca.	70
4.2.	Experimento 2: Efecto de PMN activados con PMA en funcionalidad de espermatozoides	73
4.3.	Experimento 3: Antioxidantes durante la criopreservación de semen.	74
V.	DISCUSIÓN	78
VI.	CONCLUSIONES	88
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
VIII.	ANEXOS	113

RESUMEN

El presente trabajo consta de 3 experimentos y tuvo como objetivo principal evaluar el efecto de 2 antioxidantes análogos de superóxido dismutasa (Tempo y Tempol) durante los procesos de criopreservación y vitrificación de espermatozoides de alpaca sobre parámetros de funcionalidad espermática. En el Experimento 1, 15 muestras espermáticas obtenidas de la cola del epidídimo y 5 muestras de semen de alpaca fueron vitrificadas en medios Tris base y HTF utilizando diferentes azúcares (fructosa, sacarosa y trehalosa) en 3 concentraciones diferentes (0.25, 0.5 y 1.0 M). Se obtuvo menos de 1% de motilidad y menos de 5% de viabilidad utilizando el medio HTF. En el Experimento 2, 6 muestras de espermatozoides frescos de alpaca fueron incubados durante 3 horas a 37 °C en un medio Tris-base junto con polimorfos nucleares (PMN) activados con 100 nM de PMA (*Phorbol myristate acetate*) para inducir la formación de ROS. Se demostró que la motilidad espermática se reduce significativamente ($p < 0.05$) en el grupo con polimorfos activados (13.67%) en comparación con el grupo control (22.42%). En el Experimento 3, se evaluó el efecto de 2 antioxidantes análogos de superóxido dismutasa (Tempo y Tempol) durante el proceso de criopreservación en un medio en base a leche descremada y etilenglicol, encontrando que con la adición de Tempo y Tempol se obtiene una mayor ($p < 0.05$) motilidad espermática en comparación al grupo control (19.63% y 22.57% vs. 10.62%), mayores porcentajes ($p < 0.05$) de integridad de membrana (14.31% y 13.08% vs. 10.38%) y se obtiene ($p < 0.05$) mayores porcentajes de espermatozoides con ADN no fragmentado (74.20% y 83.76% vs. 63.68%). La variable espermática de vitalidad/integridad acrosomal no fue afectada significativamente por la adición de los antioxidantes Tempo y Tempol. Se concluye que la incubación de espermatozoides de alpaca incubados con PMN activados con PMA tienen un efecto nocivo en la motilidad espermática, y que durante la criopreservación de semen la pérdida de motilidad espermática, pérdida de integridad funcional de membrana y aumento de la fragmentación de ADN espermático pueden ser prevenidos parcialmente mediante la utilización de los antioxidantes Tempo ó Tempol como parte del dilutor de semen.

Palabras clave: Espermatozoides, alpaca, criopreservación, ROS, antioxidante, tempo, tempol.

ABSTRACT

The present study had 3 experiments and the main objective were to evaluate the effect of two superoxide dismutase mimics (Tempo and Tempol) during semen sperm cryopreservation and vitrification on alpaca sperm function. In Experiment 1, vitrification of alpaca sperm was evaluated using extenders based on Tris solution and HTF, with different sugars as cryoprotectants (fructose, sucrose, and trehalose) in different concentrations (0.25, 0.5 y 1.0 M). Only few spermatozoa motile (<1%) and viable (<5%) were found in group HTF. In Experimental 2, six samples of fresh alpaca sperm were incubated during 3 hours at 37 °C on a medium based on Tris with polymorphonuclear activated by 100 mM PMA (phorbol myristate acetate) to induce ROS production. Sperm motility was significantly reduced ($p < 0.05$) when sperm were incubated on a medium con high levels of ROS (13.67%) in comparison with control group (22.42%). In Experiment 3, two superoxide dismutase analogues (antioxidants Tempo and Tempol) were evaluated during cryopreservation process on an extender based on skim milk and ethylene glycol. Addition of Tempo or Tempol result in higher ($p < 0.05$) sperm motility in comparison than control group (19.63% and 22.57% vs. 10.62%). Functional sperm membrane integrity were also higher ($p < 0.05$) in groups Tempo (14.31%) and Tempol (13.08) than control group (10.38%). In the same way, DNA integrity washigher ($p < 0.05$) in groups Tempo (74.20%) and Tempol (83.76%) than control group (63.68%). Viability and acrosomal integrity were not affected by cryopreservation with superoxide dismutase analogues. We conclude that alpaca sperm incubation on PMN activated by PMA had a detrimental effect on alpaca sperm motility, and that motility, functional sperm membrane integrity and DNA integrity could be partially protected by administration of Tempo or Tempol as components of extender for cryopreservation alpaca semen.

Key words: Sperm, alpaca, cryopreservation, ROS, antioxidant, tempo, tempol

LISTA DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Características microscópicas del semen de camélidos sudamericanos.	11
Cuadro2	Estudios realizados en criopreservación de espermatozoides de camélidos sudamericano.	23
Cuadro3	Características biofísicas de los crioprotectores penetrantes	26
Cuadro4	Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción.	42
Cuadro5	Experimentos y actividades experimentales realizados de acuerdo a la institución de procedencia de las muestras.	53
Cuadro6	Diluciones realizadas para criopreservación de espermatozoides de alpaca.	60
Cuadro 7	Porcentaje de motilidad obtenida luego de vitrificar muestras de espermatozoides de alpaca recuperados del epidídimo (n=6) en una solución Tris base	70
Cuadro 8	Porcentaje de motilidad obtenida luego de vitrificar muestras de semen de alpaca (n=5) en una solución Tris base.	71
Cuadro 9	Porcentaje de motilidad obtenida luego de vitrificar muestras de espermatozoides de alpaca recuperados del epidídimo (n=9) en una solución HTF.	72
Cuadro 10	Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto obtenidos luego de vitrificar muestras de espermatozoides de alpaca recuperados del epidídimo (n=9) en una solución HTF.	72

Cuadro 11	Efecto de la incubación de espermatozoides de alpaca con polimorfos nucleares activados con acetato de PMA para inducir la formación de ROS.	73
Cuadro 12	Efecto de la adición de antioxidantes (Control, Tempo 1mM y Tempol 1mM) durante la curva de enfriamiento (10°C) para la criopreservación de espermatozoides de alpaca sobre la motilidad espermática, integridad de membrana, viabilidad e integridad acrosomal y daño del ADN espermático.	75
Cuadro 13	Correlación entre porcentaje de ADN no fragmentado (TUNEL-) y variables motilidad, integridad de membrana (HOS+) y vitalidad/integridad acrosomal	76

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Inicio de peroxidación lipídica en relación a la sustracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso poli-insaturado.	37
Figura 2	Representación esquemática de las vías de peroxidación lipídica.	39
Figura 3	Ciclo redox del glutatión.	45
Figura 4	Diferentes grados de reacción en espermatozoides expuestos al test hiposmótico. (A: Espermatozoide con membrana alterada/dañada. B, C, D, E, F, G y H: Espermatozoides con integridad funcional de membrana intacta). Adaptado de Jeyendran <i>et al.</i> (1984).	62
Figura 5	Selección y controles de la población de espermatozoides de alpaca para tinción de TUNEL por citometría de flujo. (5 ^a) Muestra los eventos seleccionados para ser analizados como espermatozoides de alpaca. (5b) Control de autofluorescencia. (5c) Control TUNEL. (5d) Control PI.	66
Figura 6	Espermatozoides de alpaca evaluados mediante microscopia óptica y de fluorescencia con 400X, luego del análisis de citometría de flujo. Espermatozoide de control PI bajo microscopio óptica (Fig.6a) y de fluorescencia (6b). Espermatozoide de control TUNEL bajo microscopio óptica (Fig. 6c) y de fluorescencia (6d). Espermatozoide permeabilizado y con ADN nuclear intacto visto bajo microscopia óptica (Figura 6e) y de fluorescencia (Fig. 6f).	67
Figura 7	Análisis de citometría de flujo para evaluación de la integridad de ADN (TUNEL/PI) en la población de espermatozoides de alpaca criopreservadas por 3 tratamientos: (a) Grupo Control, (b) Grupo Tempo, (c) Grupo Tempol.	77

LISTA DE ANEXOS

		Página
Anexo 1	Consolidado de machos utilizados para colección de semen, intentos de colección realizados por macho, muestras totales obtenidas y muestras de buena calidad.	113
Anexo 2	Distribución de muestras seminales para ser utilizadas en los Experimentos 1 y 3 de acuerdo al macho de procedencia.	114
Anexo 3	Características seminales de las muestras utilizadas en los Experimentos 1 y 3.	115
Anexo 4	Análisis estadístico del experimento 1.	116
Anexo 5	Análisis estadístico del experimento 2.	118
Anexo 6	Análisis estadístico del experimento 3	119
Anexo 7	Correlación en porcentaje de ADN espermático no fragmentado (TUNEL-) y motilidad espermática.	122
Anexo 8	Correlación en porcentaje de ADN espermático no fragmentado (TUNEL-) e integridad funcional de membrana (HOS+).	122
Anexo 9	Correlación en porcentaje de ADN espermático no fragmentado (TUNEL-) y vitalidad/integridad acrosomal.	122

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine seric albumin</i>)
BHT	Butilhidroxitolueno (<i>Buthylhyfrotoluene</i>)
DHE	Dihidroetidio (<i>Dihydroethidium</i>)
DMA	Dimetil acetamida (<i>Dimethylacetamide</i>)
DT	Doble tinción azul tripán – giemsa
Dutp	Deoxyuridina trifosfato (<i>Deoxyuridine triphosphate</i>)
FITC	Isiotiocianato de fluoresceina conjugado (<i>Fluorescein isothyocyanate conjugated</i>)
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GPx	Glutation peroxidasa
Grx	Glutation reductasa
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
HSA	Albúmina sérica humana (<i>Human seric albumin</i>)
HOS+	Espermatozoides con membrana funcional intacta
HOS-	Espermatozoides con membrana funcional alterada
HOST	Test hiposmótica (<i>Hypo osmotic swelling test</i>)
HTF	Fluido tubárico humano (<i>Human tubarian fluid</i>)
NADH	Nicotidamina adeninda dinucleótido reducida

NADPH	Nicotidamina adenina dinucleótido fosfato reducido
NADP+	Nicotidamina adenina dinucleótido fosfato
PBS	Fosfato buferado salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PE	<i>Phico erythrin</i>
PI	Yoduro de propidio (<i>Propidium iodide</i>)
PMA	Acetato de forbol miristato (<i>Phorbol myristate acetate</i>)
PMN	Polimorfo nucleares
PVP	Polivinil pirrolidona (<i>polivinyll pyrrolidone</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive species oxygen</i>)
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tioambarbitúrico (<i>Tiobarbituric acid</i>)
TdT	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i>
TUNEL	<i>TdT – mediated d UTP nick-end labeling</i>
TUNEL+	Espermatozoides con ADN fragmentado

LISTA DE FÓRMULAS QUÍMICAS

Anión superóxido	$O_2^{\cdot -}$
Óxido nítrico	NO
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Peróxido lipídico	ROOH
Radical hidroxilo	OH^{\cdot}
Radical lipídico	R^{\cdot}
Radical lipídico peroxilo	ROO^{\cdot}

I. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen es un procedimiento que permite mantener viables a espermatozoides por periodos de tiempo indefinidos mediante el mantenimiento de estas células en temperaturas muy bajas (-196 °C en nitrógeno líquido). En algunas especies como camélidos sudamericanos domésticos, llamas y alpacas, su utilización es casi inexistente debido a la falta de información para obtener muestras de buena calidad luego del descongelamiento. En otras especies como bovinos, ésta técnica ha permitido el uso masivo de la inseminación artificial a nivel mundial. Por otro lado, en bovinos es posible seguir encontrando abundante información científica actualizada sobre nuevos procedimientos para mejorar la técnica de criopreservación. Por el contrario, en camélidos sudamericanos, los únicos trabajos detallados sobre criopreservación de espermatozoides de alpaca son los descritos por Santiani *et al.* (2005), Morton *et al.* (2007, 2010), Rodríguez (2009) y Banda *et al.* (2010); mientras que en espermatozoides de llamas se tienen los reportes de Von Baer *et al.* (1999) y Aller *et al.* (2003). Adicionalmente encontramos otros trabajos como comunicaciones científicas en resúmenes de eventos científicos como los reportados por Valdivia *et al.* (2000) en espermatozoides de alpacas; y Graham *et al.* (1978) y Bravo *et al.* (1996) en espermatozoides de llamas. Una de las razones por las cuales no existe abundante información sobre criopreservación de semen en estas especies es la dificultad para conseguir muestras de semen fresco de buena calidad; así que algunos de los trabajos anteriormente citados (Morton *et al.*, 2007, 2010; Rodríguez, 2009; Banda *et al.* 2010; Valdivia *et al.*, 2000) utilizaron espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo como modelo alternativo. Es interesante destacar que los parámetros de función

espermática en alpacas son similares cuando se realiza criopreservación de muestras de semen o de espermatozoides obtenidos directamente de la cola del epidídimo. En este sentido, se ha demostrado que la presencia del plasma seminal durante la criopreservación de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo no afecta los parámetros de función espermática (Rodríguez, 2009).

En los estudios referidos sobre criopreservación de espermatozoides de camélidos sudamericanos, en alpacas se reportan porcentajes de motilidad espermática alrededor del 20% (Valdivia *et al.*, 2000; Santiani *et al.*, 2005), en forma similar a lo reportado en llamas (Von Baer y Hellemann, 1999; Aller *et al.*, 2003). Según los reportes de Banda *et al.* (2010) y Rodríguez (2009) si bien la motilidad post descongelamiento varía alrededor del 20%, los porcentajes de viabilidad pueden alcanzar rangos de 40 hasta 50%. Estos resultados indicarían que las células espermáticas han sido desestabilizadas durante los procesos de congelamiento-descongelamiento, alterando la función de motilidad, pero no llegando a causar la muerte celular.

Luego de la criopreservación de espermatozoides de alpacas, se reporta una disminución en la motilidad espermática, integridad funcional de membrana (Santiani *et al.*, 2005), integridad acrosomal, actividad mitocondrial y aumento en la fragmentación del ADN espermático (Rodríguez, 2009). Asimismo, en espermatozoides de bovinos (Cormier y Bailey, 2003) y ovinos (Maxwell y Watson 1996; Pérez *et al.*, 1996; Gil *et al.*, 2003) se describe un gran incremento en la proporción de espermatozoides capacitados, es decir aumentan los espermatozoides desestabilizados, por lo cual a este fenómeno se le denomina “criocapitación”. Estos cambios en la funcionalidad de los espermatozoides podrían explicar el porqué en ciertas especies si bien los espermatozoides sobreviven inicialmente al proceso de criopreservación, no logran finalmente fecundar a los ovocitos y no se producen desarrollo de gestaciones.

Uno de los principales factores descritos que afectan la funcionalidad de espermatozoides son niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los principales efectos nocivos de ROS en la funcionalidad espermática son pérdida de motilidad (Peris *et al.*, 2007), incremento de peroxidación lipídica (Aitken, 1994) y fragmentación del ADN espermático (Baker y Aitken, 2004). Asimismo, en diferentes especies como en humanos (de Lamirande y Lamothe, 2009) y porcinos (Awda *et al.*,

2009) se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno también inducen la capacitación espermática.

Es interesante destacar que en ovinos (Santiani, 2003) y humanos (Wang *et al.*, 1997), se ha demostrado que durante el proceso de criopreservación de semen, los niveles de especies reactivas de oxígeno se incrementan significativamente, estando relacionados con pérdida de motilidad y viabilidad espermática, así como con capacitación espermática prematura (Santiani, 2003; Peris *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2007) y fragmentación del ADN espermático (Peris *et al.*, 2007; Sue-Hee *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha demostrado que el efecto negativo de los ROS puede ser prevenido parcialmente mediante la adición de antioxidantes análogos a superóxido dismutasa al medio dilutor de semen (Santiani, 2003; Ruiz *et al.*, 2007), mientras que en bovinos, el uso de antioxidantes en los diluyentes para congelar semen aún es controversial (Foote *et al.*, 2002).

En alpacas y llamas, no existen estudios sobre el efecto de la producción de especies reactivas de oxígeno en la funcionalidad espermática, ni sobre la utilización de antioxidantes durante el proceso de criopreservación, por lo cual sería interesante demostrar si los ROS afectan negativamente la función del espermatozoide de alpaca y estudiar si la adición de antioxidantes podría prevenir de alguna manera la pérdida de la funcionalidad espermática durante el proceso de criopreservación.

Por otro lado, se ha desarrollado un protocolo de vitrificación para espermatozoides de primates humanos y no humanos (Dong *et al.*, 2009; Isachenko *et al.*, 2008; Hossain *et al.*, 2007) que tiene como ventajas respecto a los protocolos tradicionales de criopreservación, que se realizan rápidamente sin necesidad de utilizar máquinas de congelamiento y evitan el uso de crioprotectores tóxicos para los espermatozoides. En este sentido, la técnica de vitrificación es novedosa, y aún no se ha estudiado la factibilidad de implementarla en espermatozoides de mamíferos domésticos. Recientemente, existen evidencias que la vitrificación de espermatozoides también podría aplicarse en algunos mamíferos domésticos como caninos (Sánchez *et al.*, 2011) e incluso en otras especies como salmones (Merino *et al.*, 2011a, 2011b). Sin embargo, hasta la actualidad no existen reportes en camélidos ni en especies de similar orden taxonómico.

Por lo tanto el objetivo principal del presente proyecto fue evaluar el efecto de 2 antioxidantes análogos de superóxido dismutasa (Tempo y Tempol) durante los procesos de

criopreservación y vitrificación de espermatozoides de alpaca sobre parámetros de funcionalidad espermática. Los objetivos específicos fueron: (1) Evaluar la factibilidad de desarrollar un protocolo de vitrificación de espermatozoides de alpaca en un medio libre de agentes crioprotectores mediante el estudio de distintos tipos de azúcares; (2) Determinar el daño celular inducido en espermatozoides de alpaca incubados con polimorfos nucleares activados por PMA; y (3) Evaluar el efecto de los antioxidantes análogos a superóxido dismutasa en la funcionalidad espermática durante los procesos de criopreservación y vitrificación de espermatozoides de alpaca.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Fisiología reproductiva en alpacas machos

La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es una hormona sintetizada en el hipotálamo y actúa dentro de la fisiología del macho causando la elevación de la producción de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) a nivel hipofisiario, las cuales a su vez tienen un efecto directo sobre la espermatogénesis y sobre la secreción de testosterona (Háfezet *al.*, 2000). La LH es la hormona encargada de estimular la producción de testosterona por las células de Leydig en el estroma testicular (Sutovsky and Manandhar, 2006). En bovinos Holstein, dosis repetidas de GnRH causan un incremento en la producción seminal y las concentraciones de LH y Testosterona (Miller y Amman, 1986). Asimismo, en ovinos producen un incremento en la concentración de testosterona sérica y un incremento de la actividad sexual (Schambacher y Lunstra, 1977; Andaur *et al.*, 2004). Los niveles elevados de testosterona inhiben la secreción de GnRH mediante un mecanismo denominado retroalimentación negativa (O'Donnell, *et al.*, 2006).

En los túbulos seminíferos se lleva a cabo la espermatogénesis, siendo regulada por las células de Sertoli, así como por la FSH y testosterona. En alpacas entre 2 a 5 años se aprecia en los túbulos seminíferos un epitelio germinativo distribuido ordenadamente en estratos, con diferenciación de las células germinales en espermatogonias de forma redondeada en la membrana basal, espermatocitos primarios y secundarios en mayor cantidad de forma triangular alargadas y espermatozoides en dirección a la luz del túbulo, mientras que las células de Sertoli intercaladas en el epitelio germinal (Rojas, 1998). Entre

los 6-12 meses de edad, las células germinales empiezan a organizarse en el túbulo seminífero, desplazándose hacia la membrana basal, mientras que las células de Sertoli se elongan y se distancian entre ellas. Las células germinales comienzan a ocupar los espacios entre las células de Sertoli y se organizan en estratos (Pasco, 2001). En machos de 18 meses ya es posible observar espermatozoides maduros, pero en baja concentración.

En alpacas, el inicio del comportamiento sexual se observa a partir del primer año de edad (Fernández-Baca *et al.*, 1972), sin embargo, la mayoría de machos presenta adherencias pene prepuciales (Carpio *et al.*, 1999). Los niveles de testosterona en alpacas de menos de 1 año varían entre 0.5 a 1 ng/mL, mientras que en machos adultos, la testosterona presenta valores entre 1 a 5 ng/mL (Carpio *et al.*, 1999; Chuna *et al.*, 2000). Se ha descrito que mayores niveles de testosterona sérica se relacionan con machos que liberan prematuramente sus adherencias pene prepuciales (Chuna *et al.*, 2000), siendo demostrado mediante la administración exógena de testosterona (San Miguel, 2001).

2.1.1. Métodos de colección de semen

La colección de semen en camélidos es uno de los principales factores limitantes para el desarrollo de la inseminación artificial en llamas y alpacas, así como para la evaluación de la capacidad reproductiva de los machos (Novoa y Leyva, 1996). Las especiales características reproductivas, anatómicas y fisiológicas de estas especies como son el prolongado tiempo de cópula, el temperamento nervioso, la posición de cópula, lugar de depósito del semen, la eyaculación intracornual y continua, la extrema viscosidad del semen, etc.; determinan una alta dificultad para la colecta de semen, siendo aún inexistente un protocolo recomendado y una técnica óptima (San Martín *et al.*, 1968; Pacheco, 2008). A continuación, se describen los principales métodos descritos para coleccionar semen en camélidos sudamericanos:

Vagina artificial.

Esta técnica es una variante de la vagina artificial usada en bovinos y ovinos y fue propuesta por Sumar y Leyva (1981), quienes utilizando un maniquí con forma de la hembra sentada en posición decúbito ventral, simularon la cópula normal. Dentro de este maniquí adaptaron una vagina artificial modificada en su interior. Los machos aceptan el maniquí después de un corto periodo de entrenamiento; logrando obtenerse muestras de semen de características variables según el macho, tiempo de cópula efectiva y número de interrupciones de la misma. Diferentes autores han hecho uso de la vagina artificial con diversas variantes en sus respectivos protocolos de colección de semen. Quispe y Olarte (1988) evaluaron 10 alpacas macho usando el mismo método de colección reportando que los machos le perdían el interés al maniquí, gradualmente, conforme se alejaban de los meses de verano, inhibiéndose por completo en el mes de setiembre. Dávalos y Olazábal (2002) encontraron que el uso de la vagina artificial con la presencia de una hembra receptiva al lado del maniquí aumenta la calidad de los eyaculados colectados, en comparación al uso del maniquí solo, incrementando también el tiempo de cópula.

Electroeyaculación.

Mediante el uso de un equipo de fabricación nacional, con una intensidad máxima de 40 voltios, Fernández-Baca y Calderón (1966) reportaron la obtención de muestras de semen con las ventajas de realizar la colección sin la necesidad de contar con hembras en celo, acortar el tiempo de colección y realizarla a lo largo de todo el año. La técnica de electroeyaculación consistía en introducir un electrodo bipolar, a una longitud no mayor de 10cm, en el recto del macho objeto de la colecta seminal manteniendo esta posición durante todo el tiempo que dure la aplicación de los estímulos; estos últimos eran aplicados en serie y a intervalos de tiempo definidos consiguiendo la erección del pene y la posterior eyaculación. Toda la operación dura entre 10 y 15 minutos, con considerables variaciones individuales. Este método de colección también se utilizó para obtener semen de vicuñas y pacovicuñas (Fernández-Baca y Novoa, 1968). Los resultados del uso de la electroeyaculación muestran gran variabilidad entre animales y aún en el mismo animal,

además de obtenerse semen muy diluido con las secreciones de las glándulas anexas y baja concentración espermática; así mismo esta técnica presenta serias dificultades debido al elevado número de impulsos eléctricos y a la contaminación frecuente del semen con orina emitida durante la estimulación (Fernández-Baca y Calderón, 1966; Raymundo, 2004; Pacheco, 2008).

Aspiración vaginal poscoital.

También es posible obtener muestras de semen por aspiración del fondo de la vagina después de la cópula, ya que una pequeña cantidad de semen es eyaculada allí, al momento de llevar el pene de un cuerno a otro. Este método no es invasivo ni tedioso, pero la desventaja es que este semen es incompleto, contaminado y diluido con las secreciones del tracto genital de la hembra; sin embargo, se podría usar este método para evaluar parámetros espermáticos como motilidad, morfología y vitalidad. La utilización de este tipo de semen para evaluar la fertilidad del macho es muy cuestionada (Pacheco, 2008).

Desviación de los conductos deferentes.

Esta técnica consiste en el desvío quirúrgico de los conductos deferentes hacia la cara interna del muslo o la región ventral del animal intentando así, coleccionar espermatozoides directamente de su reservorio, la cola del epidídimo, sin que estos tengan contacto con las secreciones de las glándulas anexas. A través de la fístula permanente que se genera en la piel luego de la operación se coleccionan los espermatozoides continuamente. Este método de colección tiene como ventajas el hecho de prescindir de una hembra receptiva para la colecta y contar con muestras de fácil manejo sin los inconvenientes de la viscosidad del semen completo, evitando el uso de enzimas proteolíticas o de la acción mecánica para licuefactar el mismo (Paricahua, 2001; Quintano, 2002).

Recuperación de espermatozoides del epidídimo.

Este método de colección, de manera análoga a la desviación de los conductos deferentes, tiene como objetivo la colecta de espermatozoides directamente de su reservorio, el epidídimo; sin embargo, es más radical al incluir en su protocolo la extirpación del testículo. La técnica consiste en la separación quirúrgica de las mencionadas gónadas y la escisión de las colas epididimarias respectivas a las que se les extrae los espermatozoides que llevan en su interior usando como medio una solución fisiológica buferada (PBS), obteniendo finalmente una suspensión de espermatozoides que se toma como muestra. Esta técnica está orientada principalmente al rescate del germoplasma de individuos muertos súbitamente, cuyas especies se encuentren en peligro de extinción y cuyas colectas de semen sean difíciles de realizar (Anel *et al.*, 2002); no obstante, la recuperación de espermatozoides epididimarios también se constituye en una herramienta factible de usarla con machos sin valor genético y/o económico como modelos para experimentar diversos efectos en las respuestas biológicas y fisiológicas de los espermatozoides. En camélidos sudamericanos se vienen recuperando espermatozoides epididimarios de llama y alpaca debido a la dificultad para obtener muestras de espermatozoides bajo los diferentes procedimientos descritos anteriormente (Ratto *et al.*, 1999; Morton *et al.*, 2007, 2010).

Otros métodos utilizados para coleccionar semen en camélidos incluyen la utilización de fundas vaginales (Mogrovejo, 1952), esponjas vaginales (San Martín, 1961) y la realización de una fistula uretral (von Kubicek, 1974).

2.1.2. Características del semen de alpacas

El semen en camélidos sudamericanos presenta una coloración que puede variar desde el blanco lechoso a blanco cristalino, según la concentración de espermatozoides (Bustinza, 2001); tiene una alta viscosidad, característica que le da un aspecto semejante a un gel y que dificulta su manejo (Garnica *et al.*, 1993). El pH del semen de alpaca es

ligeramente alcalino con un promedio de 7.29 y rango de 7.2 a 8.6. La frecuencia de eyaculados no tiene efecto significativo sobre el valor del pH (Mogrovejo, 1952; Fernández-Baca y Calderón, 1966).

El volumen de eyaculado es variable y, al igual que la concentración espermática, está influenciado por el método de colección empleado. El promedio del volumen para el eyaculado de alpaca es de 1-2mL, y los rangos van desde menos de 1mL hasta 12.5mL (Garnica *et al.*, 1993; Sumar y Leyva, 1981). La concentración espermática también es influenciada por la técnica de colección, siendo la vagina artificial el método de colección 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; Raymundo, 2004; Santiani *et al.*, 2005); sin embargo, debemos considerar que se han reportado concentraciones espermáticas mayores al usar una hembra en celo como estímulo para el macho donante sometido a colecta por vagina artificial (Dávalos y Olazábal, 2002).

La alta viscosidad del plasma seminal así como la baja concentración espermática determinan patrones de motilidad particulares para el semen de alpaca, en comparación con otras especies. No existe motilidad masal y la motilidad individual es estacionaria u oscilante y no progresiva. Diferentes autores registran variados valores para la motilidad contando 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).

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).

En el cuadro 1 se presenta una lista con las características seminales tomados de algunos trabajos en espermatozoides de alpacas.

