

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

### **Efecto del Resveratrol sobre la congelación y vitrificación de espermatozoides epididimarios de perro**

Trabajo de titulación previo a la  
obtención del título de Médico  
Veterinario Zootecnista


#### **Autores:**

Karla Estefanía Carreño Aguilar

José Luis Sañay Sañay

#### **Director:**

Diego Andrés Galarza Lucero

ORCID:  0000-0002-0266-5431

**Cuenca, Ecuador**

2024-01-17

## Resumen

Esta investigación evaluó el efecto del Resveratrol (RES) en la congelación convencional (C) y vitrificación (V) de espermatozoides epididimarios caninos sobre la criosupervivencia espermática. Veinte agrupaciones (pools) de 60 muestras espermáticas epididimarios de 30 perros orquiectomizados fueron usados en esta investigación. Cada pool fue diluido con TCG-YH (6% yema de huevo) y entonces 4 tratamientos fueron conformados según el tipo de criopreservación y la adición de 100  $\mu\text{M}$  de RES: 1) C-RES, 2) C-Co[control], 3) V-RES, y 4) V-Co[control]. La congelación se realizó exponiendo pajuelas (0,25 ml) con las muestras espermáticas (5% glicerol) a vapores de nitrógeno líquido ( $\text{NL}_2$ ) estático. La vitrificación se hizo dejando caer gotas de 30  $\mu\text{L}$  de muestras (con 250 mM sacarosa) directamente al  $\text{NL}_2$ . El tratamiento C-RES incrementó ( $P < 0,05$ ) la motilidad total, velocidad curvilínea (VCL) rápida, la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), la integridad de membranas plasmática y acrosomal, y redujo el estrés oxidativo. No obstante, el tratamiento V-RES no provocó ningún efecto benéfico ( $P > 0,05$ ) después del calentamiento. Los tratamientos de vitrificación incrementaron ( $P < 0,05$ ) la fragmentación de ADN comparados con los tratamientos de congelación. El tratamiento C-RES incrementó ( $P < 0,05$ ) las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides después de la congelación. En conclusión, el RES provocó un efecto beneficioso y estimulador de la locomoción, protector de las membranas y ejerció un efecto antioxidante, durante y después del proceso de congelación de espermatozoides epididimarios caninos; sin embargo, su efecto se vio limitado en la vitrificación.

*Palabras clave:* resveratrol, congelación, criopreservación, espermatozoides

## Abstract

This research assessed the effect of Resveratrol (RES) on the conventional slow freezing (CS) and vitrification (V) of canine epididymal sperm on cryosurvival. Twenty sperm pooled samples from 60 epididymal from 30 orchiectomized dogs were used in this study. Each pool was diluted with TCG-YH (6% egg yolk), and then 4 treatments were conformed based on the type of cryopreservation and the addition of 100  $\mu$ M RES: 1) CS-RES, 2) CS-Co[control], 3) V-RES, and 4) V-Co[control]. Freezing was performed by exposing 0.25 ml straws with sperm samples (with 5% glycerol) to static liquid nitrogen ( $LN_2$ ) vapors. Vitrification was done by directly dropping 30- $\mu$ L drops of samples (with 250 mM sucrose) into  $LN_2$ . The CS-RES treatment increased ( $P<0.05$ ) post-thaw values of total motility, rapid curvilinear velocity (VCL), and the amplitude of lateral head displacement (ALH), and integrity of plasma and acrosome membranes, and reduced oxidative stress. However, the V-RES treatment did not induce any beneficial effect ( $P>0.05$ ) after warming. Vitrification treatments increased ( $P<0.05$ ) DNA fragmentation compared to freezing treatments. The CS-RES treatment increased ( $P<0.05$ ) the dimensions of sperm head after freezing. In conclusion, RES had a beneficial and enhanced effect on motility, membrane protection, and exerted an antioxidant effect during and after the freezing of canine epididymal sperm; however, its effect was limited in vitrification

*Keywords:* resveratrol, freezing, cryopreservation, sperm

## Índice de contenido

1. Introducción	1
Objetivo general	3
Objetivos específicos	3
2. Revisión de literatura	4
2.1. Características del semen en la especie canina	4
2.1.1. Características macroscópicas	4
2.1.1.1. Volumen	4
2.1.1.2. Color	4
2.1.1.3. pH.	5
2.1.2. Características microscópicas	5
2.1.2.1. Motilidad	5
2.1.2.2. Concentración	6
2.1.2.3. Evaluación subjetiva y objetiva	7
2.1.2.4. Sistema CASA	8
2.1.2.5. Morfología	9
2.1.2.5.1. Tinciones	10
2.1.2.6. Integridad (membranas, acrosoma y membrana plasmática)	12
a) Integridad de las membranas celulares	13
b) Integridad del acrosoma	13
c) Integridad de la membrana plasmática	13
2.2. Espermatozoides epididimarios	13
2.3. Recuperación de semen post-mortem	14
2.3.1. Flujo retrógrado	14
2.3.2. Slides - Swim out	14
2.4. Criopreservación	15
2.4.1. Colección de esperma	15
2.4.2. Evaluación del esperma	15
2.4.3. Preparación del esperma	15

2.4.4. Congelación	15
2.5. Criolesión	16
2.5.1. Estrés oxidativo	16
2.5.2. Estrés osmótico	17
2.6. Antioxidantes	17
1) Reducción del daño oxidativo:	18
2) Mejora de la motilidad y la capacidad de fecundación	18
3) Mantenimiento de la integridad del ADN	18
2.6.1. Resveratrol	19
2.6.2. Efectos del Resveratrol en la criopreservación de espermatozoides caninos	19
2.6.3. Estructura y función	20
2.7. Fluorescencia	20
2.7.1. Naranja de acridina	21
2.7.1.1. Estructura	21
3. materiales y métodos	23
3.1. Materiales	23
3.2. Metodología	24
3.2.1. Ubicación	24
3.2.2. Diseño experimental y unidades experimentales	24
3.2.3. Medios	25
3.2.4. Recuperación espermática	26
3.2.5. Criopreservación de tratamientos	27
3.2.5.1. Congelación convencional (C)	27
3.2.6. Análisis espermático	28
3.2.6.1. Evaluación de la cinemática espermática	28
3.2.6.2. Integridad simultánea de membranas plasmática y acrosomal	29
3.2.6.3. Estrés oxidativo	29
3.2.6.4. Evaluación de la estabilidad de la cromatina	30

3.2.6.5. Evaluación de las dimensiones morfológicas de la cabeza de los espermatozoides criopreservados	30
3.2.7. Análisis estadístico	31
4. Resultados	32
4.1. Cinemática espermática	32
4.2. Integridad de membranas	35
4.3. Integridad de ADN y estrés oxidativo	37
4.4. Morfometría de los espermatozoides	38
5. Discusión	40
6. Conclusión	45
7. Referencias	46
8. Anexos	60

## Índice de figuras

Figura 1. Ubicación geográfica Granja Iruquis de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. Tomado de: Google Earth (2020). 24

Figura 2. Motilidad total (MT) y progresiva (MP) de espermatozoides epididimarios caninos frescos, congelados (C-RES y C-Co [control]) y vitrificados (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol (RES). Asteriscos (\*\*) demuestran interacción significativa ( $P < 0,001$ ) entre “*tipo de espermatozoides* (frescos y criopreservados) y *tratamientos con RES*”. Letras diferentes entre cada tratamiento y motilidad expresan diferencias significativas (a – b – c – d,  $P < 0,05$ ). 31

Figura 3. Velocidad curvilínea (VCL) y velocidad curvilínea de espermatozoides con velocidad rápida (VCL-RAP) de espermatozoides epididimarios caninos frescos, congelados (C-RES y C-Co [control]) y vitrificados (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol (RES). Asteriscos (\*\*) demuestran interacción significativa ( $P < 0,001$ ) entre “*tipo de espermatozoides* (frescos y criopreservados) y *tratamientos con RES*”. Letras diferentes entre cada tratamiento y velocidad expresan diferencias significativas (a – b – c,  $P < 0,05$ ). 32

Figura 4. Velocidad rectilínea (VSL) y velocidad rectilínea rápidamente progresivos (VSL-RAP) de espermatozoides epididimarios caninos frescos, congelados (C-RES y C-Co [control]) y vitrificados (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol (RES). Símbolos ( $\emptyset$ ) demuestran una reducción significativa ( $P < 0,01$ ) de sus valores después de la criopreservación en cada tratamiento 33

Figura 5. Parámetros de relación de progresión: rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de espermatozoides epididimarios caninos frescos, congelados (C-RES y C-Co [control]) y vitrificados (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol (RES). Asteriscos (\*\*) demuestran una reducción significativa ( $P < 0,01$ ) de sus valores después de la criopreservación en cada tratamiento. 33

Figura 6. Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de espermatozoides epididimarios caninos frescos, congelados (C-RES y C-Co [control]) y vitrificados (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol (RES). Asteriscos (\*\*) demuestran interacción significativa ( $P < 0,001$ ) entre “*tipo de espermatozoides* (frescos y criopreservados) y *tratamientos con RES*”. Letras diferentes entre cada tratamiento y parámetro expresan diferencias significativas (a – b – c – d – e,  $P < 0,05$ ). 34