Cuadro1. Características microscópicas del semen de camélidos sudamericanos

Autor	Método de colección	Concent. (x10⁶/mL)	Motilidad (%)	Vitalidad (%)	Anormales (%)
Mogrovejo, 1952	Funda v.	63-107	-	-	41.23
Palomino, 1962	Funda v.	-	-	-	11.65
Sucapuca, 1991	Funda v. (condón)	0.83	-	-	-
Fernández B. y Calderón, 1966	Electro-eyaculación	31.68 (1-255)	-	-	-
Parichhua, 2001	Desviación conductos	51	-	94.25	-
Sumar y Leyva, 1981	Vagina Artificial	600	-	-	-
Bravo <i>et al.</i> , 1997	Vagina artificial	147.5	85	69.6	24.1
Valdivia <i>et al.</i> , 1999	Vagina artificial	-	60 – 98	-	-
Aller <i>et al.</i> , 2003	Vagina artificial	75,2	12.5	16.5	-
Raymundo 2004	Vagina artificial	248.1	54	-	-
Santiani <i>et al.</i> , 2005	Vagina artificial	80	60	-	-

(Cuadro tomado de Banda J, 2009)

2.2 Fisiología del espermatozoide

Los espermatozoides, gametos masculinos producidos durante la espermatogénesis, son células elongadas que consisten en una cabeza aplanada que contiene al núcleo y una cola con un sistema que permite la motilidad espermática (Garner y Háfez, 2000). Estas

células pueden desarrollar diversos procesos metabólicos como la glicólisis y respiración celular; y procesos fisiológicos como la capacitación espermática y reacción del acrosoma.

Los espermatozoides pueden metabolizar la glucosa o fructosa a través de la glicólisis, formando como producto metabólico el ácido láctico. Esta actividad permite a los espermatozoides obtener ATP en condiciones anaeróbicas (Garner y Háfez, 2000). También pueden utilizar una variedad de sustratos en presencia de oxígeno para obtener energía. En la actividad respiratoria se utiliza el lactato o piruvato resultantes de la glicólisis, para producir dióxido de carbono y agua. Este mecanismo oxidativo, que se realiza en las mitocondrias, produce energía más eficientemente que la glicólisis. Utilizando este proceso, los espermatozoides convierten la mayoría de energía producida en ATP. Gran parte del ATP producido es consumido para permitir el movimiento espermático, mientras que otra parte es utilizada para mantener la integridad del proceso de transporte activo de la membrana plasmática. El proceso de transporte activo previene la pérdida de compuestos iónicos del espermatozoide (Garner y Háfez, 2000).

2.2.1. Capacitación espermática

La capacitación es el conjunto de cambios fisiológicos que confieren al espermatozoide la habilidad de poder fecundar un ovocito. En estas modificaciones se incluyen cambios bioquímicos y fisiológicos en donde se alteran y eliminan sustancias que fueron integradas a la membrana plasmática del espermatozoide durante su trayecto por el epidídimo (Visconti y Kopf, 1998).

Los mecanismos moleculares relacionados a la capacitación espermática incluyen la remoción del colesterol de la membrana plasmática (Cross, 1998) por acción de albúmina y esfingomielinas (Cross, 2000); incremento de calcio intracelular; ingreso de bicarbonato al espacio intracelular; y la acción de segundos mensajeros (Visconti y Kopf, 1998). En ese sentido, durante la capacitación se describe un aumento en la producción de AMPc, desencadenado por la adenil ciclasa e incremento en la fosforilación de proteínas en el residuo tirosina. También es probable que la producción de especies reactivas de oxígeno acelere la fosforilación de proteínas y por lo tanto la capacitación (Herrero *et al.*, 1999; De

Lamirande y O'Flaherty, 2008). Algunas especies reactivas de oxígeno como anión superóxido y peróxido de hidrógeno son producidas en pequeñas cantidades durante la capacitación y pueden regular el incremento de AMPc, y protein kinasa A (De Lamirande y O'Flaherty, 2008). Además existe un incremento en el pH intracelular e hiperpolarización de la membrana plasmática del espermatozoide. La heparina también estaría relacionada a la capacitación espermática, mediando el aumento de calcio intracelular, AMPc e incremento del pH (Parrish *et al.*, 1988). Otro compuesto relacionado con la capacitación espermática es la glucosa. En bovinos, la glucosa inhibiría la capacitación, mientras que en otras especies se le atribuye un efecto positivo (Visconti y Kopf, 1998).

2.2.2. Reacción acrosomal

Luego de una serie de cambios bioquímicos y funcionales, conocidos como capacitación, los espermatozoides pueden desarrollar la reacción del acrosoma. Las modificaciones en la capacitación son importantes, pues permiten incrementar la fluidez y permeabilidad de la membrana espermática y permiten el flujo de iones que son necesarios para iniciar la reacción acrosomal.

La reacción del acrosoma es un evento de exocitosis iniciado fisiológicamente inmediatamente después de la unión del espermatozoide al ovocito. La membrana plasmática se fusiona con la membrana acrosomal externa y en múltiples sitios se producen espacios que permiten la liberación del contenido acrosomal. Las enzimas hidrolíticas liberadas son necesarias para disolver la estructura de la zona pelúcida y permitir que el espermatozoide ingrese al espacio perivitelino (Tulsiani *et al.*, 1998).

Para entender los mecanismos moleculares de la reacción del acrosoma es necesario revisar la estructura del citoesqueleto de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa. El citoesqueleto de la membrana plasmática es rico en actina, una proteína característica de las fibras musculares. En los espermatozoides capacitados, esta proteína se presenta en forma de filamentos (F-actina) y ha sido sugerido que provee una base para mantener a la fosfolipasa C unida a la membrana espermática. Asimismo, la F-actina forma una barrera física que evita la fusión entre la membrana plasmática y la

membrana acrosomal externa (Spungin *et al.*, 1995). En respuesta al incremento de Ca^{2+} y pH, la F-actina se despolimeriza a su forma soluble G-actina, la cual se dispersa, permitiendo el acercamiento entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (Spungin *et al.*, 1995). Al mismo tiempo, la fosfolipasa A_2 separa ácidos grasos de los fosfolípidos produciendo lisofosfolípidos, los cuales promueven la fusión de membranas. Breitbart y Spungin (1997) usando inhibidores específicos, han demostrado que la actividad de la fosfolipasa C y la depolimerización de F-actina unida a la membrana son esenciales en la fusión de membranas y por lo tanto en la reacción del acrosoma.

2.3 Evaluación de la función espermática

La evaluación de espermatozoides nos permite estimar la fertilidad potencial de cualquier semental en condiciones de laboratorio; sin embargo, no debe confundirse la evaluación del semen con la prueba de fertilidad, ya que la última se cuantifica mediante las tasas de concepción y la producción de descendencia viable. La prueba de fertilidad se constituye en la evaluación real de la capacidad reproductiva de un macho; no obstante, la evaluación de parámetros espermáticos proporciona suficientes elementos para la valoración de la capacidad de un reproductor en función de su calidad seminal (Sorensen, 1991; Illera, 1994). Las formas de evaluación de motilidad, integridad de membrana y vitalidad/integridad acrosomal que se describen a continuación son realizadas por un método subjetivo que incluye necesariamente la observación de células en un microscopio. Sin embargo, actualmente existe la citometría de flujo que permite evaluar casi todos los parámetros de función espermática como viabilidad, integridad acrosomal, función mitocondrial e integridad de ADN espermático (Cordelli *et al.*, 2005), así como también capacitación espermática, apoptosis, indicadores de estabilidad de cromatina espermática e indicadores de estrés oxidativo (Hollinshead *et al.*, 2004; Martínez-Pastor *et al.*, 2010) mediante un medio automatizado, eficiente y rápido.

2.3.1. Evaluación de la motilidad espermática

La determinación de la motilidad es una de las pruebas más utilizadas en la valoración de la calidad del semen. Una fuerte y progresiva motilidad es un índice importante de la viabilidad de la población espermática. A pesar que la motilidad se puede medir con la ayuda de sistemas automatizados, normalmente se hace, de forma subjetiva, mediante el examen microscópico realizado por un técnico experimentado (Sorensen, 1991; Illera, 1994).

Las muestras deben ser evaluadas tan pronto como sea posible, considerando la influencia que tienen los cambios de temperatura sobre la motilidad espermática. La técnica consiste en la observación microscópica (400 X) de una muestra de semen diluida en una lámina portaobjetos temperada; los espermatozoides aparecen activos con movimiento progresivo y se les puede ver momentáneamente individualizados. Se determina el porcentaje de espermatozoides mótils sobre el total de espermatozoides visualizados (Arthur *et al.*, 1991; Sorensen, 1991; Ax, 2002).

En el caso de camélidos sudamericanos, debido a la característica viscosa del semen, no se aprecia la motilidad masal y la motilidad espermática es estacionaria u ondulante y no progresiva (Bravo *et al.*, 2002).

2.3.2. Evaluación de la integridad funcional de membrana

Considerando el daño experimentado por los espermatozoides durante los procesos de criopreservación, principalmente debido a la alteración del metabolismo celular y daños en la membrana espermática, toma mucha importancia la adecuada evaluación de la capacidad fecundante de estas células germinales en función de la integridad de dicha membrana (Watson, 2000; Sánchez *et al.*, 2002).

La membrana espermática es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, función que le permite adaptar su metabolismo al medio en que se encuentra. La evaluación de su capacidad funcional constituye información importante considerando que la integridad de la membrana plasmática tiene estrecha relación con una adecuada capacitación y reacción acrosómica y, por tanto, con la fertilidad del espermatozoide (Yanagimachi, 1993).

La prueba hipoosmótica o HOS (*hyposmotic swelling test*) permite evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides mediante la observación de las alteraciones morfológicas que sufren las células al ser expuestas a condiciones hipotónicas (hinchazón y flexión de la parte distal de la cola espermática). Al ser sometidos al desbalance osmótico que ocasiona el medio hipotónico, los espermatozoides intentan alcanzar el equilibrio dejando ingresar agua al medio intracelular y, como consecuencia, la célula aumenta su volumen ocurriendo los cambios morfológicos antes mencionados (Jeyendran *et al.*, 1984). Es así que se puede diferenciar, mediante el uso de un microscopio, aquellos espermatozoides con membrana funcional de aquellos que no la posean pudiendo finalmente, estimar la proporción de espermatozoides que contaban con una membrana íntegra y operativa. En condiciones fisiológicas la fecundación no ocurre si la membrana plasmática del espermatozoide es disfuncional, aún cuando permanezca estructuralmente intacta, por lo tanto la prueba hipoosmótica es un indicador más preciso que las coloraciones supravitales (Sánchez *et al.*, 2002).

2.3.3. Evaluación de la vitalidad e integridad acrosomal

Los espermatozoides vivos no permiten el ingreso de colorantes supravitales, mientras los muertos los absorben; es decir, la membrana espermática representa una barrera al paso de las mencionadas tinciones al medio intracelular. Este fenómeno biofísico permitió el desarrollo de técnicas orientadas a la diferenciación de los espermatozoides vivos de muertos (Sorensen, 1991). Son varios los colorantes que pueden usarse para la determinación de la vitalidad. Éstos, en su mayoría, son mezclas de eosina y algún colorante de contraste, siendo las más usadas las combinaciones Eosina-nigrosina y Eosina-verde resistente (Sorensen, 1991).

El acrosoma es un delgado saco membranoso de doble capa que cubre el extremo anterior del núcleo del espermatozoide. Contiene acrosina, hialuronidasa, y otras enzimas hidrolíticas (Garner y Hafez, 2002). La evaluación de este componente espermático resulta esencial al considerar que participa del proceso de fecundación del ovocito. Esta valoración toma mayor relevancia en espermatozoides criopreservados cuya mayor

permeabilidad al calcio, inducida por las bajas temperaturas, posibilitan reacciones capacitantes anticipadas que menguarían el potencial fecundante del espermatozoide.

En 1989, Didion *et al.* reportaron una técnica de doble tinción que permite evaluar la vitalidad y la integridad acrosomal de espermatozoides humanos, de manera simultánea. Esta técnica incluye el uso de un colorante vital, el azul tripán, para la diferenciación de espermatozoides vivos y muertos, y al giemsa para la determinación de la integridad del acrosoma. Así mismo, Santiani *et al.* (2005) hicieron uso de la referida técnica para la evaluación de espermatozoides de alpaca sometidos a congelación encontrando un efectivo método para la evaluación de la vitalidad y la integridad del acrosoma.

2.3.4. Evaluación de la fragmentación de ADN espermático

La integridad del ADN espermático puede estar relacionada con el desarrollo embrionario temprano más que con la capacidad fecundante de un espermatozoide (Eid *et al.*, 1994). Existen 4 técnicas utilizadas comúnmente para evaluar la integridad del ADN espermático: prueba Cometa, prueba de estabilidad de la cromatina espermática, el test de naranja de acridina y el TUNEL (Mocé y Graham, 2008).

La técnica TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-End Labeling*) consiste en medir las roturas existentes en la cadena de ADN incorporando moléculas marcadas fluorescentemente. Durante la apoptosis o fragmentación del ADN espermático, se producen fragmentos de ADN o cadenas simples de ADN, las cuales son factibles de ser detectados mediante la incorporación de nucleótidos marcados con fluoresceína (Gorzcyca *et al.*, 1993). Los espermatozoides marcados con la sonda del TUNEL presentan una fluorescencia de color verde, que podría ser evaluada mediante microscopía de fluorescencia o mediante citometría de flujo. En el caso de las lecturas mediante microscopía de fluorescencia, se recomienda contar 200 espermatozoides por duplicado para disminuir la probabilidad de error (WHO, 2002), lo cual puede constituir la evaluación en un proceso largo y tedioso. Por el contrario, la evaluación del ensayo de TUNEL mediante citometría de flujo se realiza en segundos y evaluando un población de 10 000 espermatozoides, constituyendo entonces un análisis más objetivo y replicable

(Muratori *et al.*, 2008). Existen reportes previos que indican que el porcentaje de daño espermático encontrado mediante citometría de flujo puede ser el doble o hasta el triple que los detectados mediante microscopia del fluorescencia (Muratori *et al.*, 2008).

2.4 Criopreservación de semen

Los espermatozoides son células metabólicamente activas que requieren ATP como fuente de energía para permitir el movimiento espermático (Garner y Háfiez, 2000). Estas células poseen las enzimas necesarias para realizar diversas reacciones bioquímicas como la glicólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, oxidación de ácidos grasos y transporte de electrones (Garner y Háfiez, 2000). La reducción de la temperatura a 4°C reduce la actividad metabólica celular y permite el aumento del periodo de vida de las células. Sin embargo, para detener completamente los procesos metabólicos, los espermatozoides necesitan ser mantenidos a temperaturas inferiores a -130°C (Medeiros *et al.*, 2002).

La criopreservación de espermatozoides de mamíferos ofrece muchas ventajas en los sistemas de producción, particularmente en los programas de mejoramiento genético. Sin embargo, el principal obstáculo para la criopreservación de semen es que el proceso de congelamiento-descongelamiento de espermatozoides generalmente tiende a disminuir el porcentaje de células móviles como resultado del daño celular (Quinn *et al.*, 1969). Consecuentemente, la fertilidad obtenida al utilizar semen congelado es menor en comparación a cuando se utiliza semen fresco (Watson, 2000).

Las alteraciones en la estructura y fisiología de la membrana espermática luego del proceso de congelamiento-descongelamiento pueden ser causadas por una combinación de factores como la susceptibilidad de los espermatozoides a la criopreservación y la composición de los medios de dilución de semen (Medeiros *et al.*, 2002). Los efectos adversos causados por el enfriamiento incluyen el daño de la membrana celular y la alteración en la función metabólica de los espermatozoides. Estos efectos adversos pueden ser prevenidos controlando la velocidad de congelamiento y agregando componentes protectores a los diluyentes de semen (Medeiros *et al.*, 2002).

2.4.1. Principios de criopreservación

El congelamiento de espermatozoides causa estrés a las células como resultado de la interacción agua-solutos, mientras ocurre la formación de cristales de hielo (Holt, 2000). Durante el enfriamiento, la reducción de la temperatura a rangos entre -5 y -10°C produce la formación de cristales de hielo en el medio extracelular en suspensiones celulares. (Medeiros *et al.*, 2002). La presencia de hielo extracelular da lugar a regiones en fase sólida o cristalizada. Por otro lado, estudios de microscopía electrónica muestran que los espermatozoides permanecen excluidos del espacio ocupado por los cristales de hielo (Holt, 2000). Es decir, los espermatozoides permanecen suspendidos en la fracción líquida y gracias a la membrana plasmática se detiene el crecimiento cristalino dentro de la célula.

La cristalización en el medio extracelular da lugar a hielo puro, dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida, a medida que el cambio de fase progresa. Consecuentemente, los espermatozoides en suspensión deben deshidratarse para mantener el equilibrio osmótico con un medio extracelular cada vez más hipertónico, denominado “efecto solución” (Medeiros *et al.*, 2002). La máxima concentración de solutos que puede alcanzarse justo antes de que el agua remanente y los solutos de la fracción líquida se solidifiquen conjuntamente se denomina punto eutéctico.

El sobreenfriamiento consiste en un estado metaestable, en el que la suspensión celular enfriada lentamente alcanza temperaturas por debajo de su punto de cristalización manteniéndose sin embargo en estado líquido. En consecuencia, el agua intracelular sobreenfriada, fluye hacia al extracelular en respuesta a la diferencia osmótica que se crea entre el medio intra y extracelular (Medeiros *et al.*, 2002). De esta manera, este proceso produce deshidratación celular. La deshidratación severa causada por el “efecto solución” produce la desnaturalización de macromoléculas y una excesiva reducción del tamaño celular hasta el colapso irreversible de la membrana plasmática (Mazur, 1984). Por otro lado, cuando se utilizan velocidades de congelamiento rápidas, la inadecuada deshidratación de la célula produce la formación de cristales de hielo intracelularmente, los cuales tienen un efecto letal (Mazur, 1984). Consecuentemente, la velocidad de congelamiento debe ser lo suficientemente lenta para permitir que ocurra la deshidratación celular, impidiendo la formación de hielo intracelular, y al mismo tiempo, debe ser lo

suficientemente rápida para prevenir la exposición del espermatozoide a condiciones hiperosmóticas crecientes y consecuentemente deshidratación excesiva (Holt, 2000).

2.4.2. Proceso de criopreservación

Los protocolos de congelamiento de semen en mamíferos incluyen generalmente 2 pasos: en el primero el semen es diluido y enfriado hasta temperaturas cercanas a 0°C, mientras que en el segundo paso, el semen es congelado y posteriormente almacenado en nitrógeno líquido (Salamon y Maxwell, 2000).

El semen diluido es enfriado hasta temperaturas cercanas a 0°C (Salamon y Maxwell, 2000). El periodo de enfriamiento entre 30 a 5°C disminuye la motilidad espermática (Fiser y Fairfull, 1986) y tiene una duración que varía entre a 1 a 3 horas (Kumar *et al.*, 2003). Algunos autores incluyen un periodo de 14 horas a 5°C antes de iniciar el congelamiento para permitir el equilibrio celular (El-Alamy y Foote, 2001). Sin embargo, Salamon y Maxwell (2000) sostienen que el enfriamiento hasta los 5°C en un periodo de 1,5 a 2 horas es suficiente para permitir un adecuado periodo de equilibrio entre los espermatozoides y el medio.

Cuando la temperatura del semen llega a 5°C, empieza el proceso de congelamiento, el cual puede ser realizado suspendiendo las pajillas en vapores de nitrógeno líquido (Salamon y Maxwell, 2000) o utilizando equipos congeladores programables (Kumar *et al.*, 2003).

La velocidad de congelamiento es de considerable importancia para la viabilidad espermática durante el rango crítico de temperatura (Kumar *et al.*, 2003). Este rango es definido como el periodo donde ocurre la formación de cristales de hielo y la consecuente deshidratación celular (Kumar *et al.*, 2003). En el caso de espermatozoides de ovinos, los principales daños al espermatozoide ocurren entre -10 a -25°C (Salamon y Maxwell, 1995), tanto al congelar como al descongelar, y no durante el almacenamiento en nitrógeno líquido (Mazur, 1965). En general, el rango crítico de temperatura comprende entre los -5 los -50°C (Kumar *et al.*, 2003).

La óptima velocidad de congelamiento permite la mayor sobrevivencia de espermatozoides luego del proceso de congelamiento-descongelamiento. Como se ha mencionado anteriormente, la velocidad óptima de congelamiento es 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). En ovinos la velocidad de congelamiento de 5°C/minuto entre 5 a -25°C; 50°C/minuto entre -25°C a -130°C y posterior inmersión en nitrógeno líquido produce la mejor viabilidad, actividad mitocondrial, integridad del acrosoma y fertilidad *in vitro* e *in vivo* (Byrne *et al.*, 2000). Por lo tanto, para ovinos la reducción de la temperatura a 5°C/minuto durante el rango crítico de congelamiento parece ser la más cercana a la velocidad óptima de congelamiento. No obstante, la velocidad óptima de congelamiento varía en otras especies. De esta manera, en espermatozoides humanos es 1-10°C/minuto, debido a que velocidades de congelamiento mayores (25-45°C/ minuto) causan formación de hielo intracelular que daña las membranas plasmáticas (Devireddy *et al.*, 2000). Por otro lado, en espermatozoides bovinos la velocidad óptima de congelamiento es 50-100°C/minuto (Medeiros *et al.*, 2002).

Una vez congelado el semen, la temperatura óptima para sumergir las pajillas en nitrógeno líquido varía entre -125 a -130°C (Byrne *et al.*, 2000). Mantener las pajillas 8 cm encima de nitrógeno líquido también permite reducir la temperatura dentro de las pajillas a -150°C en 15 minutos (El-Alamy y Foote, 2001). Sumergir las pajillas a mayores temperaturas (entre -25 a -75°C) ó sumergirlas directamente al nitrógeno líquido resulta en una gran disminución de la motilidad y viabilidad espermática (Salamon y Maxwell, 2000).

Finalmente, el descongelamiento del semen es tan importante como la fase de congelamiento, debido a que los espermatozoides tienen que atravesar nuevamente el rango crítico de temperatura (Salamon y Maxwell, 2000). El descongelamiento rápido es necesario para prevenir la recristalización de cualquier cristal de hielo intracelular presente en el espermatozoide. En la mayoría de trabajos, la descongelación de pajillas de semen se realiza en baño maría a 37-50°C durante algunos segundos hasta 5 minutos (El-Alamy y Foote, 2001; Kumar *et al.*, 2003). Por otro lado, Salamon y Maxwell (2000) señalan que temperaturas de descongelamiento altas (60-75°C) son similares a temperaturas entre 38-

42°C en términos de motilidad e integridad acrosomal post-descongelamiento. En contraste, el descongelamiento a temperaturas menores de 37°C previene el shock osmótico y mantiene la integridad de membrana en espermatozoides bovinos (Correa *et al.*, 1996), aunque disminuye la motilidad tanto en espermatozoides ovinos (Fiser *et al.*, 1981) como bovinos (Correa *et al.*, 1996). Asimismo, el descenso de la viabilidad espermática es más pronunciado en espermatozoides descongelados en temperatura ambiente, lo cual sugiere un daño causado por revitrificación de cristales de hielo durante el descongelamiento lento (Fiser *et al.*, 1981).

2.4.3. Criopreservación de espermatozoides en alpacas

La criopreservación de semen permite el mantenimiento de espermatozoides en temperaturas muy bajas (N₂ líquido, -196°C), siendo posible mantener estas células por periodos indefinidos de tiempo. En camélidos sudamericanos, la información relacionada a la criopreservación de semen es escasa y como consecuencia aún no se trabaja en forma masiva en inseminación artificial con semen congelado. Algunas razones por las cuales no se ha desarrollado más este tema incluyen la dificultad en la colección de semen, la alta viscosidad seminal, la reducida concentración espermática y la gran cantidad de espermatozoides anormales que se encuentran al inicio en la mayoría de muestras, que en conjunto incrementan la dificultad de obtener parámetros espermáticos suficientes que garanticen la fecundación luego del proceso de criopreservación (Bravo *et al.*, 1997).

En alpacas sólo existe un trabajo sobre criopreservación de semen de alpaca (Santiani *et al.*, 2005) y unos 4 estudios sobre criopreservación de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo (Morton *et al.*, 2007, 2010; Rodríguez, 2009; Banda *et al.*, 2010). En llamas, la situación es similar, encontrando los trabajos de Von Baer y Hellemann (1999) y Aller *et al.* (2003). Adicionalmente encontramos otros trabajos descritos en forma muy superficial en resúmenes de eventos científicos como los reportados por Bravo *et al.* (1996) y Valdivia *et al.* (2000) en espermatozoides de alpacas; y Graham *et al.* (1978) y Bravo *et al.* (1996) en espermatozoides de llamas.

Cuadro2. Estudios realizados en criopreservación de espermatozoides de camélidos sudamericanos

Autores	Año	Especie	Origen de muestra	Dilutor/crioprotector	Motilidad (%)	
					Fresco	Congelado
Morton <i>et al.</i>	2010	Alpaca	Epidídimo	Lactosa -glicerol 2%	52.7	16.1
				Lactosa -glicerol 3%		20.5
				Lactosa -glicerol 4%		18.5
				Biladyl	53.0	14.4
				Biladyl-Equex		21.5
Banda <i>et al.</i>	2010	Alpaca	Epidídimo	Leche	31.0	17.0
Rodríguez	2009	Alpaca	Epidídimo	Tes-DMA	21.2	13.59
				Tes-DMA-Plasma Seminal		16.31
Morton <i>et al.</i>	2007	Alpaca	Epidídimo	Citrato	46.9	6.9
				Lactosa		18.2
				Tris		11.3
González	2008	Alpaca	Semen	Glicerol-Yema	75.0	15.0
			Epidídimo	Glicerol-Yema	25.0	5.0
Santiani <i>et al.</i>	2005	Alpaca	Semen	Leche-etilenglicol	72.0	20.0
				Leche-glicerol		15.3
				Tris-glicerol		4.0
				Tris-etilenglicol		1.0
Aller <i>et al.</i>	2003	Llama	Semen	Citrato-glicerol	54.3	20.4
Valdivia <i>et al.</i>	1999	Alpaca	Semen	Glicerol-yema	60-98	15-20
von Baer y H	1999	Llama	Semen	Tris	n.d.	26.8
				Tris-equex	n.d.	25.0
Bravo <i>et al.</i>	1996	Alpaca	Semen	Citrato-yema	80.0	30-40
Mc Evoy <i>et al.</i>	1991	Llama	Semen	Tris-yema-glicerol	n.d.	10.0
Graham <i>et al.</i>	1978	Llama	Semen	No disponible	50.0	45.0

En los estudios mencionados anteriormente, el único parámetro seminal evaluado en todos los experimentos es la motilidad espermática. La motilidad espermática post descongelamiento de alpacas varía alrededor del 10-20% (Morton *et al.*, 2007, 2010; Santiani *et al.*, 2005; Valdivia *et al.*, 2000), en forma similar a lo reportado en llamas (Von Baer y Hellemann, 1999; Aller *et al.*, 2003) (Cuadro 2). Aparentemente no existen diferencias en motilidad al trabajar con espermatozoides obtenidos del epidídimo con o sin plasma seminal (Rodríguez, 2009) en comparación con espermatozoides obtenidos de semen (Santiani *et al.*, 2005).

Es interesante destacar que según los reportes de Banda *et al.* (2010) y Rodríguez (2009), si bien la motilidad post descongelamiento varía alrededor del 20%, los porcentajes de viabilidad pueden alcanzar un rango de 40 a 50%. Asimismo, se puede observar que los acrosomas no experimentan un daño importante durante el proceso de criopreservación (Morton *et al.*, 2007, 2010; Santiani *et al.*, 2005). Estos resultados indicarían que las células espermáticas han sido desestabilizadas durante los procesos de congelamiento/descongelamiento, alterando su función de motilidad, pero no causando la muerte celular.

2.4.4. Dilutores y agentes crioprotectores

La osmolaridad del diluyente afecta la calidad espermática en mamíferos luego del descongelamiento, obteniéndose la mejor motilidad post descongelamiento en medios con una osmolaridad entre 300 a 360 mOsm/kg (Molinia *et al.*, 1994) ó entre 450 a 750 mOsm/kg (Fiser *et al.*, 1981). La integridad de la membrana plasmática resiste hasta 1000 mOsm/kg en condiciones hiperosmóticas. No obstante, cuando los espermatozoides retornan a condiciones isosmóticas, niveles superiores a 600 mOsm/kg alteran la motilidad y la integridad de membranas (Curry y Watson, 1994). Entonces, el daño a la membrana plasmática ocurre durante el descongelamiento (condiciones osmóticas descendentes), pero es marcado por el estrés hiperosmótico durante el congelamiento. Por lo tanto, los espermatozoides requieren de sustancias que permitan disminuir el efecto del estrés osmótico durante la criopreservación.