Figura 7. Integridad total de la membrana plasmática (IP) y acrosomal (IA) de espermatozoides epididimarios caninos frescos, congelados (C-RES y C-Co [control]) y vitrificados (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol (RES). Letras diferentes entre cada

tratamiento y parámetro expresan diferencias significativas (a – b – c – d,  $P < 0,05$ ; a – c, a – c, b – d,  $P < 0,001$ ). 36

Figura 8. Porcentajes de estrés oxidativo y fragmentación de ADN de espermatozoides epididimarios caninos frescos, congelados (C-RES y C-Co [control]) y vitrificados (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol (RES). Letras diferentes entre cada tratamiento y parámetro expresan diferencias significativas (a – b – c,  $P < 0,05$ ; a – c,  $P < 0,001$ ). 37



## Índice de tablas

Tabla 1. Criterios para la evaluación del semen normal	8
Tabla 2. TCG-EY	25
Tabla 3. Medio de fluorescencia	25
Tabla 4. PI	26
Tabla 5. FITC/PNA	26
Tabla 6. Estado de las membranas espermáticas en diferentes categorías de fluorescencia de acuerdo a la prueba de doble tinción fluorescente IP / PNA-FITC de espermatozoides epididimarios de perro diluidos con Resveratrol (RES) y congelados (C-RES y C-Co <i>[control]</i> ) y vitrificados (V-RES y V-Co <i>[control]</i> )	35
Tabla 7. Dimensiones morfométricas de la cabeza y pieza intermedia de espermatozoides epididimarios de perro diluidos con Resveratrol (RES) y congelados (C-RES y C-Co <i>[control]</i> ) y vitrificados (V-RES y V-Co <i>[control]</i> )	38

## Dedicatoria

Quiero dedicar esta tesis a mis padres, Carlos Carreño y Mónica Aguilar que, a pesar de la distancia, los llevo en mi corazón. A mis hermanas Cinthya, Alexandra y Wendy quienes compartimos desde niñas y juntas aprendimos a salir adelante; a mis peluditos mimados Khalessi, Minerva y Sirius, gracias por su compañía que llena de alegría mi ser.

Al Dr. MSc. Pablo Brito, Sra. Elena Chicaiza y especialmente a Od. Esp. David Brito, gracias por su confianza y apoyo incondicional durante los momentos más difíciles. A mi amigo José Sañay, por ayudarme a cumplir el objetivo más anhelado de mi vida. A mis amigos y ahora médicos veterinarios que cooperaron conmigo en el transcurso de la carrera universitaria.

A todos los animalitos que fueron parte de mi formación como médico veterinario y zootecnista.

“La grandeza de una nación y su progreso moral pueden ser juzgados por la manera en que se trata a sus animales” Gandhi.

***Karla Carreño Aguilar***

## Dedicatoria

En primer lugar, a Dios, a mis padres Lorena y Moisés que me dieron la vida y se aseguraron que nunca nos falte nada en el hogar, a mis hermanos Jonathan y Paul que han sido un pilar y motivación personal para que lograra este éxito, a mi tío Isael que desde pequeño me inculcó la pasión al estudio, a mi amiga, compañera y ahora colega Karla, sin ti no hubiera sido posible este logro académico, a mi esposa Jhuleidy que me apoyó en los buenos y malos momentos durante mi formación profesional con su paciencia y amor, a mi padre de crianza Rodrigo que supo inculcarme los valores necesarios para ser un buen profesional, pero sobre todo, un buen hombre; por último a mi ángel que me cuida desde el cielo, Magdalena de Jesús Ojeda que me hizo la persona que soy hoy, espero que me esté viendo desde el cielo y animándome como lo hizo durante toda mi vida, hubiera querido que esté presente y celebrar juntos, pero desde donde esté, sé que lo está celebrando mi viejita linda.

Un abrazo al cielo.

***José Sañay Sañay***

## Agradecimientos

A nuestra querida institución educativa, que nos abrió sus puertas y nos brindó todas las herramientas necesarias para ser profesionales de bien, a nuestros profesores, que supieron ser guías hasta el último día de nuestra amada carrera, en especial al Dr. Ph.D Andrés Galarza y al Dr. MSc. Mauricio Dumas en conjunto con el personal del laboratorio de Biotecnología, sin ellos no hubiera sido posible este logro, a la fundación ARCA y a la clínica veterinaria Mi Mejor Amigo por su apoyo en el desarrollo de nuestra tesis, a nuestros compañeros y ahora colegas, a nuestras familias que nos supieron apoyar en todo momento, y sobre todo a Dios que nos dio la sabiduría para afrontar todos los problemas que se nos pusieron en frente.

*“Hasta que no hayas amado a un animal, una parte de tu alma permanecerá dormida” Anatole France.*

**Karla Carreño Aguilar**  
**José Sañay Sañay**

## Abreviaturas utilizadas

**AO:** naranja de acridina

**RES:** resveratrol

**ROS:** especies de oxígeno reactivo

**MT:** motilidad total

**VSL:** velocidad rectilínea

**VCL:** velocidad curvilínea

**VCL-RAP:** velocidad curvilínea de espermatozoides con velocidad rápida

**VSL-RAP:** velocidad rectilínea de espermatozoides con velocidad rápida

**VAP:** velocidad promedio del trayecto

**LIN:** linealidad

**STR:** rectitud

**WOB:** oscilación

**ALH:** amplitud del movimiento lateral de la cabeza

**BCF:** frecuencia de batido de flagelo

**PUFA:** ácidos grasos poliinsaturados

**CASA:** Computer-Assisted Sperm Analysis

**C-RES:** congelación con resveratrol

**V-RES:** vitrificación con resveratrol

**C-RES:** congelación con resveratrol

**C-Co:** congelación control

**V-RES:** vitrificación con resveratrol

**V-Co:** vitrificación control

## Introducción

La recuperación y criopreservación de espermatozoides epididimarios de perros genéticamente importantes (o superiores) o de cánidos salvajes que han muerto inesperadamente, permite la aplicación de técnicas de reproducción asistida (TRA) (Hewitt et al., 2001). En los años recientes, se ha incrementado el desarrollo de TRA para mejorar la fertilidad en los criaderos caninos. En consecuencia, esto ha estimulado a los criadores de canes el desarrollo y uso de nuevos métodos de criopreservación de espermatozoides caninos para su uso en la inseminación artificial (IA) (Ligocka et al., 2023), así como la congelación convencional lenta usando dos rampas de congelación o la vitrificación cinética (Galarza et al., 2021). La técnica de la criopreservación del semen evita la transmisión de enfermedades venéreas y permite la reproducción de individuos aislados geográficamente o de animales que no se pueden reproducir por monta natural (Arango et al., 2020). Además, hace posible el uso de pajuelas provenientes de reproductores inclusive después de que hayan muerto, adicionalmente, este proceso favorece la optimización del uso del semen de buena calidad ya que con el mismo eyaculado pueden inseminar a varias hembras. (Gobello & Olivera, 2005; Stornelli et al., 2001). De hecho, un reporte reciente determinó que los espermatozoides del epidídimo muestran una mayor crioresistencia al proceso de vitrificación que los espermatozoides eyaculados en perros (Cerdeira Lozano et al., 2023).

Durante la criopreservación de espermatozoides caninos, se producen cambios ultraestructurales, bioquímicos y funcionales, generados principalmente por estrés osmótico (aumento de tensiones físicas) debido a la deshidratación y la rehidratación celular que experimentan las células durante el proceso de congelación y descongelación (Baumber et al., 2003). Estos cambios adversos provocan daños en las membranas espermáticas, alteración de la motilidad y fragmentación del ADN (Angrimani et al., 2014; Nichi et al., 2007). Otro factor importante que cambia a las células criopreservadas es el estrés oxidativo causado por el choque térmico, sobreproducción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y ataque de radicales libres (Ej.  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ ,  $O_2^-$ ) que disminuyen, principalmente, el potencial de membrana mitocondrial (Wakamatsu et al., 2013). Los radicales libres y las ROS se unen a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, *por sus siglas en inglés*) de la membrana plasmática de los espermatozoides caninos, lo que genera una peroxidación lipídica (LPO). Todos estos factores son perjudiciales y disminuyen la motilidad, velocidad, integridad de membranas y capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados. Para evitar estos daños, es indispensable que los medios de congelación y/o vitrificación incluyan sustancias antioxidantes para mitigar

el estrés oxidativo (Kefer et al., 2009), a más de los agentes crioprotectores penetrantes (glicerol, amidas, entre otros y no penetrantes (Ej. Sacarosa, trehalosa, entre otros).

Los aditivos/antioxidantes son sustancias químicas que ayudan a reducir los efectos indeseables causados por las ROS y ataque de radicales libres (Kefer et al., 2009) producidos durante la criopreservación de los espermatozoides caninos (Michael et al., 2007). Diversos antioxidantes enzimáticos como el *3,4-dihidroxifenilglicol*, *glutación peroxidasa* (GPx), *glutación reductasa* (GSH), *superóxido dismutasa* (SOD) y *catalasa* (CAT), han sido usados previamente en la criopreservación. Sus principales efectos han demostrado proteger la membrana plasmática en contra de la LPO, mejorando la motilidad posterior a la descongelación (Aitken & Roman, 2008). Sin embargo, los porcentajes de criosupervivencia espermática siguen siendo menores.

El Resveratrol (RES) es un antioxidante, que actúa eliminando los radicales libres (Ej. OH-) y cationes divalentes quelantes (Stojanović et al., 2001). Se ha determinado previamente que la adición de 200  $\mu\text{M}$  al medio de congelación, conservó la calidad del espermática de caninos (Bang et al., 2021). Su actividad biológica depende del número y posición de los grupos hidroxilo (OH-) que debido a su composición química permite al RES eliminar radicales libres, inhibir la oxidación lipídica, reducir la formación de hidroperóxidos e incrementar la actividad catalítica de enzimas (Ej. GPx, GSH, CAT y SOD) (Kuršvietienė et al., 2016). Al incrementar las actividades del GPx y SOD (Zhang et al., 2022), se reduce el estrés oxidativo ya que se disminuyen los niveles del ROS. Para nuestro mejor conocimiento, no existen reportes del uso de RES en la suplementación del medio de vitrificación, por lo que sería de interés evaluar el efecto antioxidante del RES durante la vitrificación en el cual se desencadenan una gran cantidad de radicales libre.

## Objetivos

### Objetivo general

Evaluar el efecto del Resveratrol en la congelación y vitrificación de espermatozoides epididimarios caninos (*Canis lupus familiaris*) sobre la criosupervivencia espermática.

### Objetivos específicos

- Evaluar las características cinemáticas, integridad de la membrana plasmática y acrosomal y el estrés oxidativo de los espermatozoides epididimarios caninos congelados y vitrificados con Resveratrol.
- Evaluar las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides epididimarios frescos, congelados y vitrificados con Resveratrol.



## 1. Revisión de literatura

### 1.1. Características del semen en la especie canina

El semen de perro presenta características importantes que son analizadas para valorar la calidad espermática y determinar la tasa de fertilidad. La evaluación del semen debe realizarse antes de la inseminación artificial o congelación (Feldman & Nelson, 2004).

Se debe manejar el semen con cuidado para evitar la muerte o cambios artificiales en la morfología celular o la motilidad y debe examinarse inmediatamente después de su obtención; cualquier retraso puede aumentar el número de espermatozoides muertos (Feldman & Nelson, 2004). Cada característica por sí sola no representa un parámetro preciso, por esta razón se analizan en conjunto y las características que parecen correlacionan más estrechamente con la fertilidad son: número de espermatozoides por volumen de semen, porcentaje de motilidad progresiva y morfología espermática (Andrade, 2005; Feldman & Nelson, 2004).

#### 1.1.1. Características macroscópicas

##### 1.1.1.1. Volumen

El volumen es muy variable y depende de la edad del perro, el tamaño, la frecuencia del servicio y la cantidad de líquido prostático recolectado. Normalmente oscila entre 1 y 40 ml por eyaculado, la fracción rica en espermatozoides proviene desde el epidídimo y varía entre 0,5 a 12 ml. El volumen no se correlaciona con la fertilidad a menos que el animal no eyacule (Feldman & Nelson, 2004; Páramo & Blacázar, 2005).

##### 1.1.1.2. Color

Es normalmente de blanco a opalescente y opaco. La intensidad de la opacidad depende de la concentración de espermatozoides. El semen claro e incoloro sugiere azoospermia. Se puede ver un tinte amarillo con contaminación de orina o pus. Un tinte verde, con o sin grumos, coágulos o escamas, sugiere pus y una infección en el tracto reproductivo (Feldman & Nelson, 2004). El tinte rojo sugiere sangre, que generalmente se origina en la glándula prostática o en un pene traumatizado e hinchado. La hemorragia no implica necesariamente patología. Algunos machos que experimentan una anticipación sexual prolongada antes de que se les permita copular pueden experimentar una hemorragia transitoria en el semen de la glándula prostática. A

menudo se puede obtener semen normal si estos perros se aíslan de la perra en celo durante 12 a 24 horas y luego se recolectan. Sin embargo, la recurrencia de cualquier anomalía es preocupante y sugiere la necesidad de investigar ese problema (Feldman & Nelson, 2004).

En general, cualquier color anormal debe alertar al médico de que puede haber un problema y se debe considerar una evaluación cuidadosa del tracto reproductivo. Cualquier agente (es decir, orina, pus, sangre) que produzca decoloración puede afectar la concentración, motilidad y viabilidad de los espermatozoides (Feldman & Nelson, 2004).

### **1.1.1.3. pH.**

El pH normal del semen canino oscila entre 6,3 y 6,7 y depende, en parte, de la cantidad de líquido prostático recogido. El fluido prostático tiene un rango de pH de 6,0 a 7,4, con una media normal de 6,8 (Páramo & Blacázar, 2005; Sánchez R. & Bravo V., 2014). Se cree que la naturaleza alcalina del fluido prostático aumenta la motilidad de los espermatozoides y ayuda a neutralizar el ambiente ácido en la cúpula vaginal durante la cópula (Sánchez R. & Bravo V., 2014). Un aumento en el pH del semen se asocia con eyaculación incompleta o inflamación de los testículos, el epidídimo o la glándula prostática (Feldman & Nelson, 2004).

## **1.1.2. Características microscópicas**

### **1.1.2.1. Motilidad**

La motilidad de los espermatozoides individuales debe evaluarse lo más rápido posible después de obtener una muestra de semen. Debe colocarse una gota de semen en un portaobjetos limpio y examinarse microscópicamente de  $\times 200$  a  $\times 400$  para determinar el movimiento progresivo hacia adelante de los espermatozoides individuales y la presencia de aglutinación de espermatozoides. Los espermatozoides caninos son resistentes al choque por frío, por lo que no es necesario calentar el portaobjetos (Hernández & Mejía, 2007). Se ha demostrado que el porcentaje de motilidad progresiva de los espermatozoides disminuye rápidamente en muestras mantenidas a temperatura ambiente que en aquellas mantenidas a temperatura corporal (Allen, 1993). La motilidad disminuye a medida que la luz del microscopio calienta la gota de semen. La evaluación de los espermatozoides con aumentos más bajos puede dar la falsa impresión de motilidad hacia adelante, cuando en realidad hay un movimiento anómalo de lado a lado

sin motilidad hacia adelante. La evaluación de la motilidad hacia delante progresiva puede resultar difícil en muestras muy concentradas (Allen, 1993). Las muestras altamente concentradas se pueden diluir con líquido prostático autólogo, solución salina tamponada con fosfato, solución de citrato de sodio al 2,9% o un diluyente de semen (Hernández & Mejía, 2007).

La motilidad de los espermatozoides se analiza subjetivamente mediante evaluación visual; se evalúa el porcentaje de espermatozoides móviles y el carácter de la motilidad. La motilidad hacia adelante progresiva se considera un movimiento normal para los espermatozoides, se cree que refleja la viabilidad y la capacidad para fertilizar el óvulo (Allen, 1993). Una muestra de semen normal debe tener más del 70% de los espermatozoides que muestren una vigorosa motilidad hacia adelante. Los espermatozoides individuales deben evaluarse cuidadosamente para determinar el tipo de movimiento. Los espermatozoides que se mueven en pequeños círculos o que se mueven de lado a lado sin avanzar hacia delante no son normales. El porcentaje de espermatozoides con motilidad activa puede verse alterado por la exposición del semen a temperaturas extremas, diluyentes ácidos, agua, orina, pus, sangre o lubricantes (Allen, 1993). La primera eyaculación de un perro después de un período prolongado de reposo sexual puede contener un mayor porcentaje de espermatozoides viejos y muertos que se han almacenado en el epidídimo. Esto da como resultado una disminución del porcentaje de espermatozoides activamente móviles. Las muestras de semen obtenidas en días posteriores deberían ser más normales. En raras ocasiones, también se pueden observar espermatozoides viables hipomóviles o no móviles con el síndrome de Kartagener, un síndrome de cilios inmóviles con un modo de herencia autosómico recesivo (Feldman & Nelson, 2004).

## **1.1.2.2. Concentración**

La concentración o número de espermatozoides por eyaculado debe determinarse multiplicando el número de espermatozoides por mililitro de semen por el volumen total (en mililitros) de semen recolectado. El volumen total de semen depende, del volumen de líquido prostático claro (tercera fracción de eyaculación) recolectado, por lo que se vuelve extremadamente variable. La evaluación de la concentración de espermatozoides por mililitro es inexacta y no debe realizarse. Los espermatozoides se pueden contar con un espectrofotómetro calibrado, un contador Coulter o un hemocitómetro (Feldman & Nelson, 2004).

## 1.1.2.3. Evaluación subjetiva y objetiva

### A) Evaluación subjetiva del semen canino

Implica la observación visual y la evaluación manual de diferentes parámetros del espermatozoide, como la concentración, la motilidad, la morfología y la presencia de anomalías. Los evaluadores utilizan microscopios y técnicas de microscopía para realizar esta evaluación subjetiva (Perez-Osorio et al., 2018; Pesch et al., 2006).