Los efectos nocivos producidos durante la congelación son disminuidos por los agentes crioprotectores. Los agentes crioprotectores son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada (García y Vila, 1984), previniendo de esta forma el estrés osmótico. El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará la máxima concentración de solutos a una temperatura menor, de forma que los espermatozoides estarán más deshidratados y el estrés osmótico al que estarán sometidos será menor (García y Vila, 1984). De esta manera, los agentes crioprotectores previenen la formación de hielo intracelular debido a la mayor deshidratación celular (Medeiros *et al.*, 2002).

Los agentes crioprotectores pueden clasificarse en agentes penetrantes ó de acción intracelular y agentes no penetrantes ó de acción extracelular.

Agentes crioprotectores penetrantes o permeantes.

Son sustancias de bajo peso molecular y por ello pueden ingresar a la célula a través de la membrana plasmática. Estos agentes al ingresar a la célula, evitan los efectos nocivos de la deshidratación excesiva causada por la congelación lenta. Asimismo, los crioprotectores que atraviesan la membrana plasmática reemplazan el volumen de agua que sale al extracelular. Consecuentemente, los crioprotectores también mantienen el volumen celular, evitando el colapso de los espermatozoides por una deshidratación excesiva (Medeiros *et al.*, 2002). Entre los más utilizados están: glicerol, etilenglicol, dimetilsulfóxido y propanediol (Boiso, 2001). Los agentes crioprotectores penetrantes, dependiendo de su concentración, pueden ser tóxicos para los espermatozoides, induciendo alteraciones en la membrana plasmática y disminuyendo la motilidad espermática (Medeiros *et al.*, 2002). En el cuadro3 se presentan las características biofísicas de los principales crioprotectores penetrantes.

Cuadro 3. Características biofísicas de los crioprotectores penetrantes

Parámetros	Glicerol	Etilenglicol	Dimetilsulfóxido
Fórmula química	$C_3H_5(OH)_3$	$(CH_2OH)_2$	$(CH_3)_2SO$
Peso molecular	92,10	62,07	78,13
Densidad	1,25	1,10	1,11
Masa (g/L) 1 M	92,10	62,07	78,13
Volumen (mL/L) 1 M	73,70	55,90	71,00

Agentes crioprotectores no penetrante o no permeantes.

Son sustancias de alto peso molecular que son efectivas cuando se utilizan velocidades altas de congelación. Ejercen su acción crioprotectora por estimulación osmótica de la rápida deshidratación celular, de esta manera disminuyen el volumen de agua intracelular que podría formar cristales de hielo (Medeiros *et al.*, 2002). También aumentan la viscosidad del medio extracelular a bajas temperaturas. Por lo tanto, reducen la formación de cristales de hielo (De Leeuw *et al.*, 1993). Además se ha encontrado que los azúcares interactúan con la membrana plasmática al formar puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los azúcares con los grupos fosfato de los fosfolípidos de membrana. Al reemplazar el agua alrededor de los fosfolípidos, previenen el daño a la membrana durante la deshidratación celular (De Leeuw *et al.*, 1993). Estos agentes suelen usarse en asociación con los agentes penetrantes. Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa, polivinil-pirrolidona (PVP), dextrano, polietilenglicol, entre otros (Boiso, 2001).

2.4.5. Efectos de la criopreservación en la función espermática

Una de las principales características de los espermatozoides criopreservados es la disminución de la proporción de células móviles. Mientras la minoría de células muestra motilidad progresiva vigorosa, la mayoría presentan motilidad afectada en diferentes grados. En ese sentido, tanto la motilidad, como la motilidad progresiva son factores importantes para optimizar las tasa de fecundación (Watson, 2000).

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 (Watson, 2000). Las características del semen fresco de ovinos tienden a disminuir por efecto del proceso de congelamiento-descongelamiento, al igual que en las demás especies.

La motilidad inicial del semen fresco en alpacas varía entre 40 a 80% (para descender hasta 10-20% luego del descongelamiento (Morton *et al.*, 2007, 2010; Santiani *et al.*, 2005). En otras especies, se parte de una motilidad inicial superior, encontrando porcentajes de motilidad posdescongelamiento que varían entre 40 a 60%. Así en ovinos la motilidad inicial varía entre 60 a 80% (Garner y Háfez, 2002), mientras que la motilidad post descongelamiento se reduce a valores entre 40 a 60% (Salamon y Maxwell, 2000).

A pesar que la proporción de espermatozoides móviles luego del proceso de congelamiento-descongelamiento es aceptable, sólo un reducido número de los espermatozoides viables se mantiene sin alteraciones biológicas (Salamon y Maxwell, 2000).

El proceso de criopreservación está relacionado a la capacitación espermática. En ovinos, los espermatozoides luego del proceso de congelamiento-descongelamiento muestran un alto porcentaje de capacitación en comparación con espermatozoides de semen fresco (Pérez *et al.*, 1996; Maxwell y Watson, 1996). En ese sentido, el porcentaje de espermatozoides capacitados en semen fresco varía entre 5 a 20%, mientras que en espermatozoides descongelados el porcentaje de capacitación puede llegar hasta 90% (Pérez *et al.*, 1996), aunque varía entre 40 a 60% (Gil *et al.*, 2003). Similares resultados son reportados en espermatozoides bovinos (Cormier *et al.*, 1997). Adicionalmente, el proceso de congelación de espermatozoides ovinos induce cambios en la exposición de epítopes de

actina en la superficie espermática (De las Heras *et al.*, 1997) que también estarían relacionados a los procesos de capacitación. En camélidos sudamericanos no existen estudios que indiquen si este fenómeno estaría ocurriendo en forma similar.

En relación a la integridad acrosomal, la criopreservación aumentaría ligeramente la reacción del acrosoma en espermatozoides viables de alpacas. De acuerdo a los reportado por Morton *et al.* (2010) y Santiani *et al.* (2005) la cantidad de daño acrosomal producido por el proceso de criopreservación es menor al 5%. Del mismo modo, en ovinos, la mayoría de espermatozoides que sobreviven el proceso de congelamiento-descongelamiento (40-70%) mantienen sus acrosomas intactos (Valcárcel *et al.*, 1997). Solamente alrededor del 10% (Pérez *et al.*, 1996; D'Alessandro *et al.*, 2001; Gil *et al.*, 2003) de espermatozoides vivos luego del descongelamiento experimentan reacción acrosomal, en comparación con la reacción acrosomal menor a 4% en semen fresco de ovino (Pérez *et al.*, 1996; Valcárcel *et al.*, 1997; Paulenz *et al.*, 2002). Solamente Maxwell y Watson (1995) reportan porcentajes más elevados de reacción acrosomal, aunque siempre con la menor proporción para semen fresco (19%) en comparación con semen congelado (25-30%).

2.5 Vitrificación de semen

La vitrificación es un procedimiento para preservar embriones, ovocitos, espermatozoides y tejidos gonadales en nitrógeno líquido a -196°C (Shaw y Jones, 2003). Una de las principales diferencias con los métodos tradicionales de criopreservación (congelamiento lento) es que se logra un descenso de la temperatura muy rápido (entre $300-600^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$; Isachenko *et al.*, 2004a). Esto se logra colocando las muestras celulares directamente en el nitrógeno líquido (Isachenko *et al.*, 2004a) en donde se busca el menor tiempo de equilibrio entre el medio vitrificante y las células (Shaw y Jones, 2003). En este caso no se forman cristales de hielo, sino moléculas parecidas al vidrio, de ahí el nombre de vitrificación (Shaw y Jones, 2003). Otra característica, es que por ser un método muy rápido, de producirse ROS, su efecto nocivo para las células sólo sería durante un máximo de 5 minutos, en comparación con el congelamiento tradicional donde las células pueden estar expuestas a ROS entre 30 a 120 minutos durante el periodo de equilibrio.

En el caso de la vitrificación de ovocitos o embriones, se utilizan altas concentraciones (30-50%) de agentes crioprotectores (glicerol, etilenglicol, dimetilsulfóxido, etc), cuyos efectos tóxicos son conocidos en espermatozoides (Isachenko *et al.*, 2004b), sin embargo, el método descrito para vitrificar espermatozoides tiene como ventaja que evita la utilización de agentes crioprotectores permeantes (Isachenko *et al.*, 2004b).

La vitrificación de espermatozoides viene siendo estudiada en espermatozoides de primates humanos (Isachenko *et al.*, 2004, 2004b, 2008; Hossain y Osuamkpe, 2007) y no humanos (Dong *et al.*, 2009), en espermatozoides de caninos (Sánchez *et al.*, 2011) e incluso en espermatozoides de salmón (*Oncorhynchus mykiss*) (Merino *et al.*, 2011a, 2011b).

En humanos, Isachenko *et al.* (2004b) reportan un 50% de motilidad luego de la vitrificación, sin embargo, también se reporta que la vitrificación puede aumentar considerablemente el porcentaje de células apoptóticas (Tahmineh *et al.*, 2007). En espermatozoides de salmón se ha obtenido más de 80% de motilidad y vitalidad, así como un 50% de integridad de membrana mitocondrial utilizando un medio de vitrificación junto con albúmina sérica bovina y plasma seminal (Merino *et al.*, 2011b). En la única especie de mamífero doméstico (perro) donde se han realizado experimentos de vitrificación de espermatozoides, se ha obtenido un 42.5% de motilidad luego de la vitrificación (Sánchez *et al.*, 2011). No existen reportes sobre vitrificación en otros mamíferos domésticos como rumiantes ó camélidos.

2.6 Especies reactivas de oxígeno

El término “especies reactivas de oxígeno” ó ROS se refiere a todos los radicales libres o especies activadas de oxígeno que puedan causar daño oxidativo (Fuchs *et al.*, 1997). En las mitocondrias, el oxígeno reacciona con el hidrógeno, en un proceso denominado fosforilación oxidativa. La reacción química consiste en la reducción tetravalente del oxígeno molecular hacia agua (Fridovich, 1998). En una reacción secundaria, los ROS son formados por la reducción univalente del oxígeno (Fuchs *et al.*,

1997). Algunos de los radicales libres de oxígeno son: radical peróxido (ROO^\cdot), radical hidroxilo (OH^\cdot) y anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), mientras que el principal ROS no radical es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Aitken y Fisher, 1994).

Los radicales libres de oxígeno, son moléculas reactivas intermediarias de corto tiempo de vida, que tienen uno o más electrones no apareados girando en sus órbitas externas (Warren *et al.*, 1987). Esta condición químicamente muy inestable, los torna sumamente activos, puesto que el electrón no apareado busca salir de su desequilibrio. Para ello, debe oxidar, es decir, sustraer un electrón a cualquier molécula vecina, alterando su estructura y convirtiéndola a su vez en otro radical libre (Fridovich, 1998). De esta manera pueden iniciar reacciones en cadena, como por ejemplo la peroxidación lipídica (Fuchs *et al.*, 1997).

El radical hidroxilo (OH^\cdot), 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. Por lo tanto, el OH^\cdot generalmente no sale de su sitio de generación y actúa causando daño molecular a los ácidos nucleicos o proteínas funcionales (Fuchs *et al.*, 1997).

El anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) es un radical libre con reactividad intermedia. Este radical es capaz de difundirse y reaccionar con moléculas específicas. El $\text{O}_2^{\cdot-}$ es formado en las células durante el transporte de electrones en la mitocondria (Baker y Aitken, 2004) y el retículo endoplasmático (Fuchs *et al.*, 1997). En general, el daño causado por el $\text{O}_2^{\cdot-}$, es debido a su conversión hacia especies más reactivas. El $\text{O}_2^{\cdot-}$ 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).

Existen varios métodos para detectar la presencia de anión superóxido como quimioluminiscencia, sin embargo estos métodos no detectan el $\text{O}_2^{\cdot-}$ intracelular, como si lo puede hacer el dihydroethidium (DHE) (Burnaugh *et al.*, 2007). Existen reportes que indican que es posible cuantificar los niveles de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en espermatozoides equinos mediante la detección de DHE por citometría de flujo.

2.6.1. Estrés oxidativo seminal

En los organismos vivos, existe una continua producción de ROS que es controlada por protectores moleculares denominados antioxidantes. El estrés oxidativo es la alteración del balance entre oxidantes y antioxidantes (Fuchs *et al.*, 1997). Este término se aplica cuando los oxidantes superan a los antioxidantes (Sies, 1993), se desarrollan productos de peroxidación (Spitteler, 1993) y cuando estos fenómenos causan efectos patológicos (Janssen *et al.*, 1993).

El estrés oxidativo seminal está relacionado con pérdida de la función espermática (Álvarez y Storey, 1989) y por lo tanto con infertilidad (Aitken, 1994). Este estrés está originado por la excesiva producción de ROS por los espermatozoides (Aitken y Clarkson, 1987; Álvarez *et al.*, 1987) o por leucocitos activados presentes en el plasma seminal (Aitken *et al.*, 1994), resultando en la peroxidación de los ácidos grasos insaturados en la membrana espermática (Aitken *et al.*, 1989). Además, los ROS reducen la fusión espermatozoide-ovocito, penetración de espermatozoides a ovocitos (Blondin *et al.*, 1997), afectan la integridad del ADN (Aitken *et al.*, 1998) y motilidad espermática (Álvarez y Storey, 1989; Baumber *et al.*, 2002; Bilodeau *et al.*, 2002). El daño espermático inducido por el estrés oxidativo no sólo depende de la naturaleza y cantidad de ROS, sino también del momento y duración de la exposición a ROS y otros factores extracelulares como temperatura, tensión de oxígeno y la presencia de factores ambientales como iones, proteínas y antioxidantes (Saleh y Agarwal, 2002).

2.6.2. Producción de ROS en el semen

En humanos, los niveles de ROS están relacionados negativamente con la calidad seminal (Gómez *et al.*, 1998). Los espermatozoides son células particularmente sensibles a la acción de ROS por su escaso contenido de enzimas antioxidantes, la gran proporción de ácidos grasos poli-insaturados en su membrana plasmática y por la presencia del sistema NADPH oxidasa unido a membrana (Wai-sum *et al.*, 2006). Espermatozoides morfológicamente anormales (Aitken *et al.*, 1987, 1989; Ball y Vo, 2002), con poca motilidad (Aitken y Clarkson, 1988) y la presencia de leucocitos activados han sido

relacionados con la producción de elevadas cantidades de ROS (Aitken *et al.*, 1994; Baumber *et al.*, 2002). En ese sentido, espermatozoides equinos morfológicamente anormales producen mayores cantidades de ROS que los espermatozoides normales (Ball *et al.*, 2001). Asimismo, espermatozoides con exceso de citoplasma residual aumentan la producción de ROS, probablemente debido a la presencia de la enzima G₆PD, la cual estimula la formación de NADPH (Aitken *et al.*, 1995). Por otro lado, la adición de calcio ionóforo también estimula la producción de ROS en espermatozoides humanos (Aitken *et al.*, 1987) y equinos (Ball, 2001). Además, la producción de ROS aumenta con el tiempo de incubación y concentración de espermatozoides (Ball, 2002). Consecuentemente, la presencia de altos niveles ROS se relaciona a individuos con problemas de fertilidad

En ovinos, se ha demostrado la presencia de grandes cantidades de la enzima amino ácido aromática oxidasa, responsable de la producción de peróxido de hidrógeno (Upreti *et al.*, 1998). En humanos, los espermatozoides estarían generando ROS a través de dos mecanismos: (1) el sistema NADPH oxidasa a nivel de la membrana plasmática (Aitken *et al.*, 1992; Sukla *et al.*, 2005) y (2) el NADH dependiente oxido-reductasa a nivel mitocondrial (Gavella y Lipovac, 1992). Por otro lado, en bovinos, los ROS serían formados vía la desaminación oxidativa de aminoácidos aromáticos. En conejos, se ha propuesto que los ROS derivarían de la cadena de transporte de electrones a nivel mitocondrial (Aitken y Fisher, 1994). Resumiendo, los mecanismos celulares responsables para la generación de ROS por espermatozoides de mamíferos no están demostrados, aunque aparentemente existirían diferencias entre especies. Sin embargo existe consenso en que algunos de los principales radicales producidos por los espermatozoides serían el anión superóxido (Burnaugh *et al.*, 2007) y el peróxido de hidrógeno (Sukla *et al.*, 2005).

2.6.3. Efectos fisiológicos de ROS en espermatozoides

Si bien se sabe que los ROS están relacionados con la peroxidación lipídica de la membrana espermática, existen evidencias que el anión superóxido (O₂^{•-}) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) también participarían en la inducción de eventos fisiológicos del espermatozoide como capacitación espermática, hiperactivación y reacción acrosomal

(Aitken y Fisher, 1994; Baker y Aitken, 2004). Además los ROS también estarían regulando la condensación nuclear, activación de la motilidad espermática, hiperactivación, y la fusión espermatozoide-ovocito (Baker y Aitken, 2004).

Capacitación espermática inducida por ROS

Existen evidencias que pequeñas cantidades de ROS iniciarían el proceso de capacitación (O'Flaherty *et al.*, 1999; Burnaugh *et al.*, 2007, De Lamirande *et al.*, 2009), debido a que los espermatozoides capacitados producen más ROS que los espermatozoides no capacitados (De Lamirande *et al.*, 1998). Asimismo, la capacitación espermática puede ser inducida prematuramente por la presencia de ROS exógeno (De Lamirande y Gagnon, 1993; Villegas *et al.*, 2003). En ese sentido, la presencia del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es necesaria para la capacitación espermática de espermatozoides bovinos (O'Flaherty *et al.*, 1997) y equinos (Burnaugh *et al.*, 2007) e incluso puede reemplazar a la heparina como inductor de la capacitación (O'Flaherty *et al.*, 1999). Durante el proceso de capacitación, ROS incrementan la fosforilación de proteínas tirosina y AMPc (Ford, 2004). Por otro lado, la capacitación espermática puede ser bloqueada mediante la adición de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa en espermatozoides humanos (De Lamirande y Gagnon, 1993, De Lamirande *et al.*, 2009) y bovinos (O'Flaherty *et al.*, 1997, 1999). Estos resultados sugieren que el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) promueve la capacitación espermática (O'Flaherty *et al.*, 1999, 2003, Burnaugh *et al.*, 2007).

El rol del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no está bien definido en el proceso de capacitación. A pesar que el H_2O_2 aumenta significativamente durante la capacitación espermática (O'Flaherty *et al.*, 2003), la adición de catalasa no modifica el porcentaje de espermatozoides capacitados (O'Flaherty *et al.*, 1999). Por el contrario, la adición de H_2O_2 al medio capacitante disminuye la capacitación en espermatozoides bovinos descongelados (O'Flaherty *et al.*, 1997). Dichos autores sugieren que el H_2O_2 generado por dismutación del $O_2^{\cdot-}$, no participaría en la capacitación de espermatozoides bovinos. No obstante, en espermatozoides de hámsters, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) juega un rol importante en la capacitación espermática (Bize *et al.*, 1991).

El radical libre óxido nítrico (NO) también parece estar relacionado con la capacitación espermática. En ese sentido, la incubación de espermatozoides humanos en NO acelera la capacitación espermática y la capacidad a responder a inductores de la reacción acrosomal (Herrero *et al.*, 1999). Por otro lado, la adición de inhibidores del NO provoca una disminución significativa en la respuesta espermática a la inducción de la reacción acrosomal por fluido folicular humano ó calcio ionóforo (Herrero *et al.*, 1999). El mecanismo por el cual el óxido nítrico estaría acelerando la capacitación espermática parece estar relacionado a un incremento en la fosforilación de proteínas en tirosina (Herrero *et al.*, 1999). Estos resultados sugieren que la producción de óxido nítrico es necesaria para la capacitación de espermatozoides humanos y para permitir la respuesta a inductores de la reacción acrosomal.

Reacción acrosomal inducida por ROS

La presencia de ROS está relacionada a la reacción acrosomal. Esto se infiere a partir del estudio de Bize *et al.* (1991) quienes señalaron que la adición de catalasa al medio capacitante, inhibe la reacción acrosomal en espermatozoides de hámsters, mientras que la adición de H₂O₂ ó glucosa oxidasa (enzima que genera H₂O₂) acelera el inicio de la reacción acrosomal. Del mismo modo, la adición de superóxido dismutasa en conjunto con catalasa en espermatozoides capacitados reducen la reacción acrosomal inducida por lisofosfatidilcolina o bloquean la reacción acrosomal inducida con calcio ionóforo (De Lamirande *et al.*, 1998). Además, la incubación de espermatozoides con el sistema xantina y xantina-oxidasa (De Jonge *et al.*, 1991; De Lamirande *et al.*, 1998) ó inhibidores de la xantina fosfodiesterasa, aumentan la reacción acrosomal (De Jonge *et al.*, 1991). De igual manera, la presencia de ROS está relacionada con la reacción acrosomal y capacidad de espermatozoides de rata de unirse y penetrar ovocitos libres de zona pelúcida (Hsu *et al.*, 1999).

El mecanismo por el cual los ROS estimulan la reacción acrosomal puede relacionarse al aumento de la fosforilación en tirosina de las proteínas espermáticas (De Lamirande *et al.*, 1998). En ese sentido, la exposición de espermatozoides humanos a ROS

a través de la adición de H_2O_2 ó de NADPH incrementa la fosforilación de proteínas y la reacción acrosomal (Aitken *et al.*, 1999). Estos resultados confirman el efecto de ROS en la reacción acrosomal de espermatozoides de mamíferos. Además, la hiperactivación espermática, evento que permite que el espermatozoide encuentre al ovocito previo a la reacción acrosomal, también es inducida por ROS (De Lamirande y Gagnon, 1993). Similares resultados son reportados en espermatozoides de hámsters (Bize *et al.*, 1991). Aparentemente, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) activa la NADPH oxidasa de la membrana espermática permitiendo de esta manera la hiperactivación (De Lamirande y Gagnon, 1993).

2.6.4. Efectos patológicos de ROS en espermatozoides

Los principales efectos nocivos de ROS en espermatozoides incluyen la disminución de la motilidad, incremento de la peroxidación lipídica en la membrana plasmática e incremento en la fragmentación del ADN espermático. Otros parámetros de función espermática no son alterados significativamente en espermatozoides expuestos a niveles altos de ROS (Kasimanickam *et al.*, 2006), ni están relacionados con fragmentación del ADN espermático (Lukanov *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) está relacionado con una disminución de la motilidad espermática y que la pérdida de motilidad es el indicador más sensible de estrés oxidativo en comparación con otros parámetros seminales (Peris *et al.*, 2007). En un estudio, Stefanov *et al.* (2004) incubaron espermatozoides de ovino a $39^\circ C$ por 3 horas, encontrando un incremento entre 8 a 10 veces de anión superóxido y peróxido de hidrógeno, así como una disminución de la motilidad espermática de 80% al inicio del experimento hasta 30% luego de 180 minutos. Al adicionar un compuesto biológico que neutraliza los radicales de oxígeno mencionados, la motilidad espermática se mantuvo muy similar a sus valores iniciales (Stefanov *et al.*, 2004). En forma similar, Peris *et al.* (2007) reportan que la motilidad espermática es el primer parámetro afectado cuando se incuban espermatozoides de ovino con H_2O_2 , mientras que la viabilidad espermática no se altera. Además la reacción acrosomal

espontánea no aumenta debido a que la peroxidación lipídica altera los mecanismos de control a nivel de membranas que permiten llevar a cabo la reacción acrosomal (Peris *et al.*, 2007). Estos resultados nos permiten concluir que la motilidad espermática es uno de los principales parámetros de función espermática alterados por ROS.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) también tienen la capacidad de iniciar la cascada de la peroxidación lipídica en la membrana espermática. La peroxidación de los lípidos de la membrana se correlaciona con disminución de la motilidad espermática (Jones y Mann, 1977; Jones *et al.*, 1979; Storey, 1997). También inhibe la actividad fructolítica y respiratoria del espermatozoide (Jones y Mann, 1977). Del mismo modo, altas concentraciones de peróxido de hidrógeno inducen lipoperoxidación y causan muerte celular (Aitken, 1994).

La peroxidación lipídica es el deterioro oxidativo de los ácidos grasos poli-insaturados (Saleh y Agarwal, 2002). Los ácidos grasos poli-insaturados son susceptibles a experimentar ataque oxidativo porque la presencia de enlaces dobles debilita la unión C-H en los átomos de carbono adyacentes y facilita la sustracción de hidrógeno (Figura 1), paso inicial para el proceso oxidativo (Aitken y Fisher, 1994). Las membranas plasmáticas de los espermatozoides de mamíferos (humanos, Jones *et al.*, 1979, Aitken y De Luliis, 2010); porcinos, Cerolini *et al.*, 2001; equinos, Ball y Vo, 2002) tienen un alto contenido de ácidos grasos insaturados para conferir a su estructura la fluidez necesaria para permitir la fusión de membranas (Aitken y Fisher, 1994). En espermatozoides humanos por ejemplo, existe el 50% de los ácidos grasos de membrana lo representa el ácido docosahexaenoico, que presenta 6 dobles enlaces (Aitken y De Luliis, 2010). Consecuentemente, los espermatozoides son susceptibles a sufrir peroxidación lipídica por ROS (Álvarez y Storey, 1989; Aitken y De Luliis, 2010).

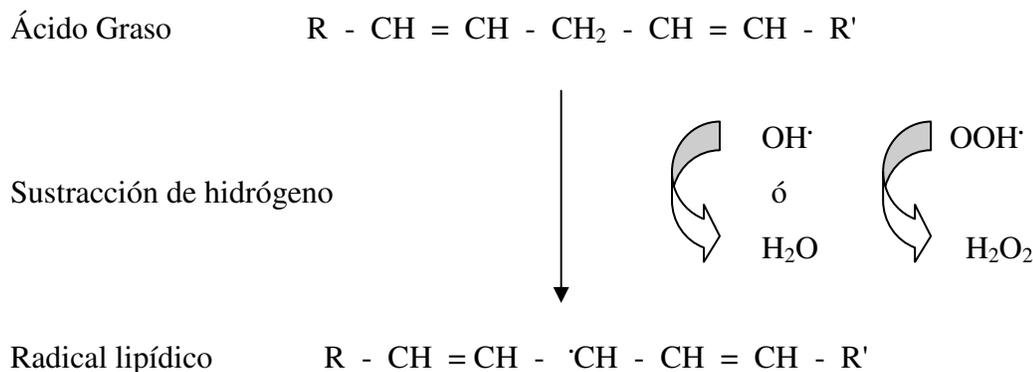


Figura 1. Inicio de peroxidación lipídica en relación a la sustracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso poli-insaturado

La cascada de la peroxidación lipídica se inicia directamente por la presencia del radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$). El anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), no son lo suficientemente reactivos para iniciar la peroxidación lipídica, pero en la presencia de metales de transición, como Fe o Cu, reaccionan (reacción de Haber-Weiss) y forman los radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$). Los radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) también pueden ser formados directamente mediante la reacción de Fenton, a partir del H_2O_2 en presencia de agentes reductores como Fe^{2+} (Aitken y Fisher, 1994). En humanos y ratones, la peroxidación lipídica es estimulada por la presencia de H_2O_2 (Álvarez y Storey, 1989). Sin embargo, en espermatozoides de conejo, el peróxido de hidrógeno no inicia la peroxidación lipídica. Es probable que en algunas especies como el conejo, los radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) se formen directamente a partir de la protonación del anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) para generar el radical hidropéroxilo (Aitken y Fisher, 1994), constituyendo una vía alterna para el inicio de la peroxidación lipídica

Cuando el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) ó el radical hidropéroxilo ($\text{HO}_2\cdot$) sustraen un átomo de hidrógeno de un ácido graso poli-insaturado de la membrana plasmática, se forma un radical lipídico ($\text{R}\cdot$). Luego, los radicales lipídicos se combinan con oxígeno para formar el radical lipídico peróxido ($\text{ROO}\cdot$). Dicho radical propaga la cascada de la peroxidación lipídica al sustraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso adyacente, para estabilizarse como peróxido lipídico (ROOH). Por lo tanto, la peroxidación lipídica propaga el daño a través de la membrana espermática en función de oxígeno disponible para la continua

generación de radicales peroxilo (Fuchs *et al.*, 1997). En la figura 2 (Aitken y Fisher, 1994) se esquematiza el mecanismo de peroxidación lipídica en espermatozoides.

Los peróxidos lipídicos pueden actuar como radicales libres en la presencia de metales de transición. La adición de Fe acelera la aparición del malondialdehído, producto terminal de la cascada de lipoperoxidación (Jones *et al.*, 1979). De este modo, en la presencia de iones Fe, los radicales peroxilo (ROO[•]) son generados a partir de ROOH, culminando en el aumento de la producción del producto terminal malondialdehído (Fuchs *et al.*, 1997). En ese sentido, el grado peroxidativo en espermatozoides puede ser calculado por el método del ácido tiobarbitúrico (TBA), el cual reacciona con el malondialdehído. De esta manera, la cantidad de malondialdehído generado luego de la incubación de espermatozoides con un promotor del ión ferroso va a depender de la cantidad de peróxidos lipídicos que se hayan acumulado en la célula antes del ensayo (Aitken *et al.*, 1989).