### B) Evaluación objetiva del semen canino

Utiliza métodos y tecnologías avanzadas para medir y analizar diferentes parámetros del espermatozoide de manera precisa y cuantitativa. Esto puede incluir el uso de sistemas de análisis de semen asistidos por computadora (CASA), que analizan automáticamente la concentración, la motilidad, la velocidad y otros parámetros del espermatozoide (Gamboa et al., 2010; Gillan et al., 2005).

**Tabla 1.** Criterios para la evaluación del semen normal

<b>Parámetros principales para evaluar la fertilidad</b>	
Total, de espermatozoides por eyaculado	>200 × 10 <sup>6</sup> /eyaculado
Motilidad de los espermatozoides	>70 % con motilidad progresiva hacia adelante
Morfología de los espermatozoides	>70 % de espermatozoides normales
Defectos primarios	<10 % de los espermatozoides
Defectos secundarios	<20 % de los espermatozoides.
<b>Parámetros adicionales</b>	
Volumen de semen	variable, de 1 a 40 ml/eyaculado
Color del semen	blanco a opalescente y opaco
pH seminal	6,3 a 6,7 (líquido prostático, 6,0 a 7,4)
Citología seminal	ocasionalmente células epiteliales, rbc, wbc, bacterias
Fosfatasa alcalina seminal	>5000 u/l

Adaptado de (Feldman & Nelson, 2004).

#### 1.1.2.4. Sistema CASA

El sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) es una tecnología utilizada en la evaluación del semen para analizar de manera objetiva diferentes parámetros del espermatozoide, como la concentración, la motilidad, la velocidad y la morfología. Utiliza algoritmos y software especializados para capturar y procesar imágenes de los

espermatozoides, lo que permite una evaluación precisa y cuantitativa. Además, reduce la variabilidad inherente a la evaluación subjetiva realizada por observadores humanos (Colenbrander et al., 2003).

La terminología utilizada en la evaluación de semen mediante el sistema CASA se refiere a los diferentes parámetros y medidas que se obtienen durante el análisis (Tejerina et al., 2009). A continuación, se presentan algunos términos comunes utilizados en el contexto del sistema CASA:

- 1) Concentración espermática:** Se refiere al número de espermatozoides presentes en una muestra de semen. Se expresa generalmente como el número de espermatozoides por mililitro (espermatozoides/ml) (Verstegen et al., 2002).
- 2) Motilidad espermática:** Es la capacidad de los espermatozoides para moverse y desplazarse. La motilidad se clasifica en categorías como progresiva, no progresiva, o inmóvil (Tejerina et al., 2009).
- 3) Velocidad espermática:** Se refiere a la velocidad a la que los espermatozoides se desplazan. Puede expresarse en términos de velocidad rectilínea (VSL), velocidad curvilínea (VCL) y velocidad promedio del trayecto (VAP) (Quintero-Moreno et al., 2003).
- 4) Morfología espermática:** Se refiere a la forma y estructura de los espermatozoides. Se evalúa la proporción de espermatozoides normales en comparación con aquellos con anomalías morfológicas (Davis & Gravance, 1993; Verstegen et al., 2002).
- 5) Viabilidad espermática:** Es la capacidad de los espermatozoides para mantener su integridad y función. Se puede evaluar mediante pruebas de exclusión de colorantes vitales, como el eosina-nigrosina (Peña, 2000).

#### 1.1.2.5. Morfología

Los frotis del eyaculado sin diluir se examinan microscópicamente en busca de anomalías estructurales de los espermatozoides. Se puede colocar una pequeña gota de semen fresco sin diluir en un portaobjetos y cubrir con un cubreobjetos grande. Esto esparce el líquido en una película delgada, lo que permite una evaluación precisa de los espermatozoides individuales sin manchas. Esta evaluación se realiza mejor usando microscopía de contraste de fase. Alternativamente, el semen se puede untar uniformemente en un portaobjetos de vidrio de manera similar a la sangre; el frotis luego se seca al aire, se fija y se tiñe (Graham & Mocé, 2005; G. B. Restrepo et al., 2013).

## 1.1.2.5.1. Tinciones

- La técnica de tinción SpermBlue®, se ha desarrollado para teñir todos los componentes del espermatozoide (acrosoma, cabeza, pieza media, pieza principal de la cola y pieza final) de manera diferencial en diferentes intensidades de azul. El procedimiento de tinción es muy sencillo y sólo consta de dos pasos principales: fijar en un medio y teñir en un segundo medio. Funciona igualmente bien para frotis de semen “crudo” así como para preparaciones en gradiente swimup/Percoll/PureSperm, utilizando la mayoría de los medios de cultivo de tejidos (S.L, n.d.; Van Der Horst & Maree, 2009).
- La técnica de tinción rápida de tres pasos de Giemsa-Wright (p. ej., Harleco Hemacolor, EM Diagnostic Systems, Gibbstown, NJ; Diff Quik, VWR International, West Chester, PA; Camco Stain Pack, Cambridge Diagnostic Products, Fort Lauderdale, FL) es rápida, eficaz y fácilmente disponible en la mayoría de las prácticas (Jiménez Vaquero, 2013). Estas manchas no tiñen el área acrosomal de los espermatozoides.
- La tinta china y la eosina-nigrosina (p. ej., tinción Morphology, Society of Theriogenology, Lane Manufacturing, Denver, CO; Hancock, Lane Manufacturing, Denver, CO) son tinciones de fondo que delimitan el espermatozoide en lugar de teñirlo directamente (Jiménez Vaquero, 2013). Para este último, una gota de tinción de eosina-nigrosina y una gota de semen se mezclan suavemente en un portaobjetos de microscopio calentado antes de untarlos y dejarlos secar al aire (Jiménez Vaquero, 2013).
- La tinción Spermac® (Fertility Technologies Inc, Natick, MA) es una tinción rápida que ofrece cualidades diferenciales únicas. El núcleo del espermatozoide se tiñe de rojo; el acrosoma, la pieza intermedia y la cola se tiñen de verde; y la región ecuatorial del acrosoma se tiñe de verde pálido (Oettle, 1986). La tinción de Spermac® se puede usar en semen diluido, ya que los componentes como la yema de huevo, el suero y la leche que se incluyen comúnmente en los diluyentes no interfieren con la tinción. Los leucocitos no se tiñen de forma diferente con la tinción de Spermac® (Schaäfer & Holzmann, 2000). Root Kustritz et al. (1998) encontraron que el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y el porcentaje de anomalías morfológicas diferían según la técnica de tinción, lo que sugiere que la técnica de tinción o preparación puede alterar la morfología de los espermatozoides caninos de manera artificial. Los resultados de este estudio enfatizan la importancia de la consistencia de la preparación y la técnica

de tinción al comparar la morfología de los espermatozoides dentro y entre perros (Root Kustritz et al., 1998).

La evaluación de la morfología de los espermatozoides debe completarse microscópicamente mediante inmersión en aceite. Los espermatozoides normales están formados por el casquete acrosómico, la cabeza, el cuello, la pieza central y la cola. El acrosoma es una estructura similar a un casquete que cubre un poco más que la mitad anterior de la cabeza, y la pieza central es aproximadamente 1,5 veces la longitud de la cabeza en los espermatozoides normales. Los espermatozoides individuales deben evaluarse en busca de anomalías que surjan en la cabeza, la pieza intermedia y la cola. Las anomalías comúnmente identificadas incluyen cabezas desprendidas, acrosomas nudosos, acrosomas desprendidos, gotitas citoplásmicas proximales y distales, pieza intermedia refleja (es decir, doblada), colas dobladas, colas fuertemente enrolladas sobre la pieza intermedia y colas enrolladas proximalmente (Root Kustritz et al., 1998).

Las anomalías pueden clasificarse en anomalías primarias y secundarias. Se cree que las anomalías primarias representan anomalías en la espermatogénesis (es decir, dentro de los testículos), mientras que las anomalías secundarias son inespecíficas y pueden surgir durante el tránsito por el sistema de conductos (es decir, dentro del epidídimo), durante la manipulación del semen o después, infección, trauma o fiebre (Johnston et al., 2001). Se deben contar y clasificar un mínimo de 200 espermatozoides; solo se deben contar las cabezas libres, no las cruces libres. Históricamente, se ha sugerido que los varones normales generalmente deberían tener más del 70% de espermatozoides morfológicamente normales y que las anomalías primarias y secundarias deberían constituir menos del 10% y el 20% de los espermatozoides defectuosos, respectivamente (Ramalho-Santos, 2007). Se han demostrado correlaciones positivas entre el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y la tasa de fertilidad y el número total de espermatozoides morfológicamente normales y la tasa de preñez en el perro (Ferriani, 2007; Oettlé, 1993; G. Restrepo et al., 2013). Oettlé. (1993) encontró que la fertilidad de los perros se reducía estadísticamente cuando el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales caía por debajo del 60%. Usando una morfología de esperma normal del 60 % como punto de corte entre normal y subnormal, la fertilidad fue del 61 % en un grupo de 23 perros normales en comparación con el 13 % en un grupo de 15 perros subnormales. G. Restrepo et al. (2013) han determinado el número total de espermatozoides morfológicamente normales y progresivamente móviles por eyaculado era más importante para predecir la fertilidad. La inseminación artificial con más de  $250 \times 10^6$  espermatozoides



morfológicamente normales resultaron en una tasa de preñez de aproximadamente 82% en 27 perras evaluadas. Obviamente, el total de espermatozoides por eyaculado y la salud de los espermatozoides (es decir, morfología, motilidad) son críticos en la evaluación de la fertilidad (G. Restrepo et al., 2013).