Otra de las consecuencias más importantes de los ROS en espermatozoides, es el daño en la integridad del ADN (Baker y Aitken, 2004). En humanos, existe una alta relación entre pacientes infértiles y fragmentación del ADN espermático (Lukanov *et al.*, 2004). Asimismo, estudios clínicos muestran una correlación negativa entre la tasa de clivaje y el daño al ADN (Aitken, 2004). También se ha reportado que los ROS producidos durante la criopreservación aumentan la fragmentación del ADN en ovinos (Peris *et al.*, 2007) y caninos (Sue-Hee *et al.*, 2010). Otros estudios parecen indicar que un espermatozoide con daño en su ADN es capaz de fecundar ovocitos, sin embargo puede estar relacionado con pérdidas embrionarias tempranas, disminución de la tasa de implantación y alta incidencia de anomalías estructurales en embriones implantados (Wai-sum *et al.*, 2006).

El daño al ADN espermático se debe a que los ROS sustraen un átomo de H de las unidades ribosa del ADN, formando bases de ADN abducidas. Esto trae como consecuencia la desestabilización de la cadena de ADN y la formación de múltiples fragmentos (Aitken y De Luiis, 2010). Una vez que se ha establecido el daño en el ADN, los espermatozoides inician un proceso de muerte celular similar a la apoptosis, diferenciándose en que los espermatozoides son células transcripcionalmente inertes, que la cantidad de nucleosomas es reducida y que la configuración del ADN espermático previene la acción de nucleasas (Aitken y De Luiis, 2010).

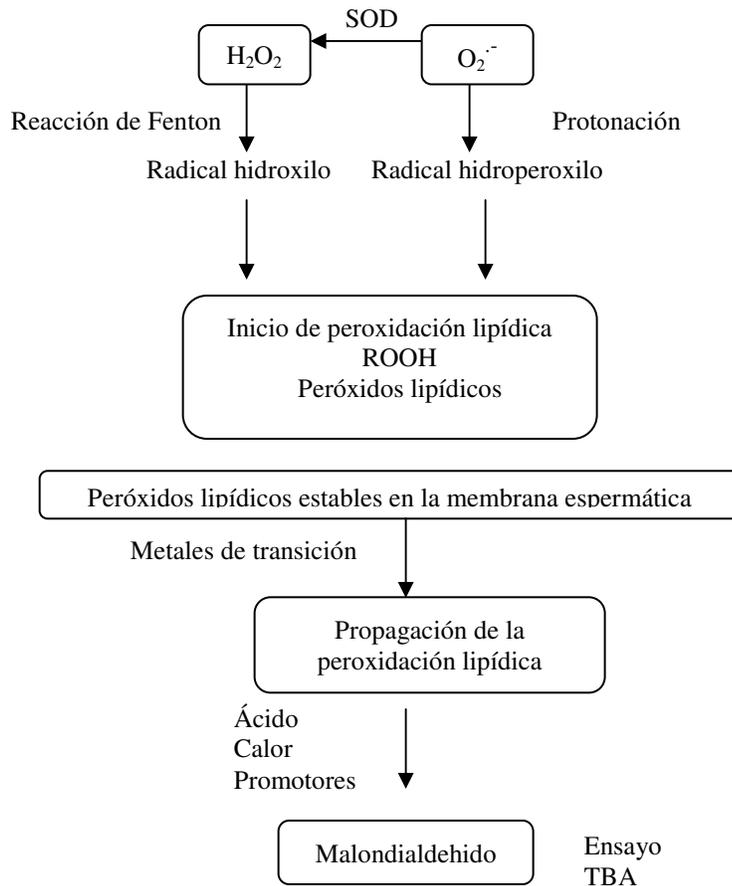


Figura 2. Representación esquemática de las vías de peroxidación lipídica.

2.6.5. Producción de ROS durante criopreservación

La producción de ROS aumenta durante el proceso de criopreservación. En ese sentido, la gradual reducción de temperatura estimula la generación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en espermatozoides bovinos. Asimismo, existe un aumento en los niveles de óxido nítrico durante el descongelamiento de espermatozoides bovinos (Chatterjee y Gagnon, 2001) y caninos (Tselkas *et al.*, 2000). Del mismo modo, en espermatozoides caninos (Sue-Hee *et al.*, 2010) y porcinos (Sue-Hee *et al.*, 2011), los niveles de peróxido de hidrógeno intracelular se encuentran aumentados luego del proceso de criopreservación. En humanos,

la producción de ROS aumenta significativamente durante el proceso de enfriamiento, con los máximos niveles observados a los 4°C (Wang *et al.*, 1997; Saleh y Agarwal, 2002). Similares resultados han sido encontrados en espermatozoides de ovino (Santiani, 2003). La peroxidación lipídica aumenta en espermatozoides equinos cuando son incubados a 5°C (Ball y Vo, 2002). Sin embargo, los niveles de ROS son extremadamente bajos en espermatozoides incubados a temperaturas inferiores a cero y en espermatozoides descongelados (Wang *et al.*, 1997). Debido a que la formación de ROS es parte de la actividad metabólica de las células, es probable que los ROS disminuyan por efecto de la congelación ya que la viabilidad disminuye. Además, la disminución de la actividad enzimática en temperaturas muy reducidas también explicaría los bajos niveles de ROS observados en espermatozoides congelados y descongelados.

La producción de ROS por espermatozoides descongelados no está bien estudiada. En ese sentido, Wang *et al.* (1997) indican que espermatozoides humanos descongelados pierden la capacidad para producir ROS. Dichos autores incubaron espermatozoides descongelados con polimorfos nucleares por 180 minutos sin conseguir un incremento en la producción de ROS. No obstante, Ball *et al.* (2001) señalan que la adición de NADPH aumenta significativamente la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en espermatozoides equinos descongelados en comparación con espermatozoides de semen fresco. Por otro lado, Santiani (2003), reporta que en espermatozoides descongelados de ovino encuentra niveles similares de ROS a los del semen fresco.

Elevados niveles de peroxidación lipídica han sido observados luego del proceso de congelamiento-descongelamiento en espermatozoides bovinos (Chatterjee y Gagnon., 2001), ovinos (Santiani, 2003) y humanos (Álvarez y Storey, 1992). El patrón de peroxidación lipídica observada en espermatozoides humanos luego del descongelamiento ha sido relacionado con disminución del contenido de fosfolípidos, especialmente de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolima (Álvarez y Storey, 1992). La disminución de la actividad de la superóxido dismutasa sugiere un efecto del anión superóxido (O₂⁻) en la peroxidación lipídica durante la criopreservación (Álvarez y Storey, 1992; Lasso *et al.*, 1994). Es probable que la peroxidación lipídica observada luego del descongelamiento haya sido causada durante el proceso de enfriamiento, particularmente en temperaturas cercanas

a los 4°C, en donde se producen las mayores cantidades de ROS (Wang *et al.*, 1997; Saleh y Agarwal, 2002).

La producción de niveles elevados ROS durante la criopreservación está relacionada con la presencia de ROS en semen fresco. En ese sentido, las muestras de semen con presencia de ROS previo a la criopreservación tienen una alta probabilidad de tener niveles significativamente elevados de ROS luego del proceso de criopreservación (Mazzilli *et al.*, 1995; Tselkas *et al.*, 2000). Por otro lado, en muestras de semen sin presencia de ROS previo al proceso de criopreservación también puede observarse un aumento de ROS, aunque con menor frecuencia (Mazzilli *et al.*, 1995) o con niveles no muy elevados (Tselkas *et al.*, 2000).

La producción de ROS durante el proceso de criopreservación está relacionada con pérdida de la función espermática. Los espermatozoides descongelados por lo general presentan disminución de motilidad (Bell *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1997; Tselkas *et al.*, 2000), vitalidad (Wang *et al.*, 1997), alteración en la integridad de la membrana plasmática (Wang *et al.*, 1997; Tselkas *et al.*, 2000) y daño en la estructura del ADN espermático (Baumber *et al.*, 2003). Consecuentemente, la prevención de la producción de ROS durante el proceso de criopreservación es importante para mantener una buena calidad espermática luego del proceso de congelamiento-descongelamiento.

2.7 Antioxidantes

Un antioxidante es cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones en comparación con un sustrato oxidable, reduce o inhibe significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell, 1995). Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar e interactuar más rápido con las especies reactivas de oxígeno en un determinado microambiente (Cuadro4). La acción de los antioxidantes es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de otras moléculas (Venereo, 2002). Intracelularmente, los principales mecanismos antioxidantes son las enzimas catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa, sin embargo, el espacio disponible para estas enzimas es bastante limitado en

los espermatozoides. Además de las enzimas, existen moléculas presentes en el plasma seminal como la transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina y albúmina, las cuales se unen a metales de transición de tal forma que éstos no estimulen las reacciones de los radicales libres. Otro grupo de antioxidantes lo constituyen el ácido ascórbico y ácido úrico, los cuales rompen las cadenas de oxidación al eliminar radicales peroxilo (Ochsendorf *et al.*, 1997). Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre (Venereo, 2002).

Cuadro 4. Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción

Intracelular	Membrana	Extracelular
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferrinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactoferrinas
DT-deafarasa		Albúminas
Glutation reducido		Haptoglobinas
Proteínas ligadoras de metales		Vitamina C
Sistemas proteolíticos		Ácido úrico
Vitamina C		Vitamina E

Venereo, G.J (2002) Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes.

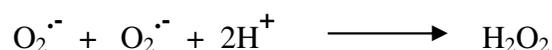
2.7.1. *Antioxidantes presente en espermatozoides y plasma seminal*

Los espermatozoides son células que pierden la mayoría de su contenido citoplasmático en forma de gotas citoplasmáticas durante su maduración en el epidídimo, permitiendo un descenso considerable en la cantidad de antioxidantes endógenos y por lo tanto volviéndose dependiente de antioxidantes extracelulares que le permitan superar el estrés oxidativo (Wai-sum *et al.*, 2006). Se ha demostrado que las glándulas sexuales

accesorias del macho son la principal fuente de antioxidantes en el eyaculado, proporcionando enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa y glutathion peroxidasa, así como vitamina C, vitamina E, hipotaurina, ácido úrico y albúmina (Wai-sum *et al.*, 2006, Ball, 2008).

Superóxido dismutasa (SOD)

La primera defensa contra el daño causado por el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es la superóxido dismutasa (SOD) (Fridovich, 1998). La SOD reacciona específicamente con el anión superóxido mediante la siguiente reacción (Fridovich, 1997):



La SOD presente en espermatozoides o plasma seminal de diferentes especies corresponde a la formada por enzimas metaloides Cu-SOD y Zn-SOD, presentes en células eucariotas. Este grupo de SOD contiene cobre y zinc en su sitio activo y se encuentra en el citosol y en el espacio intermembranoso mitocondrial (Venereo, 2002). En espermatozoides no se encuentra la forma manganeso (Mn-SOD). La presencia de la CuZn-SOD en el epitelio germinal de los túbulos seminíferos, espermatozoides y plasma seminal ha sido demostrada en diferentes especies como humanos, ovinos, bovinos, porcinos, equinos, ratones y conejos (Ochsendort *et al.*, 1997).

Catalasa

La catalasa es la enzima que dismuta el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de acuerdo a la siguiente reacción (Fridovich, 1998):



La catalasa de mamíferos también puede actuar como peroxidasa a través de pequeñas moléculas como metanol, etanol y nitritos (Fridovich, 1998). Las catalasas

forman parte del sistema antioxidante Catalasa/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 (Venereo, 2002). En espermatozoides de ovino, conejo y humano se ha demostrado la presencia de catalasa (Ochsendorf *et al.*, 1997). También existe presencia de catalasa en el plasma seminal de equino (Ball *et al.*, 2000). A pesar que en espermatozoides bovinos no se ha observado la presencia de catalasa (Bilodeau *et al.*, 2000), la adición de pequeñas cantidades de esta enzima junto a piruvato mejora la calidad seminal (Bilodeau *et al.*, 2002). Existiendo evidencias que el H_2O_2 causa daño peroxidativo en espermatozoides (Aitken, 1994), la catalasa debe tener un rol antioxidante en estas células.

Glutation y glutacion peroxidasa

La glutacion peroxidasa (GPx) es una enzima selenio dependiente que reduce al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroperóxidos lipídicos (ROOH) a través de la oxidación de dos moléculas de glutacion reducido (GSH) (Álvarez y Storey, 1989). La glutacion peroxidasa entonces requiere de GSH para reducir los peróxidos. La reducción del glutacion oxidado (GSSG) a GSH se realiza por efecto de la glutacion reductasa (Grx). Esta enzima (Grx) necesita la presencia de NADPH para reducir al GSSG. El NADPH se forma por la acción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en el NADP⁺ (Ochsendorf, 1997; Storey *et al.*, 1998). El ciclo del glutacion se presenta en la figura 3.

De este modo, el glutacion desempeña un rol significativo en la defensa antioxidante de las líneas germinales de los túbulos seminíferos, epidídimo y probablemente en los espermatozoides (Irvine, 1996). La actividad de la glutacion peroxidasa ha sido demostrada en semen de ovinos, caninos, caprinos y humanos (Ochsendorf *et al.*, 1997). Por otro lado, niveles reducidos de glutacion intracelular han sido relacionados con infertilidad en humanos (Ochsendorf *et al.*, 1998). En otras especies como bovinos, existen niveles reducidos de glutacion peroxidasa (Bilodeau *et al.*, 2000).

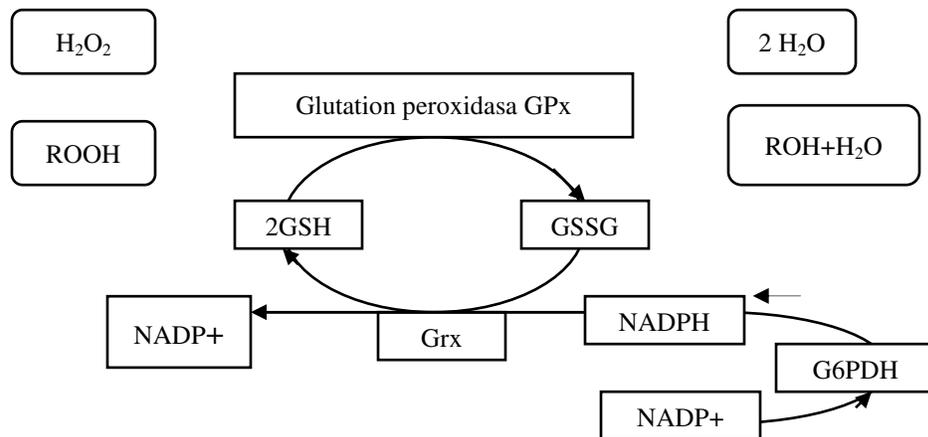


Figura 3. Ciclo redox del glutatión

Antioxidantes no enzimáticos

La vitamina E ó tocoferol es el principal antioxidante liposoluble. El tocoferol reacciona directamente con ROS en las membranas plasmáticas e inhiben la lipoperoxidación capturando los radicales lipoperoxilo (Ochsendorf *et al.*, 1997). La vitamina C ó ácido ascórbico reacciona directamente con el radical peroxilo y el anión superóxido. Lewis *et al.* (1997) mencionan que el ácido ascórbico es el antioxidante presente en mayores cantidades en el plasma seminal humano. El ácido ascórbico también actúa en forma sinérgica con el tocoferol para la reducción de los radicales lipoperoxilo, al reaccionar con radicales tocoperoxilos y regenerar tocoferol activo (Ochsendorf *et al.*, 1997). Otros antioxidantes presentes en el plasma seminal son ácido úrico, selenio, transferrinas, ceruloplasminas, zinc, taurina e hipotaurina (Ochsendorf *et al.*, 1997).

2.7.2. Análogos de superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que tiene la capacidad de dismutar el anión superóxido (Fridovich, 1997). El O_2^- interacciona con los ácidos grasos insaturados de la membrana espermática, produciendo peroxidación y finalizando en una destrucción

generalizada de la membrana (Álvarez y Storey, 1989). En consecuencia, la SOD estaría protegiendo a las células de la toxicidad del ión O_2^- (McCord y Fridovich, 1969). Sin embargo, la SOD tiene un corto tiempo de vida y debido a su alto peso molecular no es capaz de penetrar las membranas celulares fácilmente. Por lo tanto, se están estudiando compuestos con actividad similar a la SOD que tengan bajo peso molecular y sean biológicamente estables (Luo, 2001, Wilcox, 2010).

En ese sentido, Mitchell *et al.* (1990) identificaron un conjunto de radicales nítróxido estables que poseen actividad similar a SOD, con la ventaja de tener bajo peso molecular, mayor permeabilidad de membrana y ser independiente de metales. Estos análogos de SOD, Tempo (2,2,6,6 tetramethyl-1-piperidinyloxy) y Tempol (4-hidroxy 2,2,6,6 tetramethyl-1-piperidinyloxy), protegen a las células del daño inducido por hipoxantina/xantina oxidasa y peróxido de hidrógeno, a pesar que no exhiben actividad catalasa (Mitchell *et al.*, 1990). Además, los nítróxidos protegen varios sistemas biológicos del estrés oxidativo, incluyendo isquemia, hiperoxia, trauma mecánico, xenobióticos tóxicos, radiación ionizante, irritantes gástricos u oxidantes fuertes (Offer *et al.*, 1998). Es así, que en los últimos años se ha utilizado Tempol en casos de diabetes mellitus porque mejora la eficiencia de la insulina, reduce la pérdida de peso y previene falla cardiaca (Wilcox, 2010). Así también protege varios órganos como el corazón y cerebro de daños isquémicos; previene insuficiencia renal por glomerulopatías, protege a las células de distintos tipos de radiación, entre otros (Wilcox, 2010). Incluso, en forma general, cuando es suministrado desde el nacimiento, puede prolongar la esperanza de vida en ratones (Wilcox, 2010).

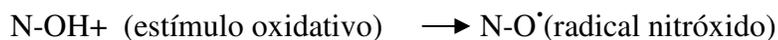
Se ha demostrado que la adición de Tempol 1 mM al medio de cultivo no altera la embriogénesis y más bien previene la formación de malformaciones embrionarias en medios hiperglicémicos (Ryu *et al.*, 2007). Incluso, la adición de Tempol previene en ratones gestantes efectos como proteinuria, hipertensión, producción de ROS en placenta y alteraciones de crecimiento, los cuales son utilizados como modelo de estudio de la preclampsia humana (Hoffmann *et al.*, 2008).

Los nítróxidos inhiben el daño oxidativo al dismutar tanto el O_2^- extracelular como intracelular y convirtiéndolo en H_2O_2 (Wilcox, 2010). Adicionalmente, Offer *et al.* (1998) indican que el efecto protector de los nítróxidos no aumenta con el aumento de su

concentración (0,5 mM); la combinación de SOD y nitróxidos no provee más protección que la demostrada por SOD o nitróxidos en forma separada; se observa efecto aditivo de nitróxidos con catalasa; y que los nitróxidos no son consumidos durante la reacción, sino reciclados. Por lo tanto, el Tempo y Tempol actúan como antioxidantes principalmente al reaccionar con el anión superóxido, mientras que no confieren protección cuando el daño oxidativo es inducido directamente por peróxido de hidrógeno (Offer *et al.*, 1998).

Además, el mecanismo antioxidante de los nitróxidos incluye otras vías como la destoxificación de especies ferryl-heme, facilitando la remoción del peróxido de hidrógeno, capturando y reaccionando con radicales alcoholil, peroxil y radicales lipídicos, oxidando semiquinonas y terminando reacciones en cadena de radicales (Offer *et al.*, 1998; Luo, 2001). Asimismo, pueden actuar como antioxidantes al oxidar Fe y Cu, previniendo de esta forma la producción de radicales hidroxilo a partir de la reacción de Fenton (Luo, 2001).

En resumen, el Tempo y Tempol pueden ser oxidados por ROS como el anión superóxido o radicales hidroxilos, resultando en la forma original de los radicales nitróxidos. Estos a su vez, pueden ser reducidos por diversas sustancias presentes en los sistemas biológicos (Kishioka *et al.*, 2002) de la siguiente manera:



2.7.3. Efecto de antioxidantes en la función espermática

La deficiencia de antioxidantes en el plasma seminal está relacionada a infertilidad. En humanos, el ácido ascórbico ó ascorbato es el antioxidante encontrado en mayores cantidades en el plasma seminal. En ese sentido, el plasma seminal de pacientes infértiles astenozoospermicos tiene menores niveles de ascorbato (Lewis *et al.*, 1997) y de antioxidantes totales (Lewis *et al.*, 1995) que el plasma seminal de hombres fértiles. Del mismo modo, los niveles intracelulares de glutatión en espermatozoides están disminuidos

en ciertas poblaciones de individuos infértiles. Asimismo, existe asociación entre la concentración de glutatión en el plasma seminal humano y la capacidad para penetrar moco cervical bovino (Ochsendorf *et al.*, 1998). Aparentemente, el glutatión y la catalasa protegerían a los espermatozoides del efecto de ROS en la fragmentación de ADN (Baumber *et al.*, 2003). Por otro lado, los bajos niveles de SOD están relacionados con aumento de malondialdehído en pacientes infértiles (Sanocka *et al.*, 1996). Consecuentemente, los antioxidantes presentes en el plasma seminal desempeñan un papel importante en la función espermática.

Efecto de antioxidantes en la motilidad espermática

La adición de antioxidantes mejora la función espermática en espermatozoides de varias especies. En ese sentido, la vitamina E ó tocoferol puede revertir la peroxidación lipídica en espermatozoides humanos (Aitken *et al.*, 1989) o prevenir el daño peroxidativo causado por espermatozoides durante la centrifugación (Aitken y Clarkson, 1988). Igualmente, la adición de taurina, hipotaurina y albúmina sérica bovina inhiben la pérdida de motilidad y reducen la peroxidación lipídica en espermatozoides epididimarios de conejo (Álvarez y Storey, 1983). También, la adición de catalasa mejora la motilidad en espermatozoides bovinos (Bilodeau *et al.*, 2002).

La pérdida de motilidad producida por leucocitos activados en espermatozoides humanos también puede ser reducida por la adición en conjunto de glutatión, n-acetilcisteína, hipotaurina y catalasa (Baker *et al.*, 1996). Del mismo modo, la adición de glutatión oxidado, glutatión reducido, dithiothreitol y superóxido dismutasa prolongan la motilidad de espermatozoides bovinos descongelados e incubados a 38°C (Lindemann *et al.*, 1988; Bilodeau *et al.*, 2001; Chatterjee *et al.*, 2001). Debido a que la peroxidación de los lípidos de la membrana se correlaciona con disminución de la motilidad espermática (Jones *et al.*, 1979; Storey, 1997), es probable que la acción de estas moléculas antioxidantes esté relacionada con una disminución en la peroxidación lipídica de los espermatozoides.

Sin embargo, existen algunos reportes que indican un efecto negativo o ausencia de efecto de ciertos antioxidantes en la motilidad espermática. En ese sentido, el alfa tocoferol inhibe la motilidad espermática en espermatozoides ovinos, mientras no se observa ningún efecto al adicionar catalasa (Upreti *et al.*, 1997). De igual manera, la adición de butilhidroxitolueno (BHT) tampoco tiene efecto en la motilidad de espermatozoides humanos (Aitken y Clarkson, 1988).

Efecto de antioxidantes en la capacitación espermática y reacción acrosomal

La adición de ciertos antioxidantes puede prevenir la capacitación espermática y reacción acrosomal. En ese sentido, la fosforilación de proteínas en residuo tirosina, la cual está relacionada a los procesos de capacitación espermática y reacción acrosomal (Naz, 1996), puede ser inhibida por la adición de catalasa (Aitken *et al.*, 1995). Adicionalmente, la adición de catalasa inhibe la reacción acrosomal inducida por peróxido de hidrógeno en espermatozoides de hámsters (Bize *et al.*, 1991). Sin embargo, la adición de catalasa no inhibe la capacitación en espermatozoides bovinos descongelados (O'Flaherty *et al.*, 2003).

Existen evidencias que la superóxido dismutasa inhibe la capacitación en espermatozoides humanos (De Lamirande y Gagnon, 1993) y en espermatozoides descongelados de bovino (O'Flaherty *et al.*, 1997; 1999; 2003). Además, la superóxido dismutasa inhibe la inducción de hiperactivación en espermatozoides humanos (De Lamirande y Gagnon, 1993). Asimismo, la superóxido dismutasa y catalasa reducen o previenen totalmente la reacción acrosomal de espermatozoides humanos capacitados (De Lamirande *et al.*, 1998) ó de espermatozoides descongelados de muflones (*Ovis musimon*) (Berlinguer *et al.*, 2003).

La adición de alfa tocoferol al medio para congelar semen no tiene efecto en la capacitación de espermatozoides bovinos descongelados. No obstante, al adicionar alfa tocoferol y/o vitamina C al medio capacitante si se observa el bloqueo la capacitación y disminución de la peroxidación lipídica (O'Flaherty *et al.*, 1997).

2.7.4. Criopreservación de semen con antioxidantes

El proceso de criopreservación de semen está relacionado con un aumento de ROS (Wang *et al.*, 1997; Saleh y Agarwal, 2002, Santiani, 2003) y disminución de la actividad de enzimas antioxidantes presentes en el plasma seminal (Álvarez y Storey, 1992; Lasso *et al.*, 1994; Bilodeau *et al.*, 2001). En ese sentido, se han realizado algunos estudios en ovinos (Watson y Anderson, 1983; Askari *et al.*, 1994; Ollero *et al.*, 1997; Sánchez-Partida *et al.*, 1997, Santiani, 2003) y bovinos (Foote *et al.*, 2002) para determinar si la adición de antioxidantes al semen previo al proceso de congelamiento reduce el daño peroxidativo causado por ROS.

En ovinos, la adición de 2-4 mM de hidroxitolueno butilado (Watson y Anderson, 1983), alfa tocoferol (Askari *et al.*, 1994; Ollero *et al.*, 1997), lactoalbúmina, seroalbúmina (Ollero *et al.*, 1997) y 25–50 mM de taurina (Sánchez-Partida *et al.*, 1997) mejoran significativamente la motilidad, vitalidad e integridad de membrana luego del proceso de congelamiento-descongelamiento. No obstante, Sánchez-Partida *et al.* (1997) refieren que la adición de taurina no produce ningún efecto en la fertilidad. Otros antioxidantes como ácido ascórbico (Askari *et al.*, 1994), hipotaurina ó carnosina (Sánchez-Partida *et al.*, 1997) no mejoran la función espermática luego del proceso de congelamiento-descongelamiento. Por el contrario, la adición de carnosina y ácido ascórbico en concentraciones mayores a 50 mM reducen significativamente la motilidad (Sánchez-Partida *et al.*, 1997).

Criopreservación y Refrigeración de semen con Tempo y Tempol

Los radicales nitróxidos, Tempo y Tempol, tienen actividad similar a la superóxido dismutasa (SOD) (Mitchell *et al.*, 1990) y en comparación con la SOD, el Tempo y Tempol son de bajo peso molecular, altamente solubles y penetran la membrana celular fácilmente (Luo, 2001). En consecuencia, la adición de estos antioxidantes al medio de dilución debería mejorar la calidad de semen luego del proceso de congelamiento-descongelamiento. Sin embargo, el efecto del Tempo y Tempol en la calidad seminal no está bien estudiado. Uno de los primeros trabajos sobre criopreservación de semen con

estos antioxidantes fue realizado en bovinos, en donde se utilizaron Tempo y Tempol en concentraciones entre 0.2 y 10 mM en dilutores en base a leche descremada y en base Tris.

En bovinos, la adición de 0,2 – 2 mM de Tempo y 0,2- 6 mM de Tempol al medio Tris-yema de huevo previo al congelamiento no produce ningún efecto en la motilidad espermática luego del proceso de congelamiento-descongelamiento (Foote *et al.*, 2002). Por el contrario, cuando se utiliza leche descremada como diluyente en lugar de Tris-yema de huevo, la motilidad disminuye significativamente con concentraciones mayores a 0,2 mM de Tempo y Tempol (Foote *et al.*, 2002). Similares resultados son reportados por Coutinho da Silva *et al.* (2008), quienes han utilizado entre 0.7 a 6 mM de Tempol para congelar semen de equino o espermatozoides obtenidos del epidídimo (Johnson y Coutinho da Silva, 2008) en un dilutor en base a leche descremada.

Dichos resultados negativos o neutros del Tempo y Tempol pueden ser explicados porque de acuerdo a lo descrito por Santiani (2003), los niveles de ROS durante el proceso de criopreservación se incrementan recién al final de la curva de enfriamiento y por lo tanto su adición junto al dilutor estaría causando un efecto tóxico sobre los espermatozoides. En ese sentido, Santiani (2003) refiere que la adición de Tempo y Tempol 1 mM a los 35°C a un dilutor en base a leche descremada, causa una disminución significativa de la motilidad, en forma similar a lo descrito por Foote *et al.* (2002). Sin embargo, cuando se adicionan estos antioxidantes a los 5°C, es decir al final de la curva de enfriamiento, se consigue una motilidad superior al grupo control (Santiani, 2003). Similares resultados son reportados por Ruiz *et al.* (2007) quienes congelaron semen de ovino en un dilutor en base a Tris junto con Tempo 0.5 mM, el cual fue adicionado al final de la curva de enfriamiento. Asimismo, es posible incrementar la tasa de no retorno en celo (un indicador temprano de gestación) cuando se inseminan ovejas con semen congelado con Tempo 0.5 mM adicionado al final de la curva de enfriamiento (Santiani *et al.*, 2007).

Por otro lado existen otros estudios indicando un efecto positivo en la motilidad y viabilidad espermática durante el proceso de refrigeración (5°C) en espermatozoides de ovino (Mara *et al.*, 2002, 2005), bovino (Lindemann y Kanous, 1991, citado por Foote *et al.*, 2002), caprino (Mara *et al.*, 2007) y pavo (Donoghue y Donoghue, 1997). También se han descrito un incremento en la tasa de clivaje en fecundación *in vitro* utilizando Tempol 2

mM (Mara *et al.*, 2005) y porcentajes elevados de fertilidad al inseminar cabras con semen refrigerado con Tempol 1 mM (Mara *et al.*, 2007). Es interesante destacar que para la refrigeración, el semen una vez mezclado con el dilutor, pasa directamente a 5°C, no requiriendo una curva de enfriamiento lenta que podría alterar la función espermática por acción de Tempo ó Tempol.

En base a los anteriormente expuesto, es posible que en la mayoría de especies, los ROS produzcan efectos indeseables sobre la función espermática y que este efecto nocivo se vea exacerbado durante los procesos de criopreservación. Es por ello que sería interesante adicionar Tempo y Tempol al diluyente previo al congelamiento de espermatozoides de alpaca y estudiar su efecto en la producción de ROS y la funcionalidad espermática.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

El presente estudio consta de 3 experimentos que se desarrollaron conjuntamente en la Estación Experimental IVITA-Marangani (Canchis, Cusco, Perú); en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima, Perú); y en el Centro de Biotecnología de la Reproducción (CEBIOR), Facultad de Medicina Humana, Universidad de La Frontera (Temuco, Chile). Las actividades realizadas en cada una de las instituciones se presentan en el cuadro 5

Cuadro 5. Experimentos y actividades experimentales realizadas de acuerdo a la institución de procedencia de las muestras

Experimentos	Procedencia de las muestras	Procesamiento y análisis de las muestras	Actividades Realizadas
Experimento 1	Camal Huancavelica	FMV-UNMSM	Vitrificación de espermatozoides
	IVITA-Marangani	FMV-UNMSM	Vitrificación de espermatozoides

Experimento 2	Camal Huancavelica	FMV-UNMSM	Evaluación de semen Determinación del efecto de ROS en espermatozoides.
		IVITA-Marangani	Criopreservación de semen
Experimento 3	IVITA-Marangani	FMV-UNMSM	Evaluación de semen
		CEBIOR-UFRO	Evaluación de ADN espermático mediante citometría de flujo

3.2 Animales y manejo de muestras biológicas

En total se han utilizado 16 alpacas machos para colección de semen y 21 testículos/epidídimos procedentes de camal para la recuperación de espermatozoides obtenidos a partir de la cola del epidídimo.

Los testículos/epidídimos de alpaca procedieron del Camal Municipal de Huancavelica (n=12 obtenidos el año 2009 y n=9 en el 2012). Las muestras del 2009 fueron utilizadas en los experimentos 1 (n=6) y 2 (n=6), durante los meses de enero y febrero. En el 2012 se repitió el experimento 1, utilizándose las 9 muestras de testículos/epidídimos (n=9). En todos los casos, inmediatamente después del beneficio de las alpacas, se retiró la túnica vaginal visceral de los testículos/epidídimos. Estos fueron lavados con suero fisiológico y colocados en frascos de plástico individuales con suero fisiológico a 5°C. Los frascos de plástico fueron transportados en una caja de tecnopor provisto de varios paquetes de gel refrigerante para mantener la temperatura a 5°C y enviados inmediatamente a la ciudad de Lima, para su posterior evaluación. Los testículos provenientes del Camal Municipal de Huancavelica que fueron utilizados en los experimentos 1 y 2 tuvieron una longitud mínima de 3.5 cm.

Los 16 alpacasHuacaya pertenecientes al IVITA-Maranganí (localizado a 3550 m.s.n.m.) presentaron pesos aproximadamente de 50 Kg en promedio. Estos machos fueron utilizados para los experimentos 1 y 3. La colección de semen se realizó durante los meses de enero y febrero del 2010, es decir durante la temporada reproductiva en camélidos sudamericanos. Los machos fueron mantenidos en corrales individuales durante la noche y durante el día sueltos en potreros con pastos cultivados. Para la colección de semen, las muestras fueron obtenidas utilizando el método de vagina artificial con hembras receptoras. Las muestras obtenidas fueron transportadas inmediatamente al laboratorio para su evaluación. Se utilizó una jeringa de 1mL con una aguja de 21 x 1 para disminuir la viscosidad seminal mediante la aspiración continua a través de la jeringa. Solamente las muestras que presentaron un mínimo de 30% de motilidad y 25×10^6 espermatozoides/mL (Banda et al., 2010) fueron utilizadas para los experimentos sobre vitrificación (Experimento 1), incubación con PMN activados (Experimento 2) y criopreservación (Experimento 3) de espermatozoides. Los parámetros seminales evaluados en las muestras fueron: color, volumen, motilidad, concentración espermática, integridad funcional de membrana y vitalidad e integridad acrosomal. Adicionalmente en el experimento 3 se evaluó la integridad del ADN espermático.

3.3 Fase Experimental

3.3.1. Experimento 1. Desarrollo de un protocolo de vitrificación de espermatozoides de alpaca

La finalidad del experimento 1 fue evaluar el efecto de 3 concentraciones y 3 tipos de azúcares empleados en el proceso devitrificación para espermatozoides de alpaca. En una primera etapa de este experimento se utilizaron 6 muestras obtenidas de la cola del epidídimo (realizado el 2009); en la segunda etapa se utilizaron 5 muestras de semen obtenidas con vagina artificial (realizado el 2010) y en la tercera etapa se utilizaron 9 muestras obtenidas de la cola del epidídimo (realizado el 2012). Las muestras de espermatozoides de la primera y segunda etapa fueron diluidas en un medio Tris base (27.1

g Tris, 14 g ácido cítrico, 10 g fructosa y agua bidestilada c.s.p. 1 litro) con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% y ajustados a una concentración de 10 millones de espermatozoides/mL. Para la tercera etapa, la vitrificación se realizó utilizando un medio HTF (5.93 g cloruro de sodio, 0.35 g cloruro de potasio, 0.30 g cloruro de calcio dihidratado, 0.05 g sulfato de magnesio heptahidratado, 0.05 g fosfato de potasio, 2.1s g bicarbonato de sodio, 0.005 g de rojo fenol, 0.50 g de glucosa, 0.036 g de piruvato de sodio, 3.99 mL de lactato de sodio, 5.206 g de Hepes, 0.06 g de penicilina y 0.05 g de sulfato de estreptomicina y agua bidestilada c.s.p. 1 litro) con BSA al 1%..

Cada muestra obtenida (eyaculados ó espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo) en cada una de las 3 etapas fue dividida en 9 partes iguales, las cuales fueron distribuidas entre los tratamientos. Los tratamientos siguieron un arreglo factorial de 3 x 3, donde el factor A fueron las concentraciones de los azúcares (0.25, 0.5 y 1 M), mientras que el factor B fueron los tipos de azúcares (fructosa, sacarosa y trehalosa). Los grupos formados fueron los siguientes:

- Fructosa: Vitrificación en medio con fructosa 0.25M.
- Fructosa: Vitrificación en medio con fructosa 0.50 M.
- Fructosa: Vitrificación en medio con fructosa 1.00 M.
- Sacarosa: Vitrificación en medio con sacarosa 0.25 M.
- Sacarosa: Vitrificación en medio con sacarosa 0.50 M.
- Sacarosa: Vitrificación en medio con sacarosa 1.00 M.
- Trehalosa: Vitrificación en medio con trehalosa 0.25M.
- Trehalosa: Vitrificación en medio con trehalosa 0.50 M.
- Trehalosa: Vitrificación en medio con trehalosa 1.00 M.

La desvitrificación se realizó colocando las muestras en 2mL de Tris base con albúmina sérica bovina al 1%. Se evaluó la motilidad y vitalidad/integridad acrosomal.

3.3.2.Experimento 2. Determinación del efecto de la incubación de espermatozoides de alpaca con PMN activados con PMA en la funcionalidad espermática.

El experimento 2 fue realizado con la finalidad de estudiar el efecto de incubación de espermatozoides de alpaca con PMN activados con PMA en la funcionalidad espermática. En este experimento se utilizaron 6 muestras obtenidas de testículos/epidídimos provenientes del Camal de Huancavelica el año 2009. Cada una de las muestras fue dividida en 2 partes para ser sometidas a los siguientes tratamientos:

- Grupo Control: Incubados en medio Tris base(27.1 g Tris, 14 g ácido cítrico, 10 g fructosa, csp. 1 litro) a 37°C por 3 horas.
- Grupo PMN activados: Incubados en el mismo medio Tris base a 37°C por 3 horas junto con polimorfos nucleares activados con 100 nM de PMA (*phorbol myristate acetate*) para inducir la formación de ROS (de acuerdo a lo descrito por Villegas *et al.*, 2003).

La evaluación del daño celular en la motilidad espermática fue evaluada mediante los porcentajes de motilidad, integridad funcional de membrana y vitalidad/integridad acrosomal.

3.3.3. Experimento 3. Evaluación del efecto de 2 análogos de superóxido dismutasa durante el proceso de criopreservación de espermatozoides de alpaca.

El objetivo del presente experimento fue evaluar el efecto de la adición de antioxidantes durante el proceso de criopreservación de semen de alpaca. En este estudio se trabajaron 30 muestras de semen de alpacas(ver Anexo 2 y Anexo 3), provenientes de 9 machos, durante el verano del 2010. Cada muestra seminal fue dividida en 3 partes para formar los siguientes grupos:

- Grupo Control: Criopreservación sin antioxidantes
- Grupo Tempo: Criopreservación con análogo de superóxido dismutasa Tempo (2,2,6,6 tetramethyl-1-piperidiniloxoyl, Aldrich 214000) en una concentración final 1mM, adicionado al final de la curva de enfriamiento (10°C).

- Grupo Tempol: Criopreservación con análogo de superóxido dismutasa Tempol (4-hidroxi 2,2,6,6 tetramethyl-1-piperidiniloxoyl, Sigma H-8258) en una concentración final 1mM, adicionado al final de la curva de enfriamiento (10°C).

Luego del descongelamiento se evaluó la motilidad, integridad funcional de membrana plasmática, vitalidad/integridad acrosomal e integridad del ADN espermático. En este experimento también estaba previsto evaluar el efecto de la adición de antioxidantes análogos de superóxido dismutasa durante el proceso de vitrificación, sin embargo se descartó dicha idea pues los resultados del experimento sobre vitrificación (Experimento 1) no lograron proporcionar suficientes espermatozoides viables mediante esta técnica.

3.4 Procedimiento metodológico

3.4.1. Recuperación de espermatozoides de la cola del epidídimo

Los testículos provenientes de animales beneficiados fueron procesados en el Laboratorio de Reproducción Animal (FMV-UNMSM) para desarrollar los experimentos 1 y 2. Inicialmente, los testículos fueron lavados con PBS a 37°C, y luego de una cuidadosa disección con instrumental quirúrgico básico (pinzas planas y tijeras), se separaron los epidídimos de sus respectivos testículos. Cada uno de los epidídimos así obtenidos, se lavaron 4 veces con PBS a 37°C y seguidamente, se separó la cola epididimaria mediante un corte con tijera. Las colas del epidídimo se colocaron en placas petri estériles y se dividieron en pequeñas secciones las cuales se suspendieron en 1 mL de PBS a 37°C por epidídimo y se prensaron suavemente con pinzas, hasta lograr la expulsión de los espermatozoides de los conductos epididimarios. La obtención de los espermatozoides se realizó recuperando el total del volumen de medio utilizado (1 mL) de PBS en un tubo eppendorf, de 1.5 mL, de acuerdo a lo descrito por Morton *et al.*2007.

3.4.2. Colección de semen

La colección de semen se realizó utilizando el método de vagina artificial con hembras receptoras descrito por Dávalos y Olazábal (2002). Este procedimiento fue utilizado para realizar los experimentos 1 y 3. El día de la colección seminal, los machos fueron enfrentados con un grupo de alpacas hembras hasta que cada macho lograba hacer que una hembra adopte la posición de cópula. Cuando el macho se disponía a penetrar a la hembra, un operario se acercaba cuidadosamente y desviaba el pene del macho hacia una vagina artificial de ovino, permaneciendo en esa posición hasta el momento el cual el macho se ponía de pie y se retiraba. Se utilizó una vagina artificial de ovino, con una funda lineal de jebe y un tubo Falcon de 15 mL. La vagina artificial contenía aire a presión y se adicionaba agua a 55-60°C, para llegar a una temperatura interna de 40-42°C. La vagina artificial estaba cubierta por una toalla y una frazadilla eléctrica, con la finalidad de mantener la temperatura durante la cópula.

3.4.3. Preparación del dilutor para criopreservación

Se utilizó un dilutor en base a leche descremada que constó de 2 fracciones (A y B), en donde la principal diferencia consistió en la adición del agente crioprotector (Etilenglicol) a la fracción B del dilutor. Este dilutor ha sido descrito para congelación de espermatozoides de alpaca por Santiani *et al.* (2005). Para la primera fracción (fracción A) se mezclaron 95 mL de leche descremada, 5 mL de yema de huevo y 4.85 g de fructosa, en una probeta de 100 mL. La fracción B del dilutor se preparó en base a la solución anterior adicionándole etilenglicol para obtener una concentración de 0.2 M.

3.4.4. Criopreservación de espermatozoides

Cada una de las muestras seminales (n=30) fue alicuotada en 3 partes de 250 μ L y diluida en una proporción 1:1 con la fracción A del dilutor en base a leche descremada (250 μ L), haciendo un total de 500 μ L. Estas muestras diluidas fueron enfriadas lentamente desde los 35°C hasta los 5°C, en un tiempo aproximado de 90 minutos, descendiendo en promedio 1°C cada 3 minutos. Al llegar a 5°C, se adicionó igual cantidad de la fracción B (500 μ L) a cada uno de los grupos. Se dejó estabilizar por 30 minutos e inmediatamente se

envasaron en pajillas de plástico transparentes de 0.25mL. Finalmente, las pajillas se congelaron exponiéndolas a vapores de nitrógeno líquido por 15 minutos. Luego del congelamiento, las pajillas fueron almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido, cuya temperatura interna es de alrededor a -196 °C. El descongelamiento de las pajillas se realizó en un periodo aproximado de 1 año (Experimento 3). Para el descongelamiento, las pajillas fueron retiradas del tanque con nitrógeno líquido e inmediatamente colocadas en baño maría a 42 °C durante 45 segundos. En el cuadro 6 se puede observar la forma de diluir las muestras para criopreservación.

Cuadro6. Diluciones realizadas para criopreservación de espermatozoides de alpaca.

Grupo	Muestra	Dilutor (Fracción A)		Dilutor (Fracción B)		Muestra diluida para congelar
Control	250 µL	+	250 µL	+	500 µL	= 1 mL
Tempo	250 µL	+	250 µL	+	500 µL	= 1 mL
Tempol	250 µL	+	250 µL	+	500 µL	= 1 mL

3.4.6. *Vitrificación de espermatozoides*

El proceso de vitrificación se realizó en el experimento 1 con muestras obtenidas de la cola del epidídimo (n=6, 2009 y n=9, 2012) y muestras de semen (n=5). Cada muestra de espermatozoides fue ajustada a una concentración de 10×10^6 espermatozoides/mL y diluida en un medio Tris base con albúmina sérica bovina al 1%, utilizando distintos tipos y concentraciones de azúcares (Sacarosa, trehalosa y fructosa, cada uno en concentraciones 0.25, 0.5 y 1 M). Las muestras fueron mantenidas con su dilutor por 5 minutos a 37°C antes de iniciar el protocolo de vitrificación. La vitrificación se realizó colocando gotas de 30 µL directamente a una caja con nitrógeno líquido. Las gotas formaron esferas sólidas al congelarse y se hundieron en el nitrógeno líquido. Posteriormente, las gotas vitrificadas fueron recuperadas, colocadas en tubos eppendorf de 1.5 mL y almacenadas en nitrógeno

líquido (- 196 °C) hasta su evaluación. La desvitrificación se realizó retirando las esferas del nitrógeno y colocándolas en 1 mL de medio (Tris ó HTF) con BSA al 1% a 37°C por 10 minutos.

3.5 Evaluación de características seminales

3.5.1. Espermatograma convencional

Los parámetros evaluados dentro del espermatograma convencional fueron: volumen, color, motilidad y concentración espermática. Para poder realizar dichas evaluaciones, las muestras procedentes de la cola del epidídimo (Experimentos 1 y 2) fueron suspendidas en 1 mL de PBS. En el caso de las muestras obtenidas mediante colección de semen (Experimentos 1 y 3) se utilizó una jeringa de 1mL con una aguja de 21 x 1 para disminuir la viscosidad seminal mediante la aspiración continua a través de la jeringa. Los registros de volumen fueron realizados mediante observación directa de las muestras contenidas en tubos eppendorf de 1.5 mL (Experimentos 1 y 2) ó tubos Falcon de 15 mL (Experimento 3). Para evaluar la motilidad espermática se colocó 25 µL de cada muestra en una lámina portaobjetos temperada (37°C) y se observó en microscopio a 400 X. Se determinó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva sobre el total de espermatozoides en cada campo, evaluando un total de 10 campos. Los resultados se expresaron como porcentaje de motilidad progresiva.

La concentración espermática se evaluó utilizando una dilución 1:20, tomando 10 µL de la muestra de semen y depositándola en un tubo eppendorf de 1.5 mL, previamente cargado con 190 µL de agua. Posteriormente, la muestra diluida fue colocada por duplicado en una cámara de Neubauer, se dejó sedimentar 5 minutos y se procedió a contar los espermatozoides dentro de los campos definidos en la cámara (5 cuadrantes), mediante el uso de un microscopio a 400 X. El número total de espermatozoides contados dentro de los 5 cuadrantes fue multiplicado por el factor correspondiente (10×10^6). Se cálculo el promedio de las lecturas en ambas cámaras, y la concentración final de espermatozoides fue expresada en millones/mL.

3.5.2. Evaluación de la integridad funcional de membrana

La evaluación de la integridad funcional de membrana fue realizada utilizando la prueba de estrés hipoosmótico ó HOS (Hypo Osmotic Swelling Test) descrito por Jeyendran *et al.*(1984) para espermatozoides humanos, y utilizado por Banda *et al.* (2010) en espermatozoides de alpaca. Esta técnica consiste en incubar los espermatozoides en una solución hipoosmótica para que respondan a dicho estrés con el hinchamiento de la membrana plasmática en la parte distal de la cola. La solución hipoosmótica fue preparada con 0.735 g de citrato de sodio y 1.351 g de fructosa diluidos en 100 mL de agua bidestilada, alcanzando una osmolaridad aproximada de 100 mOsm. .

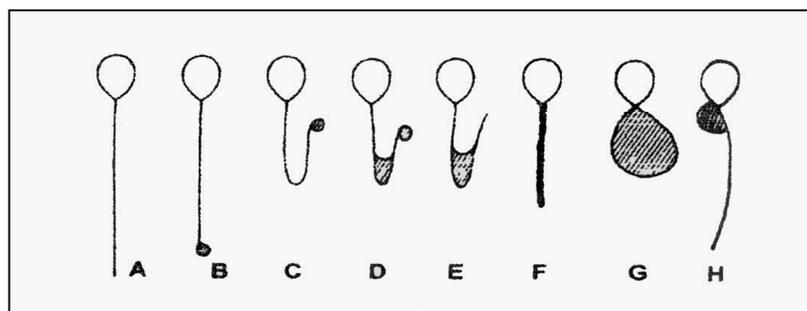


Figura 4. Diferentes grados de reacción en espermatozoides expuestos al test hipoosmótico. (A: Espermatozoide con membrana alterada/dañada. B, C, D, E, F, G y H: Espermatozoides con integridad funcional de membrana intacta). Adaptado de Jeyendran *et al.*, 1984).

El procedimiento consistió en incubar 25 μ L de la muestra en 500 μ L de solución hipoosmótica durante 1 hora a 37°C. Luego, se colocó y extendió una gota de la suspensión en una lámina portaobjetos y se observó a 400X. Se evaluaron 200 espermatozoides por lámina, considerando espermatozoides con membrana funcional alterada (HOS-) aquellos espermatozoides que no presentaron cambios en la cola (Figura 4A); mientras que se consideraron espermatozoides con membrana funcional intacta (HOS+) a los que reaccionaron al estrés hipoosmótico mediante la hinchazón/torsión de la parte distal de la cola espermática (Figura 4, B, C, D, E, F y G). Los resultados se expresaron en porcentaje de espermatozoides con membrana funcional intacta (HOS+).

3.5.3. Evaluación de vitalidad e integridad acrosomal

La evaluación de la vitalidad espermática y en simultáneo de la integridad acrosomal fue realizada utilizando la técnica de doble tinción (DT) descrita por Didion *et al.* (1989) y modificada por Santiani *et al.* (2005) para espermatozoides de alpaca. Esta técnica consiste en la utilización de dos colorantes: Azul tripán (Sigma, T-0887) como indicador de vitalidad; y Giemsa (Merck, 1.09294.1022) que se adhiere a la matriz acrosomal. Para tal efecto se incubaron 50µL de semen con 50µL de azul tripán al 2% por 10 minutos a 37°C. Luego se realizó 3 lavados por centrifugación con PBS (37°C), centrifugando a 700 x g (1800 rpm) durante 6 minutos. El pellet resultante se resuspendió en 50µL de PBS y se extendió en una lámina portaobjeto. Posteriormente, se cubrió con solución de giemsa al 20% por 40 minutos preparada inmediatamente antes de usar. Finalmente, la lámina se enjuagó y secó. Para la lectura se observaron 200 espermatozoides a 1000 X. Se consideraron espermatozoides vivos con acrosoma intacto a los que presentaron coloración transparente en la parte posterior a la línea ecuatorial de la cabeza y coloración fucsia en la región acrosomal. Los otros patrones de espermatozoides encontrado fueron los siguientes: espermatozoides vivos sin acrosoma (región pos ecuatorial transparente y región acrosomal transparente); espermatozoides muertos con acrosoma (región pos ecuatorial azul oscuro y región acrosomal fucsia); y espermatozoides muertos sin acrosoma (región pos ecuatorial azul oscuro y región acrosomal transparente). Los resultados se expresaron en porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto.

3.5.4. Evaluación de integridad de ADN espermático

La evaluación de la integridad del ADN espermático fue realizada por la técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase – mediated dUDP Nick-End Labeling*) utilizando un kit comercial (In situ cell death detection Kit, Fluorescein Roche Mannheim, BW, Germany). El procedimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones para los espermatozoides de alpaca. La fijación de las muestras se realizó en FMV-UNMSM, Lima, en donde, el contenido de cada pajilla (250 µL) fue lavado por centrifugación (500 x g) por 5 minutos en 10 mL de medio Tris base (27.1 g

Tris, 14 g ácido cítrico, 10 g fructosa, csp. 1 litro). Los pellets resultantes luego de la centrifugación fueron resuspendidos y fijados agregando 5 mL de 4 % formaldehído diluido en PBS (24 g NaCl, 0.6 g KCl, 0.78 g KH₂PO₄, 3.3 g Na₂HPO₄, csp. 1 litro, pH 7.2), por 40 minutos a temperatura ambiental. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS por centrifugación. Luego las muestras fueron transportadas suspendidas en PBS a temperatura ambiente hasta el CEBIOR-UFRO, Temuco, donde se realizó la permeabilización, incubación con TUNEL y evaluación en citometría de flujo. Para la permeabilización, el pellet fue resuspendido en 100 µL de solución Triton X-100 (Sigma T-9284) al 0.5%, diluido en 0.1% de citrato de sodio, por 15 minutos a 5°C. La solución de permeabilización fue retirada mediante lavados por centrifugación. Para el control positivo se resuspendió un pellet de espermatozoide en 2 UI de DNasa I, incubándose 10 minutos a 37°C. Los espermatozoides en estudio se resuspendieron en 50 µL de solución de trabajo TUNEL (*Enzyme solution + Label solution*). Al control negativo no se le adicionó la solución enzimática, solo con 50µL de *Label solution*. Las muestras fueron incubadas durante 60 minutos a 37 °C, en cámara húmeda y oscura. Luego de la incubación, las muestras fueron resuspendidas 500 µL de PBS y centrifugadas a 500 x g por 6 minutos. Los pellets fueron resuspendidos en 400µL de PBS, adicionando 2 µL de ioduro de propidio (PI: solución stock 2.4mM). Las muestras fueron transportadas a 4°C en cámara oscura para su lectura por citometría de flujo. Los resultados se expresaron en porcentaje de espermatozoides con ADN no fragmentado (TUNEL -)

3.5.5. Evaluación mediante citometría de flujo

La fluorescencia fue detectada utilizando un citómetro BD FACS Canto II TM (abril 2010) SN: V96101286, (USA). Un mínimo de 10,000 espermatozoides fueron incluidos en cada análisis. Los datos fueron analizados en escala logarítmica y utilizando el software BD FACSDiva TM (version 6.0). Para definir específicamente los parámetros de la población de espermatozoides de alpaca, se realizó un análisis comparando 2 parámetros: el tamaño (*forward-Scatter-Height* FSC-H) y la complejidad celular (*side-Scatter-height* SSC-H). En la figura 5a se presenta la población de eventos que fue seleccionada (dentro de la línea

negra continua) como espermatozoides de alpaca, de acuerdo a su tamaño (FSC) y complejidad (SSC).

Para evaluar la integridad del ADN espermático, el kit de TUNEL utilizó la sonda fluorescente FITC (*Fluorescein isothiocyanate conjugated*) en su solución de trabajo. Adicionalmente se utilizó la sonda fluorescente PI (*Propidium iodide*) para comprobar la permeabilización celular. Se esperaba que las células espermáticas permeabilizadas con el ADN dañado incorporen tanto la sonda FITC como PI.

Para definir las poblaciones en función de su fluorescencia a PI (*Propidium iodide*) y FITC (*Fluorescein isothiocyanate conjugated*), se realizaron los siguientes controles: autofluorescencia (espermatozoides vivos incubados sin TUNEL/ sin PI), control TUNEL (espermatozoides vivos tratados con ADNasa I e incubados sólo con TUNEL) y control PI (espermatozoides muertos incubados sólo con PI).

Las figuras 5b, 5c y 5d representan los controles de autofluorescencia, control TUNEL y control PI, respectivamente, que fueron utilizados para definir los cuadrantes (R1, R2, R3 y R4) de las poblaciones espermáticas. Se observa que el control de autofluorescencia (Figura 5b) no muestra excitación ante la exposición a los filtros para FITC y PE (*Phico erythrin*), quedando la mayoría de eventos localizados en el cuadrante R3. En la figura 5c, el control TUNEL presenta una distribución hacia el cuadrante R4 (inferior derecho), indicando una mayor excitación con el filtro FITC y ninguna con el filtro PE. Por el contrario, el control PI (Figura 5d) presenta una mayor distribución hacia el cuadrante R1, indicando una mayor excitación con el filtro PE y muy poca con el filtro FITC. Luego de pasar los controles por el citómetro de flujo, las muestras fueron observadas en microscopio óptica y de fluorescencia (Microscopio Confocal Olympus, Fluoview FV1000, USA) para corroborar la lectura de citometría de flujo (Figura 6). En las figuras 6a y 6b se observa un espermatozoide del control PI que sólo presenta la fluorescencia roja y que bajo citometría fue clasificado en el cuadrante R1. En las figuras 6c y 6d se observa un espermatozoide del control TUNEL que sólo presenta la fluorescencia verde y que bajo citometría fue clasificado en el cuadrante R4. En las figuras 6e y 6f se observa un espermatozoide incubado con TUNEL y PI que presenta tanto la fluorescencia verde (TUNEL) como la roja (PI) y que bajo citometría fue clasificado en el cuadrante R2.