Aunque la morfología anormal de los espermatozoides está asociada con la infertilidad en los perros, existen pocas descripciones del efecto de defectos morfológicos específicos sobre la fertilidad. Los defectos morfológicos específicos asociados con la infertilidad en el perro incluyen anomalías en la inserción o ultraestructura de la pieza intermedia, espermatozoides microcefálicos y gotitas citoplasmáticas proximales retenidas (Feldman & Nelson, 2004; Johnston et al., 2001).

### **Dimensiones de la cabeza de los espermatozoides caninos**

La morfología del esperma es uno de los indicadores más importantes al momento de observar la calidad y la habilidad de fertilizar el óvulo (Cerdeira et al., 2020; Marnet et al., 2000). Se conoce que la criopreservación afecta directamente la morfometría de la cabeza, ya que la célula se encuentra expuesta a una reducción brusca de temperatura dando como resultado un desbalance osmótico (Gravance et al., 1998).

La equidad en cuanto a las dimensiones de la cabeza del espermatozoide parecen ser un buen indicador de fertilidad en algunas especies como el venado rojo (Esteso et al., 2006).

La cromatina es el principal componente de la cabeza del espermatozoide, por lo que las variables morfológicas se encuentran estrechamente relacionadas con el núcleo de este, dando como resultado que la dimensión de la cabeza del espermatozoide se relaciona directamente con la descondensación de la cromatina al momento de descongelar el semen (Alves et al., 2018). La cabeza del esperma se correlaciona con la espermatogénesis y las características del ADN más que con otros parámetros seminales, como, por ejemplo, la motilidad (Cruz et al., 2010).

#### **1.1.2.6. Integridad (membranas, acrosoma y membrana plasmática)**

La evaluación de la integridad del semen canino implica examinar la calidad de las membranas celulares, el acrosoma y la membrana plasmática de los espermatozoides. Estos parámetros son importantes para determinar la viabilidad y funcionalidad del esperma (Gillan et al., 2005).

## **a) Integridad de las membranas celulares**

La evaluación de la integridad de las membranas celulares se puede realizar utilizando tintes vitales como el eosina-nigrosina o el yoduro de propidio. Estos tintes permiten distinguir entre espermatozoides con membranas intactas (no teñidos) y espermatozoides con membranas dañadas (teñidos) (Gillan et al., 2005; G. Restrepo et al., 2013).

## **b) Integridad del acrosoma**

El acrosoma es una estructura en la cabeza del espermatozoide que contiene enzimas esenciales para la fertilización. Se puede evaluar la integridad del acrosoma mediante técnicas de tinción, como la tinción de Giemsa o la tinción de fluorescencia con lectinas (Ramalho-Santos, 2007).

## **c) Integridad de la membrana plasmática**

La integridad de la membrana plasmática del espermatozoide se puede evaluar mediante pruebas de vitalidad, como la prueba de eosina-nigrosina o la prueba de exclusión de azul de Trypan. Estas pruebas identifican los espermatozoides con membranas plasmáticas intactas y excluyen los que tienen membranas dañadas (Vázquez et al., 1995).

## **1.2. Espermatozoides epididimarios**

Hay diferentes segmentos en el epidídimo (caput, corpus y cauda), tiene la principal función de madurar los espermatozoides para posteriormente almacenarlos hasta que se produzca la eyaculación, se encuentran enzimas antioxidantes tales como glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa, en la cauda y en el cuerpo del epidídimo hay mayor motilidad espermática, por el contrario en el caput y corpus hay niveles más bajos de motilidad lo que indica inmadurez espermática, cabe recalcar que la enzima antioxidante catalasa solo se encuentra en los espermatozoides eyaculados (Angrimani et al., 2014).

Los espermatozoides del epidídimo tienen un gran potencial en las nuevas tecnologías reproductivas de perros, ya que permite recuperar gametos de los epidídimos para preservar y transmitir rasgos genéticos a la descendencia, y se pueden obtener post-mortem, después de la orquiectomía, o en machos con desempeño reproductivo comprometido por disfunción eréctil, neoplasias, condiciones neuropáticas (Luvoni & Morselli, 2017).

## **1.3. Recuperación de semen post-mortem**

La recuperación de semen post mortem en testículos de perros es un procedimiento utilizado para obtener muestras de esperma después de la muerte del animal. Este enfoque se utiliza en situaciones en las que se busca preservar la genética valiosa de un perro reproductor (Gonzalez-Santos et al., 2013).

Hay varios métodos utilizados para la recuperación de semen post mortem en perros, como la extracción quirúrgica de los testículos, la extracción por aspiración o el uso de técnicas de electroeyaculación. Estos métodos se llevan a cabo poco después de la muerte del perro, idealmente dentro de las primeras horas, para maximizar la calidad y viabilidad del esperma recuperado (Benítez-González et al., 2018).

### **1.3.1. Flujo retrógrado**

El flujo retrógrado es un método utilizado para la recuperación de esperma en perros en el cual se aprovecha el flujo de semen hacia la vejiga urinaria durante la eyaculación. En lugar de ser eyaculado hacia el exterior, el semen fluye hacia la vejiga y puede ser recolectado a través de técnicas de cateterización vesical (Benítez-González et al., 2018). La recuperación de espermatozoides de la cola del epidídimo en animales orquiectomizados implica la utilización de la técnica de flujo retrógrado. Esta técnica consiste en colocar una jeringuilla de 1ml con una solución en la luz del conducto deferente, la cual, al ejercer presión en el émbolo infunde la solución, se llena todo el conducto del epidídimo, después de que esté saturado del dilutor, se realiza una incisión en la cola del epidídimo donde la solución con espermatozoides sale del interior (Condemayta Cutipa, 2017).

### **1.3.2. Slides - Swim out**

La técnica de "Swim-out" es un método utilizado en la recuperación de esperma en perros, donde se coloca el semen diluido en un medio especial en un tubo de centrifugación y se somete a centrifugación. Durante el proceso de centrifugación, los espermatozoides se condensan en el fondo del tubo, lo que permite su recuperación (Armas R. et al., 2011; Benítez-González et al., 2018).

## **1.4. Criopreservación**

Es un proceso utilizado para preservar el esperma a muy bajas temperaturas con el fin de mantener su viabilidad y fertilidad a lo largo del tiempo (Woods et al., 2004). La crioconservación incluye varios procesos:

### **1.4.1. Colección de esperma**

El esperma se puede obtener mediante la técnica de "eyaculación por estimulación manual". Esto implica estimular el perro para que eyacule mediante masajes suaves en el área genital (Restreto Betancur et al., 2009). También existen otros métodos disponibles, como la electroeyaculación o el uso de fármacos, que deben ser realizados bajo la supervisión de un veterinario (Benítez-González et al., 2018). Y recuperación de espermatozoides de la cola del epidídimo en animales orquiectomizados o post-mortem (Benítez-González et al., 2018; Soler et al., 2005).

### **1.4.2. Evaluación del esperma**

Después de la colección, se realiza una evaluación del esperma para determinar su calidad. Se analizan parámetros como la concentración, motilidad, morfología y vitalidad de los espermatozoides. Esta evaluación ayuda a determinar si el esperma es adecuado para la criopreservación (Restreto Betancur et al., 2009).

### **1.4.3. Preparación del esperma**

El esperma se mezcla con un diluyente que contiene sustancias crioprotectoras, como glicerol o dimetilsulfóxido (DMSO). Estas sustancias ayudan a proteger los espermatozoides durante el proceso de congelación y descongelación. El diluyente también puede contener otros aditivos para mejorar la viabilidad del esperma (Stuart et al., 2019).

### **1.4.4. Congelación**

El esperma se carga en pajuelas o recipientes pequeños y luego se coloca en un sistema de congelación controlada. Se utilizan tasas de enfriamiento específicas para evitar daños en los espermatozoides durante la formación de cristales de hielo. Finalmente, las pajuelas se sumergen en nitrógeno líquido para su almacenamiento a muy bajas temperaturas (Ávila-Portillo et al., 2006).

## 1.5. Criolesión

Son los daños celulares que pueden ocurrir durante el proceso de congelación y descongelación. Durante la congelación, el agua presente en las células puede formar cristales de hielo, lo que puede causar estrés físico y químico en las células. Esta formación de cristales de hielo puede dañar las membranas celulares, las estructuras intracelulares y provocar la ruptura de las células (Gardela et al., 2023).