Luego de definir las poblaciones espermáticas y los cuadrantes del Dot Plot, se evaluaron las muestras de espermatozoides de alpaca criopreservadas con los distintos tratamientos. Los resultados se presentan porcentajes y en gráficos Dot Plots de dos parámetros (PI vs. TUNEL, leídos a través de los filtros PE y FITC, respectivamente) y expresados en porcentajes de espermatozoides TUNEL- (espermatozoides con ADN no fragmentado) (Figura 7).

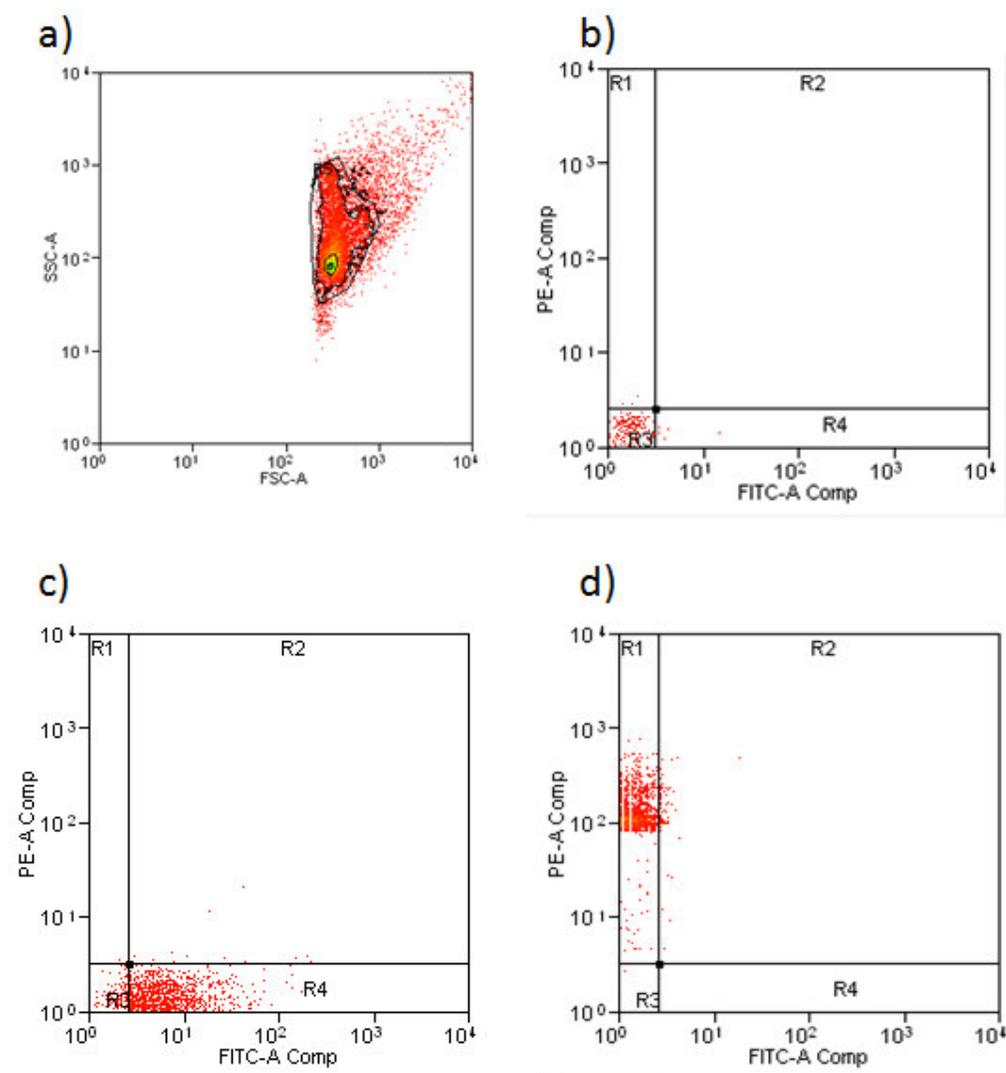


Figura 5. Selección y controles de la población de espermatozoides de alpaca para tinción de TUNEL por citometría de flujo. (5a) Muestra los eventos seleccionados para ser analizados como espermatozoides de alpaca. (5b) Control de autofluorescencia. (5c) Control TUNEL. (5d) Control PI.

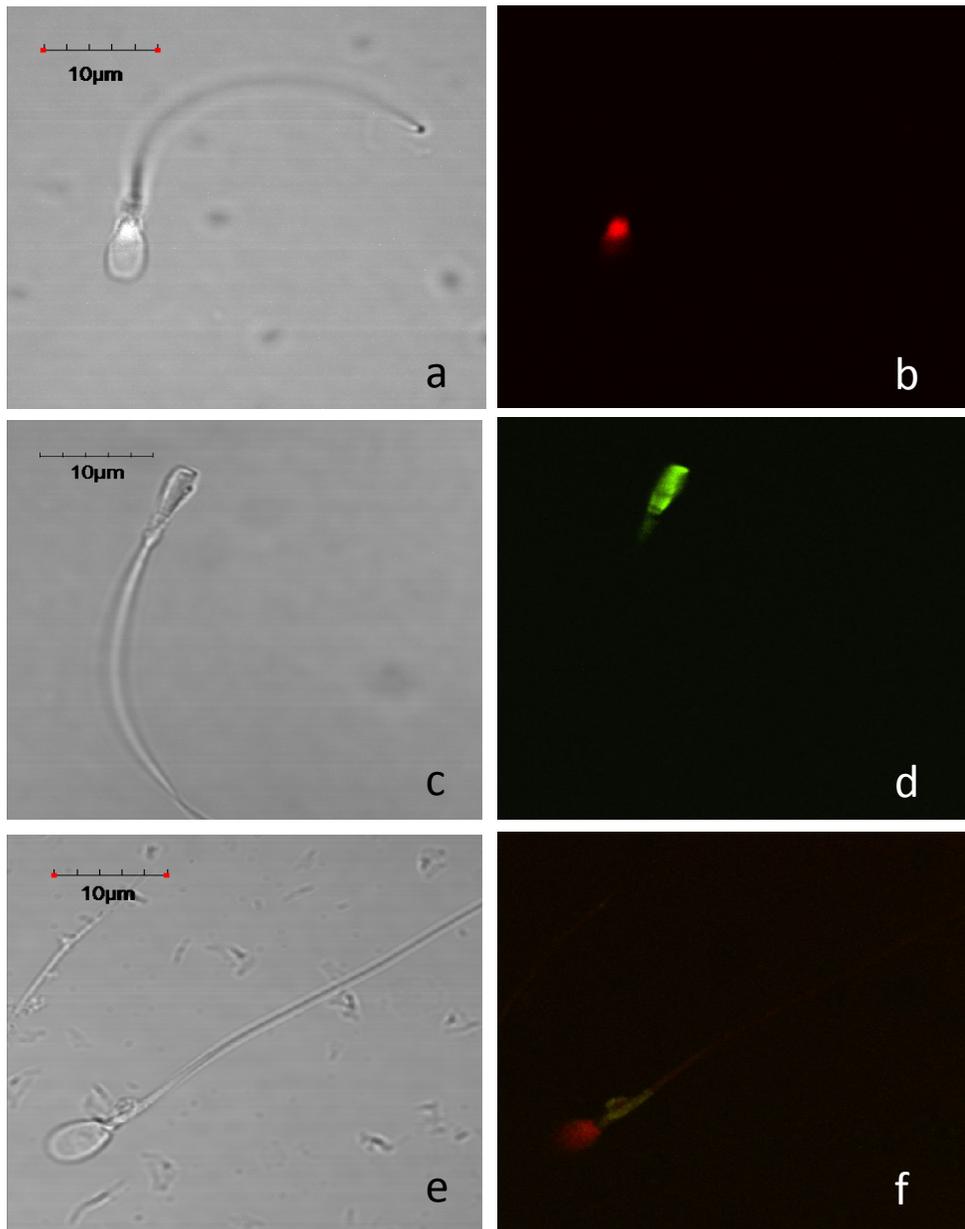


Figura 6. Espermatozoides de alpaca evaluados mediante microscopía óptica y de fluorescencia con 400X, luego del análisis de citometría de flujo. Espermatozoide de control PI bajo microscopio óptica (Fig.6a) y de fluorescencia (6b). Espermatozoide de control TUNEL bajo microscopio óptica (Fig. 6c) y de fluorescencia (6d). Espermatozoide permeabilizado y con ADN nuclear intacto visto bajo microscopía óptica (Figura 6e) y de fluorescencia (Fig. 6f).

3.6 Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas fueron realizadas utilizando el programa estadístico SPSS® versión 15.0. Los porcentajes de motilidad, porcentajes de espermatozoides con membrana funcional intacta, porcentajes de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y porcentajes de espermatozoides con ADN no fragmentado fueron transformados ($\text{ángulo} = \arcseno \sqrt{x}$) para acercar los datos a la distribución normal.

En el experimento 1, para evaluar el efecto de la concentración y el tipo de azúcar empleado en la vitrificación de semen sobre la motilidad y vitalidad/integridad acrosomal post vitrificación, un análisis multivariante de la varianza fue usado, donde, los factores inter-sujetos fueron la concentración, el tipo de azúcar y repeticiones. Para determinar el efecto significativo de los factores inter -sujetos, el estadístico de traza de Pillai fue utilizado para determinar que interacciones y factores que fueron significativos. Se realizaron ANOVAs independientes para cada variable de respuesta. En cada nivel de los tratamientos para cada prueba que resultó significativo al análisis ($p < 0.05$) se realizó una comparación por pares para determinar entre que tratamientos había diferencia estadística significativa dentro de cada prueba. Se utilizó el estadístico de Tukey para determinar entre que grupos hubo diferencia.

En el experimento 2, para evaluar el efecto del daño oxidativo sobre la motilidad, vitalidad/integridad acrosomal e integridad funcional de membrana, un análisis multivariante de la varianza fue usado, donde, los factores inter-sujetos fueron los tratamientos (Control, PMN) y las repeticiones. Para determinar el efecto significativo de los factores entre-sujetos, el estadístico de traza de Pillai fue utilizado para determinar que interacciones y factores fueron significativos. Se realizaron ANOVAs independientes para cada variable de respuesta ($p < 0.05$).

En el experimento 3, para evaluar el efecto de los antioxidantes sobre la motilidad, vitalidad/integridad acrosoma, integridad funcional de membrana e integridad del ADN espermático, un análisis multivariante de la varianza fue usado, donde, los factores inter-sujetos fueron los tratamientos (Control, Tempo, Tempol) y las repeticiones de cada macho. Dado que la asociación entre los valores iniciales del semen y los valores post congelación ha sido reportada, los valores iniciales de motilidad, vitalidad/integridad acrosoma,

integridad funcional de membrana e integridad del ADN espermático (variables continuas inter sujetos) fueron incluidos como covariables en el análisis. Para determinar el efecto significativo de los factores inter-sujetos, el estadístico de traza de Pillai fue utilizado para determinar que factores fueron significativos. Para cada nivel de los tratamientos para cada prueba, las medias marginales y los errores estándar fueron estimados. Se realizó una comparación por pares para determinar entre que tratamientos hubo diferencia estadística significativa dentro de cada prueba, un $p < 0.05$ fue considerado significativo.

IV. RESULTADOS

4.1. Experimento 1. Desarrollo de un protocolo de vitrificación de espermatozoides de alpaca.

En este experimento se trabajaron muestras espermáticas obtenidas de la cola del epidídimo y muestras obtenidas mediante colección de semen. Se realizaron los experimentos de acuerdo a lo diseñado, sin embargo, en la primera y segunda etapa no se pudieron recuperar espermatozoides móviles (Cuadro 7 y 8), razón por la cual no se realizaron pruebas funcionales adicionales.

Cuadro 7. Porcentaje de motilidad obtenida luego de vitrificar muestras de espermatozoides de alpaca recuperados del epidídimo (n=6) en una solución Tris base.

Tipo de azúcar utilizado para vitrificación	Espermatozoides al inicio del experimento	Concentraciones finales de azúcares		
		0.25 M	0.5 M	1.0 M
Fructosa	31.50	0.00	0.00	0.00
Sacarosa		0.00	0.00	0.00
Trehalosa		0.00	0.00	0.00

Cuadro 8. Porcentaje de motilidad obtenida luego de vitrificar muestras de semen de alpaca (n=5) en una solución Tris base.

Tipo de azúcar utilizado para vitrificación	Espermatozoides al inicio del experimento	Concentraciones finales de azúcares		
		0.25 M	0.5 M	1.0 M
Fructosa	57.00	0.00	0.00	0.00
Sacarosa		0.00	0.00	0.00
Trehalosa		0.00	0.00	0.00

En la tercera etapa del Experimento 1, se utilizó un medio HTF para realizar la vitrificación espermática, en lugar del medio Tris base de las etapas anteriores. En este ensayo se lograron observar algunos espermatozoides viables luego del proceso de vitrificación, pero los porcentajes de motilidad evaluados fueron solamente alrededor del 1%. (Cuadro 9). El tipo de azúcar utilizado (sacarosa, fructosa, trehalosa) no tuvo efecto en la motilidad luego del proceso de vitrificación. Por otro lado, la concentración de azúcar si tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$). No se observa una interacción entre el tipo y concentración de azúcar.

En el cuadro 10, es posible observar los porcentajes de viabilidad/integridad acrosomal en las muestras vitrificadas en medio HTF. No se observan diferencias entre los azúcares utilizados, pero si existe un efecto de la concentración de los azúcares ($p < 0.05$) (Anexo 4). Adicionalmente, es interesante destacar que los promedios en general de cada grupo van alrededor de 4% de espermatozoides vivos, en comparación con la motilidad que es de aproximadamente 0.5% en cada grupo.

Cuadro 9. Porcentaje de motilidad obtenida luego de vitrificar muestras de espermatozoides de alpaca recuperados del epidídimo (n=9) en una solución HTF.

Tipo de azúcar utilizado para vitrificación	Espermatozoides al inicio del experimento	Concentraciones finales de azúcares		
		0.25 M	0.5 M	1.0 M
Fructosa	37.22 (14.39)	0.56 ^a (0.24)	0.33 ^a (0.17)	0.11 ^a (0.11)
Sacarosa		1.22 ^a (0.72)	0.33 ^a (0.24)	0.22 ^a (0.15)
Trehalosa		1.00 ^a (0.55)	0.33 ^a (0.24)	0.00 ^a (0.00)
Total		0.93 ^a (0.31)	0.33 ^{ab} (0.12)	0.11 ^b (0.06)

Valores son promedios (error estándar).

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

Cuadro 10. Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto obtenidos luego de vitrificar muestras de espermatozoides de alpaca recuperados del epidídimo (n=9) en una solución HTF.

Tipo de azúcar utilizado para vitrificación	Espermatozoides al inicio del experimento	Concentraciones finales de azúcares		
		0.25 M	0.5 M	1.0 M
Fructosa	42.83 (8.94)	4.70 ^a (1.48)	3.42 ^a (1.59)	4.33 ^a (1.76)
Sacarosa		5.83 ^a (2.95)	3.00 ^a (2.08)	4.20 ^a (2.27)
Trehalosa		4.25 ^a (2.66)	3.25 ^a (1.31)	2.33 ^a (0.91)
Total		4.86 ^a (1.31)	3.27 ^b (0.89)	3.49 ^b (0.87)

Valores son promedios (error estándar).

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

4.2. Experimento 2. Estudio del efecto de la incubación de espermatozoides de alpaca con PMN activados con PMA en la funcionalidad espermática.

Los resultados del experimento 2 pueden observarse en el cuadro 11. Si bien el análisis multivariado no fue significativo (Anexo 5), al realizar los ANOVAs individuales por cada variable, se encuentra un efecto significativo en la motilidad espermática. Se observa que luego de la incubación por 3 horas, los porcentajes de motilidad son significativamente menores ($p < 0.05$) en el grupo PMN activados ($x: 13.67$; E.E.:2.34) en comparación con el grupo control ($x: 22.42$; E.E.:1.83). En el caso de la integridad funcional de membrana y la vitalidad/integridad acrosomal, se aprecia una ligera disminución de estos indicadores en el grupo PMN activados, pero no significativa.

Cuadro 11. Efecto de la incubación de espermatozoides de alpaca con polimorfos nucleares activados con PMA para inducir la formación de ROS

Parámetros seminales evaluados	Espermatozoides al inicio del experimento	Luego de incubación por 3 horas		
		Control	PMN activados	Significancia
Motilidad (%)	27.20 (1.32)	22.42 ^a (1.83)	13.67 ^b (2.34)	$p = 0.049$
Integridad funcional de membrana (%)	31.60 (1.96)	29.56 ^a (2.14)	27.60 ^a (3.82)	$p = 0.661$
Vitalidad/integridad acrosomal (%)	43.20 (4.97)	38.17 ^a (3.46)	35.09 ^a (2.99)	$p = 0.639$

Valores son promedios(error estándar).

^{a, b} indican diferencias significativas en filas ($p < 0.05$).

Comparaciones en filas no incluyen muestras de espermatozoides frescos.

4.3. Experimento 3. Evaluación del efecto de 2 análogos de superóxido dismutasa durante el proceso de criopreservación de espermatozoides de alpaca.

En forma general, el análisis multivariado (Anexo 6) nos muestra un efecto significativo de los tratamientos ($p < 0.05$) sobre la calidad seminal, donde se observa un mejor efecto del Tempol en comparación con el grupo Control.

En el cuadro 12 se presentan las medias estimadas. Al comparar la motilidad espermática entre los 3 grupos, se observa que los grupo Tempol ($x: 22.57$; E.E.: 0.68) y Tempo ($x: 19.63$; E.E.: 1.39) fueron significativamente ($p < 0.05$) superiores que el grupo control ($x: 10.62$; E.E.:1.93).

En forma similar, al evaluar la integridad funcional de membrana, se encontró que los grupos Tempo ($x:13.08$; E.E.:1.14) y Tempol ($x:14.31$; D.S.:0.86) tuvieron mayores ($p < 0.05$) porcentajes que el grupo control ($x: 10.38$; D.S.: 0.76).

Al evaluar la integridad del ADN espermático, se observa una tendencia similar, sin embargo, el grupo Tempol ($x: 83.76$; E.E.:0.76 %) presenta un mayor ($p < 0.05$) porcentaje de espermatozoides con ADN no fragmentado en comparación con el grupo Tempo ($x: 74.20$; E.E.: 1.19), mientras que el grupo Tempo es mayor ($p < 0.05$) al grupo control ($x: 63.68$; E.E.: 1.49%).

En el caso de la evaluación de la vitalidad/integridad acrosomal, los porcentajes encontrados en los 3 grupos son bastantes similares, siendo ligeramente superiores en el Tempol, aunque sin observarse diferencias significativas.

Cuadro 12. Efecto de la adición de antioxidantes (Control, Tempo 1mM y Tempol 1mM) durante la curva de enfriamiento (10°C) para la criopreservación de espermatozoides de alpaca sobre la motilidad espermática, integridad funcional de membrana, viabilidad e integridad acrosomal y espermatozoides con ADN no fragmentado.

Parámetros seminales evaluados	Semen luego del proceso de criopreservación			Significancia
	Control	Tempo (1 mM)	Tempol (1 mM)	
Motilidad (%)	10.62 ^a (1.93)	19.63 ^b (1.39)	22.57 ^b (0.68)	P = 0.001
Integridad funcional de membrana (%)	10.38 ^a (0.76)	14.31 ^b (0.86)	13.08 ^b (1.14)	P = 0.005
Vitalidad/integridad acrosomal (%)	29.03 ^a (2.53)	31.60 ^a (1.27)	32.63 ^a (2.66)	P = 0.605
Espermatozoides con ADN no fragmentado (%)	63.68 ^a (1.49)	74.20 ^b (1.19)	83.76 ^c (0.76)	P = 0.000

Valores son promedios (error estándar.)

^{a, b} indican diferencias significativas en filas ($p < 0.05$).

Además se ha evaluado la relación existente en el porcentaje de espermatozoides que presentaron ADN no fragmentado (TUNEL-) en comparación con las demás variables. En el cuadro 13 se puede observar que únicamente existe una correlación significativa entre ADN no fragmentado (TUNEL-) y motilidad espermática. En este caso, se observa una correlación positiva ($p < 0.05$), en donde $r = 0.58$. El análisis estadístico se presenta en los anexos 7, 8 y 9.

Cuadro 13. Correlación entre porcentaje de ADN no fragmentado (TUNEL-) y variables motilidad, integridad de membrana (HOS+) y vitalidad/integridad acrosomal

Variables	Correlación (r)	Significancia
TUNEL-vs. Motilidad	0.58	p = 0.04
TUNEL- vs. HOS+	0.14	p = 0.72
TUNEL- vs. Vitalid/acrosoma	-0.18	p = 0.55

En la figura 7 se muestran ejemplos de gráficos Dot Plot correspondientes a los grupos Control (Fig. 7a), Tempo (Fig. 7b) y Tempol (Fig. 7c). En la figura 1a se observa una mayor distribución de eventos entre los cuadrantes R1 y R2, lo cual representan espermatozoides con ADN intacto y espermatozoides con ADN fragmentados. Por otro lado, en las figuras 7b y 7c, se observa una mayor concentración de eventos localizados en el cuadrante R1, lo cual representa espermatozoides permeabilizados con ADN intacto.

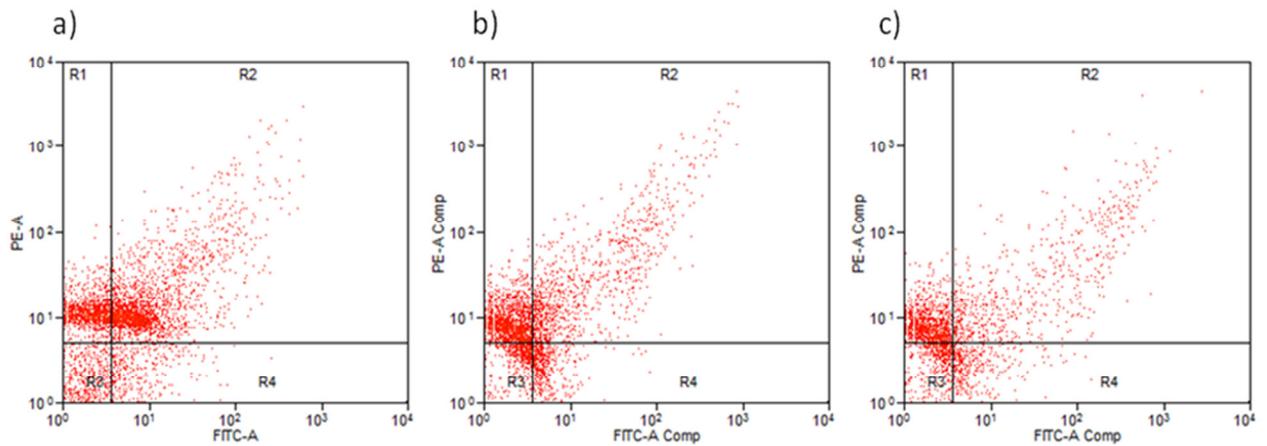


Figura 7. Análisis de citometría de flujo para evaluación de la integridad de ADN (TUNEL/PI) en la población de espermatozoides de alpaca criopreservadas por 3 tratamientos: (a) Grupo Control, (b) Grupo Tempo, (c) Grupo Tempol. Cuadrantes, R1: espermatozoides permeabilizados con ADN intacto ((TUNEL-/PI+) y R2: espermatozoides permeabilizados con ADN fragmentado (TUNEL+/PI+). R3: no permeabilizados con ADN intacto (PI-/TUNEL-); R4: espermatozoides no permeabilizados con ADN fragmentado (PI - /TUNEL +).

V. DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo demuestran por primera vez el efecto nocivo de incubar espermatozoides de alpaca con PMN activados con PMA (para inducir la producción de especies reactivas de oxígeno) en la motilidad de espermatozoides de alpaca. Así también se demuestra que la adición de un antioxidante análogo de superóxido dismutasa (Tempol 1 mM) durante el proceso de criopreservación permite reducir parcialmente la pérdida de motilidad espermática y evita el incremento de la fragmentación del ADN espermático.

En el primer experimento se realizaron diversos ensayos de vitrificación utilizando espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo (Primera etapa, n=6 y tercera etapa, n=9) y muestras de semen (Segunda etapa, n=5) de alpacas. En la primera y segunda etapa, en ninguna de las repeticiones fue posible encontrar al menos un espermatozoide viable, habiendo utilizado un medio Tris base con 1% de BSA (Albúmina sérica bovina) y habiendo utilizado distintos tipos y concentraciones de azúcares (Sacarosa, trehalosa y fructosa, cada una en concentraciones 0.25, 0.5 y 1 M). En la tercera etapa del experimento 1 se vitrificaron espermatozoides de alpaca en un medio HTF con 1% de BSA evaluando los mismos tipos y concentraciones de azúcares que en la etapa anterior; y sólo fue posible encontrar algunos espermatozoides con motilidad (menos del 1%) y algunos espermatozoides vivos (menos del 5%). Sin bien podemos decir que para vitrificar espermatozoides de alpaca el medio HTF es mejor que el Tris base, los resultados aún son muy bajos en comparación con la criopreservación de semen.

Experiencias previas sobre vitrificación espermática han sido descritas principalmente en humanos (Isachenko *et al.*, 2004a, 2004b; Hossain y Osuamkpe, 2007). Al utilizar este método se evitan factores que han sido descrito como nocivos para la sobrevivencia espermática como la formación de cristales de hielo, la exposición de espermatozoides a sustancias crioprotectoras y exposición por un periodo prolongado a especies reactivas de oxígeno. Estos primeros trabajos fueron perfeccionados posteriormente estudiando el efecto de los medios de vitrificación (HTF, *human tubarian fluid*), la presencia de albúmina sérica humana (HSA) o la adición de agentes crioprotectores no permeantes como sacarosa 0.25 M (Isachenko *et al.*, 2008). En espermatozoides caninos se ha logrado obtener resultados aceptables luego de experimentar con diferentes medios, porcentajes de albúmina y concentraciones de azúcares como sacarosa (Sánchez *et al.*, 2011). Para caninos se ha definido como un medio adecuado de vitrificación el medio HTF (*Human tubarian fluid*) con 1% de BSA (*Bovine seric albumin*) y sacarosa 0.25 M. Similares experiencias fueron necesarias para encontrar un medio de vitrificación adecuado para espermatozoides de salmón (*Oncorhynchus mykiss*), en donde se ha trabajado con un medio específico para mantenimiento de espermatozoides de pez (medio Cortland®) en lugar del medio HTF; además se ha concluido que la adición de 1% de BSA y 40% de plasma seminal confiere los mejores resultados en dicha especie (Merino *et al.*, 2011).

Aparentemente los espermatozoides de alpaca no podrían resistir el proceso de vitrificación. En un inicio se utilizó el medio Tris base debido a que se recomendaba emplear un medio apropiado para mantener los espermatozoides de una determinada especie, y en este caso existía la experiencia previa que el medio era apropiado para espermatozoides de alpaca (Banda *et al.*, 2010). Sin embargo debido a los resultados es que se cambia el medio de vitrificación por el HTF. El medio HTF ha sido utilizado para vitrificar espermatozoides de humanos (Isachenko *et al.*, 2004a, 2004b) y de caninos (Sánchez *et al.*, 2011) y contiene compuestos como NaCl, KCl, CaCl₂*2H₂O, MgSO₄*7H₂O, entre otros (Quinn *et al.*, 1985) a diferencia del Tris base que carece de estas sales. Empleando este medio se obtuvieron algunas células viables luego del proceso de vitrificación, pero insuficientes en proporción para realizar cualquier otro estudio.

Las razones por las cuales los espermatozoides de alpaca no toleran el proceso de vitrificación pueden ser varias y probablemente estén relacionadas a la combinación de 2 factores. El primero es que alguno de los componentes ó la combinación de determinados componentes del medio que utilizamos no hayan sido adecuados para conseguir la vitrificación esperada. Es conocido que el rol fundamental de las sustancias utilizadas en los medios es modificar la permeabilidad al agua de la membrana espermática y que existe una variabilidad entre especies que afectan los resultados en forma positiva o negativa (Holt, 2000). Esto podría explicar las diferencias obtenidas al comparar los medios Tris base y HTF. De todos modos, en nuestro estudio intentamos cubrir los principales efectos que afectarían la sobrevivencia espermática durante la vitrificación, como el uso de BSA al 1%, una concentración espermática de 10×10^6 espermatozoides/mL, y tres tipos de agentes crioprotectores no permeantes (sacarosa, glucosa y trehalosa en concentraciones de 0.25, 0.5 y 1M) en forma similar a lo reportado como exitoso para vitrificar espermatozoides de humanos. Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos un efecto significativo del tipo, ni de la concentración del crioprotector no permeante.

El segundo factor podría estar relacionado a la naturaleza intrínseca del espermatozoide de alpaca. Se conoce que la exposición de una célula a temperaturas muy bajas induce cambios en la organización bidimensional de la membrana lipídica y puede modificar las propiedades cinéticas de las enzimas intramembranas (Hammerstedt et al., 1990). Estos daños son más severos en especies en las cuales las concentraciones de colesterol son bajas y las concentraciones de ácidos grasos poli-insaturados son altas. De acuerdo a esto, algunas especies como los humanos son considerados más resistentes al daño durante el enfriamiento severo en comparación con otras especies como bovino y ovino. En ese sentido, los espermatozoides humanos son los únicos que se han podido vitrificar con éxito, mientras que están en desarrollo protocolos para vitrificar espermatozoides de salmón y de canino, no existiendo más reportes en otros mamíferos domésticos. Si bien no existen estudios sobre la composición química de la membrana del espermatozoide de alpaca, los estudios realizados sobre criopreservación en esta especie indicarían que es una de las especies que tiene menos probabilidad de resistir el daño durante el proceso de enfriamiento (Santiani et al., 2005). En conclusión de acuerdo a nuestra metodología la vitrificación de espermatozoides de alpaca no permite obtener

espermatozoides funcionales. En base a estos resultados no se realizó la vitrificación de espermatozoides de alpaca utilizando compuestos antioxidantes.

En relación a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), para demostrar el efecto nocivo de ROS en la función de espermática, espermatozoides de alpaca fueron incubados por 3 horas a 37°C en un medio con polimorfos nucleares activados con PMA (phorbol myristate acetate). El PMA es conocido por ser un potente activador de neutrófilos y macrófagos resultante en la generación de grandes cantidades de ROS (Rehan *et al.*, 1985). Villegas *et al.* (2003) describen que la producción de ROS es mínima cuando se incuban espermatozoides sólo o en presencia de polimorfos nucleares no activados, sin embargo, cuando se incubaron espermatozoides humanos con polimorfos nucleares y PMA, los niveles de ROS detectados mediante quimioluminiscencia aumentan exponencialmente (casi en 40 veces sus valores basales). Dichos resultados concluyeron que los polimorfos nucleares producen ROS sólo en presencia de PMA. Basándonos en dicho estudio, realizamos un experimento similar, aunque no medimos directamente los niveles de ROS, en base a la evidencia anterior se asumió que se estaban produciendo grandes cantidades de ROS al realizar la incubación de espermatozoides de alpaca en presencia de polimorfos y PMA. Nuestros resultados indican que la motilidad luego de la incubación por 3 horas en un medio con PMN y PMA es significativamente menor (13%) en comparación con el grupo control que fue incubado en un medio Tris base (22%).

Estos resultados permitirían inferir la producción de ROS como responsable de afectar la motilidad de espermatozoides de alpaca, tal como ha sido reportado previamente en otras especies como humanos (Álvarez y Storey, 1989; Baumber *et al.*, 2002) y ovinos (Santiani, 2003; Stefanov *et al.*, 2004).

En la evaluación de la integridad funcional de membrana y de la vitalidad/integridad acrosomal no se observó un efecto significativo de la incubación de espermatozoides de alpaca con PMN y PMA. Este mismo efecto ya ha sido descrito en anteriores oportunidades, como en el trabajo de Peris *et al.* (2007) quienes refieren que la pérdida de motilidad es el indicador más sensible de estrés oxidativo en comparación con otros parámetros seminales en espermatozoides de ovinos (Peris *et al.*, 2007). En conclusión, los resultados sugieren que la motilidad de los espermatozoides de alpaca es sensible al efecto de los ROS producidos por polimorfos nucleares activados con PMA.

Los resultados del experimento 3, demostraron que el efecto nocivo de la criopreservación en la motilidad espermática, integridad funcional de membrana y la integridad del ADN espermático puede ser reducido parcialmente por la adición de análogos de superóxido dismutasa, denominados Tempo ó Tempol en concentración 1 mM, existiendo evidencias en espermatozoides de humanos y ovinos, que durante la criopreservación de semen, al disminuir la temperatura de enfriamiento a alrededor de 5 °C se incrementa significativamente la producción de ROS (Wang *et al.*, 1997; Santiani, 2003).

Es probable asumir un incremento en la producción de ROS asociado con la disminución de la temperatura en la integridad estructural y/o funcional de la membrana espermática, basado en similares efectos reportados en espermatozoides de humanos (Wang *et al.*, 1997). En ese sentido, el descenso en la temperatura cambia la distribución del patrón de grupos sulfidrilos (Chatterjee *et al.*, 2001), migración de pequeñas regiones a través de la membrana plasmática y arreglos en la localización de fosfolípidos (Medeiros *et al.*, 2002) que podrían activar algunos de los mecanismos propuestos para la producción de ROS como el sistema NADPH oxidasa a nivel de la membrana plasmática.

Conociendo que existe un incremento en la producción de ROS durante la curva de enfriamiento (Wang *et al.*, 1997; Chatterjee y Gagnon, 2001) y que los ROS están relacionados con pérdida de motilidad y viabilidad espermática (Bell *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1997) es probable que los ROS sean responsables, al menos parcialmente, de la disminución de la calidad seminal por efecto de la criopreservación.

La pérdida de motilidad espermática ha sido prevenida por la adición de Tempol a los diluyentes durante la refrigeración de espermatozoides de ovino (Mara *et al.*, 2002) y de pavo (Donoghue y Donoghue, 1997). Del mismo modo la adición de Tempo entre 0.5 a 1 mM permite obtener mayores porcentajes de motilidad (entre 10 a 15%) en espermatozoides de ovinos (Santiani, 2003; Ruiz *et al.*, 2007). En el presente estudio se obtiene similar efecto en la motilidad espermática con la adición de Tempo y/o Tempol luego del descongelamiento de espermatozoides de alpaca. El Tempo y Tempol son nitroxidos con actividad similar a la enzima superóxido dismutasa (Mitchell *et al.*, 1990) que reaccionan en presencia del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno (Offer *et al.*, 1998). Posteriormente, el peróxido de hidrógeno se convierte en un

radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton (Aitken y Fisher, 1994). Este radical es responsable directo del inicio de la peroxidación lipídica en espermatozoides de humanos y ratones (Aitken y Fisher, 1994).

El Tempo y Tempol aparentemente no tienen efecto sobre el peróxido de hidrógeno (Offer *et al.* 1998), pero al oxidar Fe y Cu evitan la reacción de Fenton (Luo, 2001). De esta manera, este nitróxido evitaría la formación de radicales hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno y por lo tanto bloquearían el inicio de la peroxidación lipídica.

También es probable que el peróxido de hidrógeno sea removido por otros mecanismos como mediante la acción de la catalasa presente en la leche (Foote *et al.*, 2002). Sin embargo, la formación de peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo no inician la peroxidación lipídica en espermatozoides de conejos (Álvarez y Storey, 1989). En este caso, la protonación del anión superóxido a radicales hidroperóxilo inicia la peroxidación lipídica (Aitken y Fisher, 1994). De este modo, la reacción del anión superóxido a peróxido de hidrógeno por efecto del Tempol reduciría la formación de radicales hidroperóxilo y por lo tanto estaría previniendo la peroxidación lipídica.

Consecuentemente, la disminución en la producción de ROS y peroxidación lipídica como resultado de la adición de estos nitróxidos indicarían que la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno y/o el bloqueo de la formación de radicales hidroxilo interfieren con el inicio de la peroxidación lipídica en espermatozoides de alpaca. Estos hechos se reflejarían en la mejor motilidad espermática obtenida en el grupo Tempol 1 mM luego del proceso de criopreservación en comparación con el grupo Control (diferencia de aproximadamente 11%).

El análisis del ADN espermático en nuestro experimento también indicó un efecto positivo de la adición de Tempo y Tempol 1 mM en la integridad del ADN espermático en alpacas. La evaluación de la integridad del ADN espermático en diferentes especies de mamíferos, incluido el hombre, es necesaria para la utilización de espermatozoides en técnicas de reproducción asistida, debido a que un incremento en el daño del ADN se ha asociado a falla reproductiva. El presente estudio confirma el efecto favorable de la utilización de antioxidantes como componentes de los medios diluyentes para prevenir el daño al ADN espermático durante la criopreservación de semen de alpaca.

En el grupo tratado con Tempol, el porcentaje de fragmentación del ADN espermático fue en promedio 16%, mientras que en un reporte previo (Rodríguez, 2009), se señala que la fragmentación del ADN en espermatozoides frescos de alpaca es de alrededor del 13%. En nuestro estudio, en el grupo de espermatozoides de alpaca criopreservados sin antioxidantes, la fragmentación del ADN espermático llega hasta 38%. Esto indica que la utilización del antioxidante Tempol como parte del diluyente para criopreservación de semen de alpaca, evitaría en forma significativa el daño al ADN espermático, alcanzando porcentajes muy similares a los encontrados en muestras de semen fresco, esto implica que el no utilizar antioxidantes durante la criopreservación el daño al ADN espermático aumenta en casi un 25%. Estos resultados se explicarían porque durante la criopreservación de espermatozoides la producción de ROS se incrementa significativamente (Wang *et al.*, 1997; Santiani, 2003). Estos posibles niveles elevados de ROS estarían relacionados con la fragmentación del ADN en espermatozoides de alpaca, información que falta ser demostrada.

Este estudio también describe por primera vez la determinación de la fragmentación del ADN en espermatozoides de alpaca mediante el ensayo de TUNEL evaluado por citometría de flujo. El método de TUNEL se basa en que durante la fragmentación del ADN espermático, se producen fragmentos de ADN o cadenas simples de ADN, las cuales son factibles de ser detectados mediante la incorporación de nucleótidos marcados con fluoresceína (Gorzcyca *et al.*, 1993). Los espermatozoides marcados con la sonda del TUNEL presentan una fluorescencia de color verde, que podría ser evaluada mediante microscopia de fluorescencia o mediante citometría de flujo. En el caso de las lecturas mediante microscopia de fluorescencia, se recomienda contar 200 espermatozoides por duplicado para disminuir la probabilidad de error (WHO, 2002), lo cual puede constituir la evaluación en un proceso largo y tedioso. Por el contrario, la evaluación del ensayo de TUNEL mediante citometría de flujo se realiza en segundos y evaluando una población de 10 000 espermatozoides, constituyendo entonces un análisis más objetivo y replicable (Muratori *et al.*, 2008). El porcentaje de daño espermático encontrado mediante citometría de flujo puede ser el doble o hasta el triple que los detectados mediante microscopia de fluorescencia (Muratori *et al.*, 2008). Esto podría explicar los menores porcentajes de ADN fragmentado (15-20%) encontrados en espermatozoides de alpaca

(Rodríguez, 2009), donde utilizaron TUNEL y microscopia de fluorescencia, en contraste con nuestro estudio, donde se realizó TUNEL y citometría de flujo con valores que fluctuaron entre 15 a 40%. De acuerdo a nuestros resultados, la adición de Tempol 1mM al diluyente en base a leche descremada reduce la fragmentación del ADN en espermatozoides de alpaca durante el proceso de criopreservación, obteniendo un mayor número de espermatozoides con ADN intacto para ser utilizados en técnicas de reproducción asistida.

En el presente experimento no se observaron mejores porcentajes de viabilidad e integridad acrosomal cuando se utilizaron los antioxidantes análogos de superóxido dismutasa. Esto podría explicarse porque la peroxidación lipídica altera los mecanismos de control a nivel de membranas que permiten llevar a cabo la reacción acrosomal (Peris *et al.*, 2007). Se sabe que las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen la capacidad de iniciar la cascada de la peroxidación lipídica en la membrana espermática y que la peroxidación de los lípidos de la membrana se correlaciona con disminución de la motilidad espermática (Storey, 1997). Asimismo, de acuerdo a lo reportado por Morton *et al.* (2010) y Santiani *et al.* (2005) en espermatozoides de alpacas y Gil *et al.* (2003) en espermatozoides de ovinos, la cantidad de daño acrosomal producido por el proceso de criopreservación es menor al 5 y 10%, respectivamente. Por lo tanto es probable que al existir un reducido daño a nivel acrosomal durante la criopreservación, y al existir diversos grados de peroxidación lipídica en la membrana espermática, la variable relacionadas a la regulación adecuada de la membrana acrosomal no haya sido favorecidas por la adición de los análogos de superóxido dismutasa.

En relación a nuestro método de criopreservación, podemos observar que los porcentajes de motilidad (11%) obtenidos luego del proceso de criopreservación en el grupo control son ligeramente menores a los descritos anteriormente para criopreservación de semen de alpaca (20% de acuerdo a Santiani *et al.*, 2005), sin embargo los otros parámetros evaluados (Integridad de membrana y vitalidad/integridad acrosomal) son similares a los descritos para espermatozoides epididimarios de alpaca (Banda *et al.*, 2010). Es posible que estos pobres resultados en la motilidad espermática en el presente estudio se deben a la motilidad inicial de la muestras que fue aproximadamente 50%, mientras que Santiani *et al.* (2005) iniciaron su experimento con motilidades de alrededor del 70%. De todos modos consideramos que el protocolo de criopreservación utilizado en este estudio

fue válido para estudiar posteriormente el efecto de la adición de los antioxidantes análogos de superóxido dismutasa.

Una característica peculiar del dilutor en base a leche descremada que trabajamos es que utiliza etilenglicol 0.1 M como agente crioprotector, en comparación con otros dilutores donde se utiliza glicerol 1 M (González *et al.*, 2008). El efecto comparativo entre glicerol y etilenglicol no ha sido estudiado en otros trabajos para espermatozoides de alpacas. Es probable que el etilenglicol a una concentración 0.1 M brinde una mejor protección en comparación con el glicerol para el congelamiento de espermatozoides de alpaca, tal como ha sido demostrado en otras especies (Gilmore *et al.*, 2002) y en muestras de semen de alpacas (Santiani *et al.* (2005) y muestras obtenidas de la cola del epidídimo (Banda *et al.*, 2010). En consecuencia, la utilización de etilenglicol, como agente crioprotector para el congelamiento de espermatozoides de alpaca podría constituir una alternativa factible de ser utilizada.

Debemos considerar que la mayoría de trabajos antiguos sobre criopreservación espermática en camélidos sudamericanos utilizaron muestras de semen completo (Mc Evoy *et al.*, 1992; von Baer *et al.*, 1999; Valdivia *et al.*, 2000; Aller *et al.*, 2003; Santiani *et al.*, 2005), mientras que actualmente se viene trabajando con espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo (Morton *et al.*, 2007, 2009). En nuestro trabajo, en los experimentos 1 y 2, se utilizaron espermatozoides procedentes de la cola del epidídimo y por lo tanto no estuvieron expuestos al plasma seminal. En ese sentido, Rodríguez (2009) indican que no existe un efecto protector por parte del plasma seminal, al menos durante la criopreservación de espermatozoides de alpaca cuando se congela espermatozoides epididimarios con plasma seminal en proporción 1:1, mientras que recientemente, Kershaw-Young y Maxwell (2011) reportan que la incubación de espermatozoides epididimarios y eyaculados con 100% del plasma seminal afecta negativamente la calidad espermática en alpacas, pero con 10% de plasma seminal se pueden obtener mejores resultados. Es probable que ciertas proteínas presentes en el plasma seminal puedan proteger la membrana plasmática de los espermatozoides del estrés por frío en el proceso de criopreservación (Colás *et al.*, 2009; Leahy *et al.*, 2009). Por otro lado en espermatozoides epididimarios de equinos (Heise *et al.*, 2011) si bien la adición de plasma seminal puede mejorar inicialmente la motilidad progresiva, no tiene efecto en la calidad seminal post-

descongelamiento. En consecuencia, los trabajos con espermatozoides epididimarios se constituyen en buenos modelos para el estudio de la criopreservación de semen de alpaca y mientras existan dificultades para coleccionar buenas muestras de semen de alpaca, es posible ir estudiando diversos protocolos de criopreservación utilizando espermatozoides de alpaca obtenidos de la cola del epidídimo.

VI. CONCLUSIONES

1. La incubación de espermatozoides de alpaca con polimorfos nucleares activados con PMA disminuye significativamente la motilidad espermática.
2. La integridad funcional de membrana y vitalidad/integridad acrosomal no son afectadas por la incubación de espermatozoides de alpaca con polimorfos nucleares activados con PMA.
3. La utilización de los antioxidantes análogos de superóxido dismutasa (Tempo y Tempol 1mM) como parte del dilutor para la criopreservación de espermatozoides de alpaca previene parcialmente la pérdida de motilidad, pérdida de la integridad funcional de membrana y la fragmentación del ADN espermático.
4. Existe una correlación positiva entre motilidad espermática y ADN espermático no fragmentado en espermatozoides de alpaca.
5. La pérdida de vitalidad/integridad acrosomal durante el proceso de criopreservación no es prevenida por la adición de antioxidantes análogos de superóxido dismutasa.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aisen E, Álvarez H, Venturino A, Garde J. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53:1053-1061.

Aitken R. 1994. A free radical theory of male infertility. *Reprod Fertil Dev* 6:19-24.

Aitken R. 1999. The amoroso lectures. The human spermatozoon –a cell in crisis?. *J Reprod Fertil* 115:1-7.

Aitken R, Clarkson J. 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fert* 81:459-469.

Aitken R, Clarkson J. 1988. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 9:367-376.

Aitken R, Clarkson J, Fishel S. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod* 40:83-197.

Aitken R, Buckingham D, West K. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucegenin-dependent chemiluminescence. *J Cel Physiol* 151:466-477.

Aitken R, Fisher H. 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 16:259-267.

Aitken R, West K, Buckingham D. 1994. Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress and sperm function. *J Androl* 15: 343-352.

Aitken R, Paterson M, Fisher H, Buckingham D, van Duin M. 1995. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* 108:2017-2025.

Aitken R, Gordon E, Harkiss D, Twigg J, Milne P, Jennings Z, Irvine D. 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 59:1037-1046.

Aitken , R. 2004. The founders lecture. Human spermatozoa: fruits of creation, seed of doubt. *Reprod Fertil Dev* 16:655-664.

Aitken R, De Luliis G. 2010. On the posible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 16(1):3-13.

Albers M, Barrios D. 2006. Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros *postmortem* obtenidos mediante lavado retrógrado. *Zootecnia Trop* 24(3): 267-280.

Aller JF, Rebulfi, Ge, Cancino AK, Alberio RH. 2003. Influence of cryopreservation on the motility, viability and fertility of llama (*Lama glama*). *Arch. Zootec.* 52:15-23.

Álvarez J, Storey B. 1983, Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod* 29:548-555.

Álvarez J, Touchstone J, Blasco L, Storey B. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *J Androl* 8:338-348.

Álvarez J, Storey B. 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res* 23:77-90.

Álvarez J, Storey B. 1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 13, 232-241.

Andaur M, Santiani A, Sepúlveda N. 2004. Concentraciones plasmáticas de testosterona máxima en carneros como respuesta a la aplicación de GnRH. En: II Reunión Anual de la Sociedad de Andrología y Gametología de Chile. Temuco, Chile.

Anel L, Gerra C, Alvarez M, Anel E, Martínez A, Boixo C, Kaabi M, Herraez P, Paz P. 2002. Effect of postmortem interval in quality of epididymal spermatozoa in Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Theriogenology* 57: 577.

Arthur G, Noakes D, Pearson H. 1991. *Reproducción y Obstetricia veterinaria*. 6^o ed. Madrid: McGraw-Hill. 601-635 p.

Askari H, Check J, Peymer N, Bollendorf A. 1994. Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Arch Androl* 33:11-15.

Awda BJ, Mackenzie-Bell M, Buhr MM. 2009. Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biol Reprod* 81(3):553-561.

Ax R, Dally M, Didion B, Lenz R, Love C, Varner D, Hafez B, Bellin M. 2002. Evaluación de semen. En: *Reproducción e inseminación artificial*. 7^o Ed. Edit. Interamericana. México. p 375-386.

Baker H, Brindle J, Irvine D, Aitken R. 1996. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. *Fertil Steril* 65:411-419.

- Baker M, Aitken R. 2004. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol* 216:47-54.
- Ball B, Gravance C, Medina V, Baumber J, Liu . 2000. Catalase activity in equine semen. *Am J Vet Res* 61:1026-1030.
- Ball B, Vo A, Baumber J. 2001. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am J Vet Res* 62:508-515.
- Ball B, Vo A. 2002. Determination of lipid peroxidation in equine spermatozoa during cooled storage. *Theriogenology* 57:367 (abstract).
- Ball B. 2008. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim Reprod Sci* 107:257-267.
- Banda J. 2009. Evaluación de los dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. Tesis Médico Veterinario. Lima: Univ Nac Mayor San Marcos. Lima, Perú. 68p.
- Banda J, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, Santiani A. 2010. 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* 21:145-153.
- Baumber J, Vo A, Sabeur K, Ball B. 2002. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology* 57:1025-1033.
- Baumber J, Ball B, Linfor J, Meyers S. 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl* 24:621-628.
- Bell M, Wang R, Hellstrom W, Sikka S. 1993. Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm. *J of Androl* 14:472-478.

- Berlinguer F, Ledda S, Rosati I, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S. 2003. Superoxide dismutase affects the viability of thawed European mouflon (*Ovis g. musimon*) semen and the heterologous fertilization using both IVF and intracytoplasmatic sperm injection. *Reprod Fertil Dev* 15:19-25.
- Bilodeau J, Chatterjee S, Sirard M, Gagnon C. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 55:282-288.
- Bilodeau J, Blanchette S, Gagnon C, Sirard M. 2001. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 56:275-286.
- Bilodeau J, Blanchette S, Cormier N, Sirard M. 2002. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender. Protection by piruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology* 57:1105-1122.
- Bize I, Santander G, Cabello P, Driscoll D, Sharpe C. 1991. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biol Reprod* 44:398-403.
- Blondin P, Coenen K, Sirard M. 1997. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl* 18:454-460.
- Boiso I. 2001. Principios básicos de criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 4(18):127-131.
- Bravo PW, Ordoñez C, Alarcón V. 1996. Processing and freezing of semen and artificial insemination of alpacas and llamas. En: 13th Int Congress Anim Reprod, Sydney, Australia.
- Bravo P, Flores U, Garnica J, Ordoñez C. 1997. Collection of semen and insemination of alpacas. *Theriogenology* 47:619-626.
- Bravo PW, Moscoso R, Alarcon V, Ordoñez C. 2002. Ejaculatory process and related semen characteristics. *Arch Androl* 48:65-72.

Breitbart H, Spungin B. 1997. The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* 3:195-202.

Burnaugh L, Sabeur K, Ball B. 2007. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology* 67:580-589.

Bustanza V. 2001. La alpaca: Crianza, manejo y mejoramiento. 1^a ed. Puno: Universidad Nacional del Altiplano. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. p 98-123.

Byrne G, Lonergan P, Wade M, Duffy P, Donovan A, Hanrahan J, Boland M. 2000. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim Reprod Sci* 62:265-275.

Carpio M, Ordoñez C, Alarcón V, Bravo P. 1999. Presencia de espermatozoides, niveles de testosterona, y tamaño testicular en alpacas. EN: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco-Perú.

Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T. 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction* 121:395-401.

Colás C, Junquera C, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. 2009. Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock. *Microsc Res Tech* 72:566-572.

Cordelli E, Eleuteri P, Leter G, Rescia M, Spano M. 2005. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception* 72:273-279.

Cormier N, Sirard M y Bailey J. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa in initiated by cryopreservation. *J Androl* 18, 461-468.

Cormier N, Bailey JL. 2003. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation- induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 69:177-185.

- Correa J, Rodríguez M, Patterson D, Zavos P. 1996. Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology* 46: 413-420.
- Coutinho da Silva M, Ferreira H, Johnson A. Effects of Tempol and L-Ergothioneine on motility parameters of cryopreserved stallion sperm. *Anim Reprod Sci* 107:317-318.
- Cross NL. 1998. Minireview: Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 59:7-11.
- Cross NL. 2000. Sphingomyelin modulates capacitation of human sperm in vitro. *Biol Reprod* 63:1129-1134.
- Curry M, Watson P. 1994. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology* 31:39-46.
- Chatterjee S, Gagnon C. 2001, Production of reactive species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 59:451-458.
- Chatterjee S, de Lamirande E, Gagnon C. 2001. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol Reprod Dev* 60:498-506.
- Chuna P, Leyva V, Franco J. 2000. Adherencias pene-prepucales y niveles de testosterona circulantes en alpacas. *Rev Inv Vet Perú* 10(2):11-16.
- D'Alessandro A, Maternucci A, Colonna M, Belliti A. 2001. Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology* 55:1159-1170.
- Dávalos R, Olazábal J. 2002. Evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. *Rev Inv Vet Perú* 13:98-99.

- De Jonge C, Han H, Lawrie H, Mack S, Zaneveld L. 1991. Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway. *J Exp Zool* 258:113-125.
- De Lamirande E, Gagnon C. 1993. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radl Biol Med* 14:157-166.
- De Lamirande E, Tsai C, Harakat A, Gagnon C. 1998. Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. *J Androl* 19:585-594.
- De Lamirande E, O'Flaherty. 2008. Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases. *Bioch Biophys Act* 1784:106-115.
- De Lamirande E, Lamothe G. 2009. Reactive oxygen-induced formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* 46:502-510.
- De Lamirande E, Lamothe G, Villemure M. 2009. Control of superoxide and nitric oxide formation during sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* 46:1420-1427.
- De las Heras M, Valcárcel A, Pérez L. 1997. In vitro capacitating effect of gamma-aminobutyric in ram spermatozoa. *Biol Reprod* 56: 964-968.
- De Leeuw F, De Leeuw A, Den Daas H, Colenbrader B, Werkleij A. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 30:32-44.
- Devireddy R, Swanlund D, Roberts K, Pryor J, Bischof J. 2000. The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing. *Hum Reprod* 15:1125-1135.
- Didion BA, Dubinsky J, Giles J, Graves CAN. 1989. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res* 22:51-57.

- Dong Q, Correa LM, Van devour CA. 2009. Rhesus monkey sperm cryopreservation with TEST-yolk extender in the absence of permeable cryoprotectant. *Cryobiology* 58:20-27.
- Donoghue A, Donoghue D. 1997. Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poult Sci* 76:1440-1445.
- Eid L, Lorton S, Parrish K. 1994. Paternal influence on s-phase in the first cell cycle of bovine embryo. *Biol Reprod* 51:1232-1237.
- El-Alamy M, Foote R. 2001. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Anim Reprod Sci* 65:245-254.
- Fernández-Baca S, Calderón W. 1966. Métodos de colección de semen de la alpaca. *Rev Fac Med Vet Univ Nac Mayor de San Marcos* 18–20:13-26.
- Fernández-Baca S, Novoa C. 1968. Primer ensayo de inseminación artificial de alpacas (*Lama pacos*) con semen de vicuña. *Rev Fac Med Vet Univ Nac Mayor de San Marcos* 22: 9-18.
- Fernández-Baca S, Novoa C, Sumar L. 1972. Comportamiento sexual de la alpaca macho frente a la renovación de las hembras. *Rev Inv Pec IVITA* 1(2):115-128.
- Fiser P, Ainsworth L, Langford G. 1981. Effect of osmolarity of skim-milk diluents and thawing rate on cryosurvival of ram spermatozoa. *Cryobiology* 18:399-403.
- Fiser P, Fairfull R. 1986. The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology* 23:518-524.
- Foote, R.H., Brockett, C.C. y Kaproth, M.T. 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 71:13-23.
- Ford W. 2004. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update* 10(5):387-399.

Fridovich I. 1997. Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 272:18515-18517.

Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 201:1203-1209.

Fuchs J, Thiele J, 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, pp 21-40.

García J, Vila L. 1984. Criopreservadores: concepto y manejo. *Biol Clín Hematol* 6:219-225.

Garde J, Aguado M, Montoro V, Perez M, García O, Perz S. 1994. Estudio post-mortem de la viabilidad y del poder fecundante del semen del morrueco. En: XVIII Jornadas de la SEOC. España. p 533-537.

Garner D, Hafez E. 2000. Espermatozoides y plasma seminal. En: Hafez E, Hafez B. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ª Ed. México: McGraw Hill. p 33-53.

Garnica J, Achata R, Bravo P. 1993. Physical and biochemical characteristic of alpaca semen. *Anim Reprod Sci* 32: 85-90.

Gavella M, Lipovac V. 1992. NADH-dependent oxido-reductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Arch Androl* 28, 135-141.

Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology* 59:1241-1255.