La gravedad de la criolesión depende de varios factores, incluyendo la velocidad de congelación y descongelación, la concentración de crioprotectores utilizados y la sensibilidad de las células o tejidos específicos (Grötter et al., 2019). Los crioprotectores son sustancias químicas utilizadas para proteger las células durante el proceso de congelación, minimizando la formación de cristales de hielo y reduciendo el daño celular (Ozimid et al., 2023).

### 1.5.1. Estrés oxidativo

La membrana del espermatozoide al ser abundante en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), es más susceptible al estrés oxidativo debido a los dobles enlaces (insaturados) que los ROS deshacen con mayor facilidad (Gloria et al., 2020). El estrés osmótico y oxidativo afectan la motilidad y a otros patrones cinéticos de los espermatozoides (Gloria et al., 2020), ya que el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) reduce significativamente la función mitocondrial (Angrimani et al., 2014), dado que es bastante capaz de penetrar las membranas celulares y en consecuencia reduce la motilidad de los espermatozoides (Nordberg & Arnér, 2001). Vieira et al. (2018) también reportó que el peróxido de hidrógeno es el ROS más tóxico, debido a que causa un desequilibrio oxidativo en la criopreservación de semen canino.

El radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ) no solo altera las membranas acrosomales, si no también produce daño en el plasma y ADN (Nordberg & Arnér, 2001). Asimismo, el radical hidroxilo tiene una alta capacidad de peroxidar los lípidos de las membranas biológicas causando así daños en la estructura, también produce peroxidación lipídica (Kawai et al., 2017).

El peróxido de hidrógeno, malondialdehído y el radical hidroxilo tienen gran capacidad de dañar el cuerpo y la cola del espermatozoide del epidídimo, pero el espermatozoide epididimario presenta resistencia al daño provocado por el anión superóxido (da Rosa Filho et al., 2021).

## 1.5.2. Estrés osmótico

El uso de un agente crioprotector es indispensable para evitar daños a los espermatozoides durante el proceso de criopreservación, sin embargo, la adición de estos agentes antes del enfriamiento y su eliminación después del calentamiento puede crear un estrés osmótico severo para las células, lo que resulta en lesiones (Gao et al., 1995).

Durante el proceso de congelación, la célula se expone a soluciones hiperosmóticas (agente crioprotector), la célula se contrae debido a la salida de agua intracelular y luego recupera su volumen isotónico original a medida que el crioprotector ingresa a las células. Posteriormente durante la descongelación la célula con alta concentración intracelular (agente crioprotector), se expone a una solución isotónica, se hincha debido a la entrada de agua extracelular y luego se contrae a medida que el agente crioprotector se difunde fuera de las células (Critser et al., 1988).

La criolesión es causada por diferentes factores, uno de ellos es la formación de hielo (Woelders et al., 1997). Cuando la disminución de la temperatura está más allá del punto de congelación del semen, el agua tiende a formar cristales de hielo, primero en el compartimento extracelular. Esto incrementa la concentración de soluto en el agua libre no cristalizada fuera de la célula, causando estrés hiperosmótico (Sieme et al., 2016). Mientras que durante la descongelación los cristales de hielo se derriten en el agua libre que ingresa a la membrana plasmática, por lo que los espermatozoides sufren estrés hipoosmótico (Gloria et al., 2020).

El estrés osmótico tiene efectos especialmente marcados sobre la capacidad cinética de los espermatozoides, pero no tiene efectos directos sobre la actividad mitocondrial (Gloria et al., 2020), así mismo el estrés osmótico determina cambios en las dimensiones morfométricas de la cabeza (O'Brien et al., 2019), existe evidencia de que las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides pueden ser un indicador de la criosupervivencia (Gravance et al., 1998).

## 1.6. Antioxidantes

El estrés oxidativo es uno de los principales desafíos durante la criopreservación del espermatozoide. Durante este proceso, se generan ROS como los radicales libres, que pueden dañar las membranas celulares, el ADN y las proteínas de los espermatozoides (Flor et al., 2016; Luo et al., 2013; T. Meng et al., 2002). Esto puede provocar una disminución

en la viabilidad y la función del espermatozoides después de la descongelación (Schieber & Chandel, 2014).

Los antioxidantes son sustancias que tienen la capacidad de neutralizar los radicales libres y proteger las células del daño oxidativo. En el contexto de la criopreservación de espermatozoides canino, los antioxidantes se agregan al medio de congelación para minimizar los efectos negativos del estrés oxidativo (Len et al., 2019).

Los estudios han demostrado que el uso de antioxidantes durante la criopreservación de espermatozoides canino puede tener varios beneficios como:

## **1) Reducción del daño oxidativo:**

Los antioxidantes pueden proteger las membranas celulares y el ADN del espermatozoides del daño causado por los radicales libres, lo que contribuye a una mayor viabilidad del espermatozoides después de la descongelación (Michael et al., 2007).

## **2) Mejora de la motilidad y la capacidad de fecundación**

Los antioxidantes pueden preservar la función mitocondrial y la integridad de las estructuras celulares involucradas en la movilidad y la fecundación, lo que resulta en un espermatozoides con mayor capacidad de movimiento y fertilidad (Michael et al., 2007).

## **3) Mantenimiento de la integridad del ADN**

Al proteger el ADN del espermatozoides del estrés oxidativo, los antioxidantes pueden reducir la fragmentación del ADN y mantener su integridad, lo que es esencial para la fertilización exitosa (Lopes et al., 1998).

Los antioxidantes comúnmente utilizados en la criopreservación de espermatozoides canino incluyen el ácido ascórbico (vitamina C), el ácido cítrico, la vitamina E, el glutatión, el superóxido dismutasa y la catalasa. Sin embargo, la elección del antioxidante y la concentración específica pueden variar dependiendo del estudio y del protocolo utilizado (Alvarez & Storey, 1983; Beconi et al., 1993; Gardela et al., 2023; Kessopoulou et al., 1995).

Es importante tener en cuenta que la efectividad de los antioxidantes puede depender de diversos factores, como la especie, la calidad inicial del espermatozoides y las condiciones específicas de la criopreservación. Por lo tanto, es recomendable ajustar los protocolos y las dosis de antioxidantes en función de las características individuales de cada caso

(Jiménez Vaquero, 2013). En este mismo sentido, Longobardi et al. menciona que la selección de los antioxidantes y los protocolos de criopreservación son indispensables para reducir los efectos del estrés oxidativo (Longobardi et al., 2017).

Los antioxidantes son necesarios para la criopreservación de semen, tienen la función de mantener la estructura de la membrana celular debido a su propiedad de buffer, controlando el pH y de proveer el balance y la osmolaridad al medio (Eilts, 2005). también se encargan de reducir el estrés oxidativo promoviendo la nutrición y la protección celular al momento de la refrigeración y durante la criopreservación, además previene el crecimiento bacteriano (Payan-Carreira et al., 2018). Los antioxidantes están constituidos por un protector extracelular, un protector intracelular, un agente buffer, azúcar, sales y antibióticos, existen muchos antioxidantes que se recomiendan para la criopreservación de semen de perros, por ejemplo: lecitina de soya, lipoproteínas de baja densidad, leche, liposomas y agua de coco (Kmenta et al., 2011).

### **1.6.1. Resveratrol**

El Resveratrol (trans-3,5,4-trihidroxiestilbeno) es un polifenol natural no flavonoide del grupo de los estilbenos estilbenoides (Gessner et al., 2017). Lo encontramos normalmente en varias plantas como uvas, maní, frutos rojos, yuca y cúrcuma (Alagawany et al., 2015). Se han descrito varias acciones biológicas y efectos protectores de este compuesto, como su actividad antioxidante, cardioprotectora, antiterogénica, antienvjecimiento, antiagregación plaquetaria, anticancerígena, antiinflamatoria, antidiabética, antitumoral, inmunomoduladora (Kulkarni & Canto, 2014).

Algunos de sus beneficios más estudiados son la gran capacidad antioxidante que puede eliminar radicales libres de oxígeno debido a su efecto reductor que retarda la oxidación (Lee et al., 2019). También protege el ADN del daño oxidativo inhibiendo la formación de disulfuro de glutatión y mantiene glutatión en su estado reducido (Yan et al., 2012).

### **1.6.2. Efectos del Resveratrol en la criopreservación de espermatozoides canino**

El Resveratrol ha mostrado efectos beneficiosos en la criopreservación de espermatozoides canino al actuar como un antioxidante que protege contra el estrés oxidativo. Se ha observado que la adición de Resveratrol al medio de congelación puede mejorar la viabilidad, la motilidad y la integridad del ADN del espermatozoides canino después de la descongelación (Bang et al., 2021).



### 1.6.3. Estructura y función

La estructura química del Resveratrol consiste en dos anillos aromáticos unidos mediante un doble enlace de metileno, conformación común de los resorcinoles, razón por la que el Resveratrol recibe su nombre y clasificación dentro de los estilbenos (3,5,4-trihidroxi-trans-estilbeno) (Pannu & Bhatnagar, 2019). El Resveratrol es un compuesto sintetizado por varias plantas en respuesta del estrés ambiental (Bastianetto et al., 2015).

Su actividad biológica depende del número y posición de los grupos hidroxilo (OH), esta composición química le permite: eliminar radicales libres, inhibir la oxidación lipídica, reducir la formación de hidroperóxidos e incrementar la actividad catalítica de enzimas como la glutatión-peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa y la superóxido-dismutasa (Kuršvietienė et al., 2016; Pervaiz & Holme, 2009).

Al incrementar las actividades del glutatión peroxidasa y el superóxido dismutasa (Zhang et al., 2022), se reduce el estrés oxidativo ya que se disminuyen los niveles del ROS. Se descubrió que el Resveratrol ayuda a reparar la distribución mitocondrial anormal y la disfunción mitocondrial después de la vitrificación de embriones (Giaretta et al., 2013) y criopreservación de esperma canino (Bang et al., 2021).

El Resveratrol se considera uno de los mejores suplementos antioxidantes para la criopreservación de esperma canino ya que preserva la calidad espermática (Bang et al., 2021), este aumenta significativamente BCL2, que es un gen de la vía apoptótica mediado por mitocondrias (He et al., 2020). El Resveratrol protege al esperma al reducir la actividad de la vía apoptótica y al activar la proteína quinasa activada por AMP (Bang et al., 2021). La forma activa de la proteína quinasa puede cambiar las células de un estado anabólico a uno catabólico, cerrar las vías sintéticas que consumen ATP y restablecer el equilibrio energético (Towler & Hardie, 2007).

### 1.7. Fluorescencia

El descubrimiento de los fluorocromos ha permitido un análisis más extenso de las características de los espermatozoides (Gillan et al., 2005). La evaluación del semen mediante esta técnica utiliza diferentes tecnologías para la visualización y cuantificación de la fluorescencia emitida por la célula y los compartimentos celulares (G. Restrepo et al., 2013). Las principales técnicas utilizadas son la microscopía de fluorescencia (Gamboa et al., 2010), la fluorimetría (Gravance et al., 2000) y la citometría de flujo; esta

última utilizada para evaluar un amplio número de características de integridad, vitalidad y función de los espermatozoides (Gillan et al., 2005; Love et al., 2003).

## **1.7.1. Naranja de acridina**

La naranja de acridina (AO) es un conocido colorante fluorescente, se ha usado tanto en investigación de laboratorio como en aplicaciones de investigación por su alta sensibilidad y rápida respuesta (Khemthongcharoen et al., 2011; Melnik et al., 2001), generalmente se utiliza como marcador fluorescente tanto para el ADN como para el ARN (Nishiwaki & Ogura, 1995). Dentro de la fluorescencia se utiliza para la observación de la viabilidad celular, la determinación del ciclo celular y el estudio de la fisiología celular (Gonzalez et al., 1995; Mascotti et al., 2000; Melnik et al., 2001).

Los perfiles de fluorescencia del fluorocromo de AO podrían generarse de manera diferente según su estructura química y el tipo de interacción de la molécula celular (Rigler, 2010). Como forma monomérica, el tinte AO tiene la absorción espectral máxima a 492 nm y emite la luz de fluorescencia verde a alrededor de 530 nm, mientras que la emisión espectral máxima de su dimérico u oligomérico se dirige hacia el rojo a alrededor de 655 nm (Khemthongcharoen et al., 2011).

Las interacciones moleculares del tinte AO con el ADN y el ARN que dependen de la intercalación y la atracción electrostática también pueden generar la emisión de fluorescencia verde y roja, respectivamente. La proporción de fluorescencia verde a roja del colorante AO se ha utilizado ampliamente para indicar los compartimentos ácidos y los orgánulos ubicados en las células (Khemthongcharoen et al., 2011).

La AO emite fluorescencia verde cuando se intercala como monómero en el ADN nativo (doble cadena y normal) y rojo cuando se une al ADN desnaturalizado (monocatenario) como un agregado (Chohan et al., 2004). La tinción con AO implica un tratamiento ácido (pH bajo) del esperma, que disocia los tioles del ADN, lo que aumenta la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización y, en consecuencia, el AO compite por los sitios de unión aniónicos al evitar la agregación no específica (Kosowe et al., 1992).

### **1.7.1.1. Estructura**

La naranja de acridina (3-N,3-N,6-N,6-N-tetramethylacridine-3,6-diamine) forma parte de las aminoacridinas, es una amina aromática y un compuesto amino terciario; lleva dos sustituyentes dimetilamino en las posiciones 3 y 6. La sal de clorhidrato es el

# UCUENCA

colorante fluorescente 'naranja de acridina', que se utiliza para la determinación del ciclo celular. Tiene un papel como fluorocromo y colorante histológico (NCBI, 2023).

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Materiales

<p><b>Físicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Guantes de inspección</li> <li>● Refrigerador</li> <li>● Papel secante</li> <li>● Mandil</li> <li>● Jeringas 1 ml</li> <li>● Hojas de bisturí No. 15</li> <li>● Pajuelas de 0,25 ml</li> <li>● Fundas Ziploc</li> <li>● Caja poliestireno de 31 x 29 x 30 cm</li> <li>● Rampa doble de congelación (24 y 10 cm de altura)</li> </ul>	<p><b>Biológicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Testículos de perro (con epidídimo intactos)</li> <li>● Espermatozoides de perro</li> <li>● Huevos de gallina</li> </ul>
<p><b>Químicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Tris (Sigma, 252859)</li> <li>● Ácido cítrico (Sigma, C0759)</li> <li>● Glucosa (Sigma, G5146)</li> <li>● Penicilina G-sódica (Sigma, P3032)</li> <li>● Sulfato de estreptomicina (Sigma, S9137)</li> <li>● Glicerol (Sigma G9012),</li> <li>● Sacarosa (Sigma, S1888)</li> <li>● HEPES sodium salt (Sigma, H3784)</li> <li>● Cloruro de sodio, NaCl (Sigma, S5886)</li> <li>● Hidróxido de potasio; KOH (Sigma, P5958)</li> <li>● Yoduro de Propidio (PI, Sigma P-4170)</li> <li>● Aglutunina (PNA-FITC, Sigma L7381)</li> <li>● Nitrógeno Líquido (NL<sub>2</sub>)</li> </ul>	<p><b>Laboratorio</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Puntas de pipetas automáticas (blancas, amarillas, azules)</li> <li>● Pipetas automáticas (2-10 µL, 2 – 20 µL, 20 – 200 µL, y (100 – 1000 µL)</li> <li>● Cajas Petri de búsqueda</li> <li>● Estereoscopio</li> <li>● Centrífuga</li> <li>● Sistema CASA, (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, v.6.4.9, software. Microptic S.L., Barcelona, España).</li> <li>● Refrigerador</li> <li>● Porta y cubre objetos cortos</li> <li>● Termómetro para pajuelas</li> <li>● Baño María</li> <li>● Pinzas</li> <li>● Tubos falcon de 15 ml</li> <li>● Tubos eppendorf de 1,5 ml</li> </ul>

## 2.2. Metodología

### 2.2.1. Ubicación

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Cuenca, ubicada en el km 23 de la vía Cuenca - Girón, a la altura de la Parroquia Victoria del Portete; latitud  $-3^{\circ}4'48''$  y longitud  $-79^{\circ}4'31''$ . El Laboratorio se encuentra a una altitud de 2.663 m.s.n.m., a una temperatura promedio entre 10 y 15 °C, y la precipitación media anual es de 789 mm (Figura 1)



**Figura 1.** Ubicación geográfica Granja Irquis de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. Tomado de: Google Earth (2020).

### 2.2.2. Diseño experimental y unidades experimentales

Este experimento utilizó 20 agrupaciones (pools) de muestras espermáticas proveniente de 60 epidídimos de 30 perros machos adultos orquiectomizados. Cada pool se conformó a partir de 3 muestras espermáticas recuperadas por flujo retrógrado y seleccionadas al azar. Cada pool se dividió en 2 grandes alícuotas que se usaron para la congelación convencional y vitrificación, respectivamente. Consecuentemente, cuatro

tratamientos fueron conformados de acuerdo al tipo de criopreservación (congelación convencional y vitrificación) y a la adición del Resveratrol (100  $\mu\text{M}$  y 0 [control] de  $\mu\text{M}$  de RES):

1. C-RES: TCG-YH + 5% glicerol + 100  $\mu\text{M}$  RES (n = 60 pajuelas)
2. C-Co: TCG-YH + 5% glycerol (control) (n = 60 pajuelas)
3. V-RES: TCG-YH + 250 mM sacarosa + 100  $\mu\text{M}$  RES (n = 40 criotubos)
4. V-Co: TCG-YH + 250 mM sacarosa (Control) (n = 40 criotubos)

Las muestras se congelaron en pajuelas de 0,25 ml usando vapores de  $\text{NL}_2$  estático (Galarza et al., 2021); mientras que durante la vitrificación se utilizó 250 mM de sacarosa y se sumergió gotas de 30  $\mu\text{L}$  directamente en  $\text{NL}_2$  (se realizaron 2 criotubos /pool) Ambas muestras se procesaron a una concentración final de  $25 \times 10^6$  esp/ml (Cerdeira et al., 2022).