Gilmore J, Liu J, Woods E, Peter A, Critser J. 2000. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergences of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod* 15: 335-343.

Graham EF, Scheml MK, Eversen BK, Nelson DS. 1978. Semen preservation in nondomestic mammals. *Symp Zool Soc London* 43:153-182.

Gómez E, Irvine D, Aitken R. 1998. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationship with semen quality and sperm function. *Int J Androl* 21:81-94.

Gonzales H. 2008. Obtención y criopreservación de espermatozoides de alpacas. *Scientia* 10: 223-234.

Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz. 1993. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 53: 945-951.

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, México, pp 33-55.

Halliwell B. 1995. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem Soc Symp* 61:73-101.

Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11:73-88.

Heise A, Thompson P, Gerber D. 2011. Influence of seminal plasma on fresh and post-thaw parameters of stallion epididymal spermatozoa. *Anima Reprod Sci* 123:192-201.

Herrero MB, De Lamirande E, Gagnon C. 1999. Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro. *Biol Reprod* 61:575-581.

Hoffmann D, Weydert C, Lazartigues E, Kutschke W, Klenze M, Leach J. 2008. Chronic tempol prevents hypertension, proteinuria and poor feto-placental outcomes in BPH/% mouse model of preclampsia. *Hypertens* 51:1058-1065.

Hollinshead F, O'Brien J, Maxwell W, Evans G. 2004. Assessment of in vitro sperm characteristics after flow cytometric sorting of frozen-thawed bull spermatozoa. *Theriogenology* 62:958-968.

Holt WV. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53:47-58.

Hori T, Uehara Y, Kawakami E, Tsutsui T. 2009. Influence of the time between removal and cooling of the canine epididymis on post-thaw caudal epididymal sperm quality. *J Vet Med Sci* 7(16):811-815.

Hossain AM, Osuamkpe CO. 2007. Sole use of sucrose in human sperm cryopreservation. *Arch Androl* 53:99-103.

Hsu P, Hsu C, Guo Y. 1999. Hydrogen peroxide induces premature acrosome reaction in rat sperm and reduces their penetration of the zona pellucida. *Toxicology* 139:93-101.

Illera M. 1994. Reproducción de los animales domésticos. 1º Edición. España: AEDOS. 175p.

Irvine S. 1996. Glutathione as a treatment for male infertility. *Rev Reprod* 1:6-12.

Isachenko E, Isachenko V, Katkov I, Rahimi G, Schondorf T, Mallmann P, Dessole S, Nawroth F. 2004a. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum Reprod* 19(4):932-939.

Isachenko V, Isachenko E, Katkov I, Montag M, Dessole S, Nawroth F, van der Ven H. 2004b. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization. *Biol Reprod* 71:1167-1173.

Isachenko E, Isachenko V, Weiss J, Kreienberg R, Katkov I, Schulz M, Lulat A, Risopatrón J, Sánchez R. 2008. Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction* 136:167-173.

Janssen Y, Van-Houton B, Borm P, Mossuran B. 1993. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Laboratory Investigation* 69, 261-274.

Jeyendran R, Van der Ven M, Perez-Pelaez B, Crabo L, Zaneveld D. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fert.* 70(1):219-28.

Johnson A, Coutinho da Silva. 2008. Effects of recovery technique, freezing extender and antioxidants on motility parameters of cryopreserved stallion epididymal sperm. *Abstract/Theriogenology* 70:579-580.

Jones R, Mann T. 1977. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *J Reprod Fertil* 50:261-268.

Jones R, Mann T, Sherins R. 1979. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 31:531-537.

Kasimanickam R, Pelzer K, Kasimanickam V, Swecker W, Thatcher C. 2006. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. *Theriogenology* 65:1407-1421.

Kershaw-Young CM, Maxwell WM. 2011. The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. *Theriogenology* 76:1197-1206.

Kishioka S, Umeda M, Yamada A. 2002. Effect of oxygen on the electrochemical reduction of nitroxyl radical: Interpretation of the mechanism for a redox probe in biological systems. *Analytical Sci* 18:1379-1381.

Kumar S, Millar J, Watson P. 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* 46:246-253.

Lasso J, Noiles E, Álvarez J, Storey B. 1994. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *J Androl* 15:255-265.

- Leahy T, Marti J, Evans G, Maxwell WM. 2009. Seminal plasma proteins protect flow-sorted ram spermatozoa from freeze-thaw damage. *Reprod Fertil Dev* 21:571-578.
- Lewis S, Boyle P, McKinney K, Young I, Thompson W. 1995. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 64:868-870.
- Lewis S, Sterling E, Young I, Thompson W. 1997. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 67:142-147.
- Lindemann C, O'Brien J, Giblin F. 1988. An investigation of the effectiveness of certain antioxidants in preserving the motility of reactivated bull sperm models. *Biol Reprod* 38:114-120.
- Lukanov T, Lichev D, Konova E, Emin A, Ayvazova N, Velkov A, Roussev R. 2009. Flow cytometric measurement of sperm nuclear DNA fragmentation in infertile men with normal standard sperm parameters. *J Mens Health* 6:50-55.
- Luo J. 2001. Nitroxides-metal-independent SOD mimics. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Free radical and Radiation Biology Program. The University of Iowa.
- Mara L, Accardo C, Dattena M, Branca A, Casu S, Cappai P. 2002. Efecto de un antioxidante en la conservación de semen ovino. *Producción Ovina y Caprina*. N°XXVII, SEOC, 1059-1065. España.
- Mara L, Accard C, Pilichi S, Dattena M, Chessa F, Chessa B, Branca A, Cappai P. 2005. Benefits of TEMPOL on ram semen motility and in vitro fertility: a preliminary study. *Theriogenology* 63:2243-2253.
- Mara L, Dattena M, Pilichi S, Sanna D, Branca A, Cappai P. 2007. Effect of different diluents on goat semen fertility. *Anim Reprod Sci* 102:152-157.
- Martínez-Pastor F, Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Anel L, de Paz P. 2010. *Reprod Dom Anim* 45:67-78.

Maxwell WM, Watson PF. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci* 42:55-65.

Mazur, P. 1965. Causes of injury in frozen and thawed cells. *J Gen Physio* 47:347-369.

Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanism and implications. *Am J Physiol* 247:C125-142.

Mazzilli F, Rossi T, Sabatini L, Pulcinelli F, Rapone S, Dondero F, Gazzaniga P. 1995. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Eu Fertil* 26:145-148.

McCord J, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin. *J Biol Chem* 244:6049-6055.

McEvoy T, Kyle C, Slater D, Adam C, Bourke D. 1992. Collection, evaluation and cryopreservation of llama semen. *J Reprod Fert* 9:48 (Abstract).

Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology* 57:327-344.

Merino O, Sánchez R, Risopatrón J, Isachenko E, Katkov I, Figueroa E, Valdebenito I, Mallmann P, Isachenko V. 2011. Cryoprotectant-free vitrification of fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa: first report. *Andrología* 44:390-395.

Merino O, Risopatrón J, Sánchez R, Isachenko E, Figueroa E, Valdebenito I, Isachenko V. 2011. Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: Stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. *Anim Reprod Sci* 124:125-131.

Miller C, Amman, R. 1986. Effects of pulsatile injection of GnRH into 6-14 weeks old Holstein bulls. *J Anim Sci* 62, 1332-1339.

Mitchell J, Samuni A, Krishna M, Degraat W, Ahn M, Samuni U, Russo A. 1990. Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics. *Biochemistry* 29:2802-2807.

- Mocé E, Graham JK. 2008. In vitro evaluation of sperm quality. *Anim Reprod Sci* 105:104-118.
- Mogrovejo D. 1952. Estudio del semen de la alpaca. Tesis Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 39 p.
- Molinia F, Evans G, Maxwell W. 1994. In vitro evaluation of switterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod, Nutr Dev* 34:491-500.
- Morton K, Bathgate R, Evans G, Maxwell W. 2007. Cryopreservation of epididymal alpaca sperm: a comparison of citrate- Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reprod Fertil Dev* 19:792-796.
- 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.
- Muratori M, Forti G, Baldi E. 2008. Comparing flow cytometry and fluorescence microscopy for analyzing human sperm DNA fragmentation by TUNEL labeling. *Cytometry Part A* 73A:785-787.
- Naz R. 1996. Involvement of protein tyrosine phosphorylation of human sperm in capacitation/acrosome reaction and zona pellucida binding. *Front Biosci* 1:206-213.
- Novoa C, Leyva V. 1996. Reproducción en alpacas y llamas. Fondo Contravalor Perú-Suiza, CISA/IVITA, Fac Med Vet, Univ Nac Mayor de San Marcos (Serie Publ IVITA N°26). 30 p.
- O'Donnell L, Meachem S, Stanton P, McLachlan R. 2006. Endocrine regulation of spermatogenesis. In: Knobil and Neill's. *Physiology of reproduction*. By: Neill, J.D. 3°ed. Academic Press. St Louis USA.

O'Flaherty C, Beconi M, Beorlegui N. 1997. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia* 29:269-275.

O'Flaherty C, Beorlegui N, Beconi M. 1999. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology* 52:289-301.

O'Flaherty C, Beorlegui N, Beconi M. 2003. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. *Int J Androl* 26:109-114.

Ochsendorf F, Thiele J, Fuchs J. 1997. Antioxidants in germinal epithelium, spermatozoa and seminal plasma. En: Ochsendorf, F.R. and Fuchs, J (eds). *Oxidative stress in male infertility*, Michael Itschert, Gardez! Verlag, Germany, pp 85-128.

Ochsendorf F, Buhl R, Bästlein A, Beschmann H. 1998. Glutathione in spermatozoa and seminal plasma of infertile men. *Hum Reprod* 13:353-359.

Offer T, Mohsen M, Samuni A. 1998. An SOD-mimicry mechanism underlies the role of nitroxides in protecting papain from oxidative inactivation. *Free Radic Biol Med* 25:832-838.

Ollero M, Blanco T, Lopez-Pérez M, Cevrian-Pérez J. 1997. Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-distribution in an aqueous two-phase system. Effect of different cryoprotectants. *J Chromatogr B Biomed Appl* 17:157-164.

Pacheco J. 2008. Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. *REDVET* 9(4): 1-17.

Pacheco J. 2011. Efecto de la oxitocina y la GnRH sobre las características seminales y testosterona sérica en alpacas machos. Tesis Magister en Ganadería Andina. Puno, Perú: Universidad del Altiplano, 120 p.

Palomino H. 1962. Espermiograma y dimensiones de los espermatozoides de la alpaca. Tesis Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 20 p.

- Paricahua E. 2001. Evaluación del eyaculado sin la secreción de las glándulas anexas en alpaca. Tesis Médico Veterinario Zootecnista. Puno: Univ. Nac. del Altiplano. 26 p.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer M, First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 38:1171-1180.
- Pasco ME. 2001. Desarrollo histológico testicular y características biométricas en alpacas desde el nacimiento al año de edad. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nac Mayor San Marcos.
- Paulenz H, Söderquist L, Pérez-Pé R, Berg K. 2002. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology* 57:823-836.
- Peris SI, Bolideau JE, Dufour M, Bailey JL. 2007. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram semen. *Mol Reprod Dev* 74:878-892.
- Pérez LJ, Valcárcel A, De las Heras MA, Moses D, Baldassarre H. 1996. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology* 46:131-140.
- Quinn PJ, White IG, Cleland RW. 1969. Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J Reprod Fert* 18:209-220.
- Quinn PJ, Kerin JF, Warnes GM. 1985. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 44:493-498.
- Quintano J. 2002. Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (*Lama pacos*) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores. Tesis Médico Veterinario Zootecnista. Puno: Univ. Nac. del Altiplano. 42 p.
- Quispe F, Olarte U. 1988. Comparativo sexual y colección de semen de la alpaca en el periodo de un año. En: VI convención internacional de especialistas en camélidos. Bolivia.

- Ratto M, Wolter M, Gómez C, Berland M. 1999. Refrigeration of epididymal sperm from lama with three different extenders. En: II Congreso Mundial sobre camélidos. Cusco.
- 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.
- Rehan A, Johnson K, Kunkel R, Wiggins R. 1985. Role of oxygen radicals in phorbol myristate acetate-induced glomerular injury. *Kidney Int* 27:503-511.
- Rodríguez R. 2009. Efecto del plasma seminal en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. Tesis Magister Producción Animal. Lima: Univ Nac Mayor San Marcos. 72p.
- Rojas E. 1998. Determinación de la temperatura testicular y su influencia sobre la espermatogénesis en alpacas de la raza huacaya. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Lima: Univ. Nac. Altiplano.
- Ruiz L, Santiani A, Sandoval R, Huanca W, Coronado L, Alzamora C. 2007. Efecto de dos antioxidantes (tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. *Rev Inv Vet Perú* 18(2):99-106.
- Ryu S, Kohen R, Samuni A, Ornoy A. 2007. Nitroxide radicals protect cultured rat embryos and yolk sacs from diabetic-induced damage. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 79:604-611.
- Salamon S, Maxwell W. 1995. Frozen storage of ram semen: I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci* 37:185-249.
- Salamon S, Maxwell W. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62:77-111.
- Saleh R, Agarwal A. 2002. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 23:737-752.
- Sanchez A, Rubilar J, Gatica R. 2002. Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. *Arch Med Vet* 34(1):123-130.

- Sánchez R, Risopatrón J, Schulz M, Villegas J, Isachenko V, Kreinberg R, Isachenko E. 2011. Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function. *Andrologia* 43(4):233-241.
- Sanocka D, Miesel R, Jedrzejczak P, Kurpisz M. 1996. Oxidative stress and male infertility. *J Androl* 17:449-454.
- Sánchez-Partida L, Setchell B, Maxwell W. 1997. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 9:689-696.
- San Martín F. 1961. Fisiología de la reproducción de las alpacas. En: Symp. sobre problemas ganaderos. Lima.
- San Martín M, Copaira M, Zuñiga J, Rodríguez R, Bustinza G, Acosta L. 1968. Aspects of reproduction in the alpaca. *J Reprod Fert* 16:395-399.
- San Miguel C. 2001. Administración de testosterona en alpacas machos con adherencias pene-prepuciales. Tesis Médico Veterinario. Lima: Univ Nac Mayor de San Marcos. 36p.
- Santiani A. 2003. Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis Magister en Ciencias. Temuco, Chile: Univ. La Frontera. 95p.
- Santiani A, Huanca W, Sapana R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez R. 2005. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J. Androl.* 7:303-309.
- Santiani A, Ruiz L, Sandoval R, Evangelista S, Urviola M, Catacora N, Coronado L, Delgado A. 2007. Incremento de la tasa de no retorno en celo en ovejas utilizando un antioxidante análogo a superóxido dismutasa (Tempo) durante la criopreservación de semen. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 15 (Suppl 1):347.
- Shaw J, Jones G. 2003. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 9(6):583-605.
- Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eu J Biochem* 215:213-219.

Sorensen A. 1991. Evaluación de la aptitud reproductiva. En: Sorensen A, ed. Reproducción animal, principios básicos y prácticas. 1ª ed. McGraw-Hill, p 124-143.

Spitteler G. 1993. Review: on the chemistry of oxidative stress. *J Lipid Mediators* 7:77-82.

Spungin B, Margalit I, Breitbart H. 1995. Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *J Cell Sci* 18:2525-2535.

Stefanov R, Angelova M, Stefanova T, Subev M, Dolashka P, Voelter W, Zachariev Z. 2004. Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 103 improves spermatozoa functions in vitro. *Andrologia* 36:51-56.

Storey B. 1997. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 3:201-213.

Storey B, Álvarez J, Thompson K. 1998. Human sperm glutathione reductase activity in situ reveals limitation in the glutathione antioxidant defense system due to supply of NADPH. *Mol Reprod Dev* 49:400-407.

Sucapuca, V. 1991. Características físicas del semen de la alpaca obtenido por el método del preservativo. Tesis Médico Veterinario Zootecnista. Puno: Univ. Nac. del Altiplano. 36 p.

Sue-Hee K, Do-Hyeon 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, 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.

Sumar J, Leyva V. 1981. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (Lama pacos). En: IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Punta Arenas, Chile.

Shukla S, Jha R, Laloraya M, Kumar P. 2005. Identification of non-mitochondrial NADPH oxidase and the spatio-temporal organization of its components in mouse spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 331:476-83.

Sutovsky P, Manandhar G. 2006. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. In: De Jonge C. and Barratt C. *The Sperm Cell*. Cambridge University Press. Cambridge UK, pp 1-30.

Tselkas K, Saratsis P, Karagianidis A, 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.

Tulsiani D, Abou-Haila A, Loeser C, Pereira, B. 1998. Review: The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res* 240:151-164.

Toyonaga M, Sato Y, Morita M, Watanabe M, Oba H, Mizutani T, Hori T, Tsutsui T. 2010. The qualities of cryopreserved epididymal sperm collected from feline epididymes stored at low temperatures. *J Vet Med Sci* 72(6):777-780.

Upreti G, Jensen K, Oliver J, Duganzich D, Munday R, Smith J. 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 48:269-278.

Upreti G, Jensen K, Munday R, Duganzich D, Vishwanath R, Smith J. 1998. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as antioxidant. *Anim Reprod Sci* 51:275-287.

- Valcárcel A, De las Heras M, Pérez L, Moses D, Baldassarre B. 1997. Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. *Anim Reprod Sci* 45:299-309.
- Valdivia M, Suyo M, Manosalva I, Ruiz M, Romero S, Olazábal J. 2000. Cryopreservation and immunoreactivity of proacrosin/acrosin system in alpaca spermatozoa. *Biol Reprod* 62:103.
- Venereo G. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Militar* 31:126-133.
- Villegas J, Kehr K, Soto L, Henkel R, Miska W, Sánchez R. 2003. Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. *Andrologia* 35:1-6.
- Visconti PE, Kopf GS. 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 59:1-6.
- von Baer L, Hellemann C. 1999. Cryopreservation of llamas (*Lama glama*) semen. *Reprod Domest Anim* 34:95-96.
- von Kubicek J. 1974. Semen collection in alpaca with a urethral fistula (German). *Zeitschrift Tierzuchtung und Zuchtungsbiologie* 90:335-351.
- Wai-sum O, Chen H, Chow P. 2006. Male genital tract antioxidant enzymes – Their ability to preserve sperm DNA integrity. *Mol Cell Endocrinol* 250:80-83.
- Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ y Loughlin, K.R. 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 49, 921-925.
- Warren J, Johnson H, Ward P. 1987. Oxygen radicals in cell injury and cell death. *Pathol Immunopathol Res* 6:301-315.
- Watson P, Anderson W. 1983. Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *J Reprod Fertil* 69:229-235.

Watson P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61:481-492.

Wilcox C. 2010. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol Ther* 126:119-145.

Yanagimachi R. 1993. Mammalian Fertilization. En: Knobil E, Neil J, ed. *Physiology of Reproduction*. 1^a ed. NY Raven Press, pp. 189-317.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Consolidado de machos utilizados para colección de semen, intentos de colección realizados por macho, muestras totales obtenidas y muestras de buena calidad.

	Machos utilizados (n)	Intentos por macho (n)	Total intentos colección de semen (n)	Eyaculados obtenidos	Eyaculados de buena calidad
Tratamientos con GnRH	16	4	64	56.2% (36/64)	66.7% (24/36)
Colecciones adicionales	10	1.4	14	100.0% (14/14)	42.8% (6/14)
TOTAL	16	4.87	78	64.1% (50/78)	60.0% (30/50)*

* Muestras utilizadas para criopreservación y/o vitrificación en experimentos 1 y 3.

Anexo 2. Distribución de muestras seminales para ser utilizadas en los experimentos 1 y 3 de acuerdo al macho de procedencia.

Macho id	Muestras de buena calidad		Muestras de mala calidad		Total
	Congeladas	Vitrificadas	Plasma	Eliminadas	
1	1		1	3	5
2				2	2
3	3	1		1	4
4	4			1	5
5					0
6					0
7	5	1			5
8					0
9	4	1	1	1	6
10	4			1	5
11			1	1	2
12	2		2		4
13	2	1	1	2	5
14				2	2
15	5	1			5
16					0
Total	30	5	6	14	50

* Las 5 muestras vitrificadas también fueron utilizadas para la criopreservación

Anexo 3. Características seminales de las muestras utilizadas en los experimentos 1 y 3.

N°	Macho	Vol (mL)	Millones esp/mL	Mot. (%)
1	9	2	33	32.5
2	10	0.6	16	20
3	7	0.5	50	45
4	4	0.3	9	65
5	15		75	30
6	13	0.9	170	65
7	9	2.3	29.5	67.5
8	10	0.7	113	40
9	7	1.5	143	55
10	12	1.1	40	22.5
11	15	1.1	118	50
12	9	3.5	113	65
13	4	1.4	40	55
14	10	0.5	25	40
15	3	1.1	187	40
16	4	1.4	26	62.5
17	7	1.4	212	50
18	1	0.5	33	50
19	12	2	134	45
20	15	0.9	101	50
21	9	3.5	80	80
22	10	3.2	15	65
23	3	1.2	125	47.5
24	4	0.9	25	80
25	7	1.2	320	40
26	15	1.3	70	70
27	3	1.6	99	50
28	7	2	52	60
29	13	2.2	14	45
30	15	1.1	58	62.5
Promedio		1.54	93.70	54.30
D.S.		0.86	71.08	15.12

Anexo 4. Análisis estadístico del Experimento 1

Resumen del Manova para el Experimento 1					
Efecto	Valor	F	Gl de la hipótesis	Gl del error	Significación
Repeticiones (Muestras)	0.46	2.40	16.00	128.00	0.00
Azúcares	0.045	0.739	4.000	128.000	0.567
Concentración	0.258	4.742	4.000	128.000	0.001
Azúcares*Concentración	0.182	1.599	8.000	128.000	0.131

Resumen de ANOVA para VIABILIDAD/INTEGRIDAD ACROSOMAL				
Fuente	gl	Media cuadrática	F	Significación
Repeticiones (muestras)	8	0.028	3.797	0.001
Tratamientos	8			
Azúcares	2	0.008	1.040	0.359
Concentraciones	2	0.042	5.688	0.005
Azúcares*Concentraciones	4	0.012	1.665	0.169
Error	64	0.007		
Total	81			
Total corregida	80			

Resumen de ANOVA para MOTILIDAD				
Fuente	gl	Media cuadrática	F	Significación
Repeticiones (muestras)	8	0.012	5.193	0.000
Tratamientos	8			
Azúcares	2	0.000	0.146	0.865
Concentraciones	2	0.015	6.225	0.003
Azúcares*Concentraciones	4	0.001	0.292	0.882
Error	64	0.002		
Total	81			
Total corregida	80			

Comparaciones múltiples - VIABILIDAD/INTEGRIDAD ACR

DHS de Tukey

(I) CONC	(J) CONC	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación
0.25	0.50	0.075	0.023	0.006
	1.00	0.060	0.023	0.035
0.50	0.25	-0.075	0.023	0.006
	1.00	-0.015	0.023	0.798
1.00	0.25	-0.060	0.023	0.035
	0.50	0.015	0.023	0.798



Anexo 5. Análisis estadístico del Experimento 2

Resumen del MANOVA para el Experimento 2					
Efecto	Valor	F	Gl de la hipótesis	Gl del error	Significación
Repeticiones (muestras)	0.808	0.369	15.000	15.000	0.969
Tratamientos	0.613	1.583(a)	3.000	3.000	0.358

Resumen de ANOVA para MOTILIDAD				
Fuente	gl	Media cuadrática	F	Significación
Repeticiones (muestras)	5	0.003	0.585	0.715
Tratamientos	1	0.037	6.720	0.049
Error	5	0.005		
Total	12			
Total corregida	11			

Resumen de ANOVA para INTEGRIDAD DE MEMBRANA				
Fuente	gl	Media cuadrática	F	Significación
Repeticiones (muestras)	5	0.003	0.409	0.825
Tratamientos	1	0.001	0.216	0.661
Error	5	0.006		
Total	12			
Total corregida	11			

Resumen de ANOVA para VIABILIDAD / INTEGRIDAD ACROSOMAL				
Fuente	gl	Media cuadrática	F	Significación
Repeticiones (muestras)	5	0.002	0.211	0.943
Tratamientos	1	0.002	0.248	0.639
Error	5	0.008		
Total	12			
Total corregida	11			

Anexo 6. Análisis estadístico del Experimento 3

Resumen del MANOVA - Experimento 3					
Efecto	Valor	F	Gl de la hipótesis	Gl del error	Significación
Macho	1.117	2.269	28.000	164.000	0.001
Motilidad inicial	0.251	3.179	4.000	38.000	0.024
HOS inicial	0.048	0.474	4.000	38.000	0.754
DT inicial	0.123	1.337	4.000	38.000	0.274

Resumen del ANOVA para MOTILIDAD				
Fuente	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	2	0.113	32.635	0.000
Macho	7	0.012	3.573	0.004
Motilidad inicial	1	0.015	4.454	0.041
HOS inicial	1	0.004	1.141	0.292
DT inicial	1	0.003	0.972	0.330
Error	41	0.003		
Total	54			
Total corregida	53			

Comparaciones por pares - MOTILIDAD					
(I) TTO	(J) TTO	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	% para la diferencia(a)	
				Límite superior	Límite inferior
CON	TEMPO	-0.120	0.020	-0.159	-0.080
	TEMPOL	-0.150	0.020	-0.189	-0.110
TEMPO	CON	0.120	0.020	0.080	0.159
	TEMPOL	-0.030	0.020	-0.070	0.010
TEMPOL	CON	0.150	0.020	0.110	0.189
	TEMPO	0.030	0.020	-0.010	0.070

Resumen de ANOVA para INTEGRIDAD FUNCIONAL DE MEMBRANA				
Fuente	gl	Media cuadrática	F	Significación
TRATAMIENTO	2	0.015	11.412	0.000
Macho	7	0.009	6.823	0.000
Motilidad inicial	1	0.003	1.950	0.170
HOS inicial	1	0.000	0.323	0.573
DT inicial	1	0.000	0.234	0.631
Error	41	0.001		
Total	54			
Total corregida	53			

Comparaciones por pares - INTEGRIDAD FUNCIONAL DE MEMBRANA				
(I) TTO	(J) TTO	Diferencia entre medias	Error típ.	Significación(a)
CON	TEMPO	-0.058	0.012	0.000
	TEMPOL	-0.038	0.012	0.004
TEMPO	CON	0.058	0.012	0.000
	TEMPOL	0.020	0.012	0.111
TEMPOL	CON	0.038	0.012	0.004
	TEMPO	-0.020	0.012	0.111

Resumen del ANOVA para VIABILIDAD/INTEGRIDAD ACROSOMAL				
Fuente	gl	Media cuadrática	F	Significación
TRATAMIENTO	2	0.006	1.464	0.243
Macho	7	0.003	0.786	0.603
Motilidad inicial	1	0.007	1.597	0.213
HOS inicial	1	0.004	1.059	0.309
DT inicial	1	0.008	1.996	0.165
Error	41	0.004		
Total	54			
Total corregida	53			

Resumen del ANOVA para ADN NO FRAGMENTADO					
Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
TRATAMIENTO	0.217	2	0.109	23.825	0.000
Macho	0.005	7	0.001	0.160	0.992
Motilidad inicial	0.022	1	0.022	4.841	0.033
HOS inicial	0.000	1	0.000	0.068	0.795
DT inicial	0.001	1	0.001	0.268	0.608
Error	0.187	41	0.005		
Total	45.382	54			
Total corregida	0.458	53			

Comparaciones por pares - ADN NO FRAGMENTADO				
(I) TTO	(J) TTO	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación(a)
CON	TEMPO	-0.085	0.022	0.000
	TEMPOL	-0.155	0.022	0.000
TEMPO	CON	0.085	0.022	0.000
	TEMPOL	-0.070	0.022	0.004
TEMPOL	CON	0.155	0.022	0.000
	TEMPO	0.070	0.022	0.004

Anexo 7. Correlación en porcentaje de ADN espermático no fragmentado (TUNEL-) y motilidad espermática.

Number of XY Pairs	12
Pearson r	0.5873
95% confidence interval	0.2004 to 0.8685
P value (two-tailed)	0.0447
P value summary	*
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0.3449

Anexo 8. Correlación en porcentaje de fragmentación de ADN espermático no fragmentado (TUNEL-) e integridad funcional de membrana (HOS+).

Number of XY Pairs	9
Pearson r	0.1392
95% confidence interval	-0.5785 to 0.7354
P value (two-tailed)	0.7209
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0.01939

Anexo 9. Correlación en porcentaje de ADN espermático no fragmentado (TUNEL-) y vitalidad/integridad acrosomal.

Number of XY Pairs	13
Pearson r	-0.1829
95% confidence interval	-0.6668 to 0.4095
P value (two-tailed)	0.5498
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0.03345