En las muestras frescas, congeladas-descongeladas y vitrificadas-calentadas se evaluó su cinemática e integridad de las membranas usando el sistema CASA (SCA-2018) y tinción fluorescente doble PI – FITC/PNA. Además, en las muestras criopreservadas se evaluó el estrés oxidativo y la integridad de ADN.

### 2.2.3. Medios

Tabla 2. TCG-EY

Reactivo	Cantidad
Tris	11,4 g
Ácido cítrico	6,6 g
Glucosa	1,8 g
Penicilina	240 mg
Estreptomicina	300 mg
Agua milli Q	300 ml
Yema de huevo (20%)	75 ml

**Tabla 3.** Medio de fluorescencia HEPES

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Hepes sodium salt	476,62 mg
NaCl	1151,27 mg
KOH	16,5 mg
Glucosa	198,77 mg
Agua milli Q	100 ml

**Tabla 4.** Yoduro de prodidio (PI)

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Yoduro de propidio	1 mg
PBS	1 ml

**Tabla 5.** Aglutinina (FITC/PNA)

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
PNA-FITC aglutinina	0,2 mg
BSA	5 mg
PBS	1 ml

#### 2.2.4. Recuperación espermática

Los testículos de perros obtenidos por orquiectomía se almacenaron en bolsas plásticas ziploc (a 5°C) durante 24 a 72 h a 5°C. La recuperación espermática se hizo por flujo retrógrado según lo detallado por Galarza et al. (2021) administrando 1ml de medio TCG-YH enfriado previamente a 5°C a través del conducto deferente y cortando transversalmente la cola del epidídimo. El contenido fue recolectado en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Las muestras espermáticas fueron evaluadas su motilidad y aquellas que tuvieron una motilidad y score (1 – 5 de progresividad) superior al 60 % y 2,5 respectivamente, sirvieron para la conformación de pools. Se conformaron 20 pools, cada pool resultó de la agrupación al azar de 3 muestras de epidídimos (izquierdo o derecho, independientemente) en un tubo Falcon de 15 ml y fueron mantenidos a temperatura de refrigeración a 5°C hasta su análisis inicial y procesamiento. Cada pool fue evaluado el volumen inicial y concentración espermática.

## 2.2.5. Criopreservación de tratamientos

Cada pool fue dividido inicialmente en 2 alícuotas de igual volumen. La primera alícuota fue usada para la congelación y la segunda para la vitrificación, respectivamente. En cada caso, cada alícuota se subdividió en dos grupos para conformar los tratamientos, según el método de criopreservación (congelación y vitrificación) y la adición de 100  $\mu\text{M}$  y 0  $\mu\text{M}$  de RES. Para llegar a las concentraciones finales de los agentes crioprotectores glicerol y sacarosa (penetrante y no penetrante, respectivamente) nos basamos según lo detallado por Galarza et al. (2021).

### 2.2.5.1. Congelación convencional (C)

Ambas subalícuotas de las muestras agrupadas y destinadas para la congelación fueron ajustadas a un volumen y concentración inicial de 1 ml y  $50 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Estas subalícuotas se mantuvieron en refrigeración a  $5^\circ\text{C}$  durante 1 hora. A partir de entonces, una segunda fracción del mismo volumen (1 ml) fueron agregadas a cada subalícuota inicial. En el caso de la primera subalícuota, se agregó 1 ml del mismo medio TCG-YH + 10% glicerol + 200  $\mu\text{M}$  RES. En el caso de la segunda subalícuota, se agregó 1 ml del mismo medio TCG + 10% glicerol (control). De esta manera, las muestras espermáticas tuvieron un volumen final de 2 ml, una concentración de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/ml, una concentración de glicerol del 5%, y finalmente una concentración de RES de 100 y 0  $\mu\text{M}$  RES para el tratamiento 1 (C-RES) y 2 (C-Co), respectivamente. Estos dos tratamientos de congelación se mantuvieron durante 1 h más en equilibrio a  $5^\circ\text{C}$ . Al final de este período, las muestras espermáticas se cargaron en pajuelas de 0,25 ml previamente enfriadas ( $5^\circ\text{C}$ ) y rotuladas, se sellaron con alcohol de polivinilo, y se congelaron en vapores de  $\text{NL}_2$  estático siguiendo la metodología descrita por Galarza et al. (2021).

La descongelación de las pajuelas se realizó sumergiéndolas en agua atemperada a  $37^\circ\text{C}$  en un baño María durante 30 segundos. Después de ello, las muestras descongeladas fueron incubadas durante 5 minutos en baño maría a  $37^\circ\text{C}$  previo a su análisis de calidad espermática.

### 2.2.5.2. Vitrificación (V)

Ambas subalícuotas de las muestras agrupadas y destinadas para la vitrificación cinética fueron también ajustadas a un volumen y concentración inicial de 1 ml y  $50 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Luego de una hora de refrigeración a  $5^\circ\text{C}$ , una segunda



fracción del mismo volumen (1 ml) fueron agregadas a cada subalícuota inicial. En el caso de la primera subalícuota, se agregó 1 ml del mismo medio TCG-YH + 500 mM sacarosa + 200  $\mu$ M RES. En el caso de la segunda subalícuota, se agregó 1 ml del mismo medio TCG + 500 mM sacarosa (control). De esta manera, las muestras espermáticas de vitrificación tuvieron un volumen final de 2 ml, una concentración de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/ml, una concentración de sacarosa del 250 mM, y finalmente una concentración de RES de 100 y 0  $\mu$ M RES para el tratamiento 3 (V-RES) y 4 (V-Co), respectivamente. El proceso de vitrificación cinética se realizó según lo detallado por Cerdeira et al. (2022) y Galarza et al. (2021). En una caja de poliestireno, se colocó 3.4 litros de LN<sub>2</sub> (correspondiente a 4 cm de altura desde su base) y se hizo caer gotas de 30  $\mu$ l directamente sobre el LN<sub>2</sub> hasta que se sumerjan. Estas esferas fueron almacenadas en criotubos de 2 ml y contenidas en un tanque criogénico durante 1 mes antes de su evaluación.

El calentamiento se realizó deslizando las esferas (pellets) sobre las platinas térmicas atemperadas a 65°C de un dispositivo de calentamiento de elaboración artesanal (STC-3008). En el lapso de 3 segundos, las esferas fueron derretidas y el contenido fue recogido en un vaso de precipitado de 10 ml. Rápidamente, el contenido fue trasladado a tubos Eppendorf de 15 ml y centrifugado a 300 gravedades durante 5 min. El sobrenadante fue removido y reemplazado con 300  $\mu$ L de TCG-EY atemperado a 22°C. Después de ello, las muestras calentadas fueron incubadas durante 5 minutos para su posterior evaluación de la calidad espermática.

## **2.2.6. Análisis espermático**

### **2.2.6.1. Evaluación de la cinemática espermática**

Las características cinéticas de espermatozoides epididimarios frescos-diluidos, congelados-descongelados y vitrificados-calentados fueron analizadas mediante un sistema computarizado CASA (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, v.6.0.4.9 software, Microptic S.I., Barcelona, España) acoplado a un microscopio Nikon (Eclipse model 50i, contraste negativo) de contraste de fases de acuerdo a lo detallado por Galarza et al. (2021). Se analizó las siguientes variables cinéticas: porcentaje de motilidad total (MT), porcentaje de motilidad progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL,  $\mu$ m/s), velocidad rectilínea (VSL,  $\mu$ m/s), velocidad promedio (VAP,  $\mu$ m/s), linealidad (LIN, %), rectitud (STR, %), oscilación (WOB, %), frecuencia de batido de flagelo (BCF, Hz), y amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH,  $\mu$ m).

## 2.2.6.2. Integridad simultánea de membranas plasmática y acrosomal

El estado de las membranas (íntegras o dañadas) de espermatozoides epididimarios frescos-diluidos, congelados-descongelados y vitrificados-calentados fueron analizadas mediante una prueba de doble tinción fluorescente a base de yoduro de propidio y aglutinina: 'IP +PNA/FITC'. Las muestras espermáticas fueron diluidas en un medio tampón llamado HEPES (Tabla 3) a una concentración de  $10 \times 10^6$  espermatozoides/ml y en esa mezcla se agregó 5  $\mu$ L de yoduro de propidio (Tabla 4) y 5  $\mu$ L aglutinina (Tabla 5). Se examinaron un total de 200 espermatozoides por portaobjetos utilizando un microscopio de luz de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (Nikon Instruments Inc. Nueva York, NY, EE. UU.) con un filtro de paso de triple banda (aumento de 40 X con una excitación: 450– 490 nm, y emisión: 520 nm) y se cuantificó cuatro subpoblaciones de células: (1) membrana plasmática intacta y acrosoma intacto (PI-/PNA-), (2) con membrana plasmática intacta y acrosoma dañado (PI-/PNA+); (3) con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto (PI+/PNA-) y (4) con membrana plasmática y acrosoma dañado (PI+/PNA+). Además, se calculó el porcentaje total de células que presentan membrana plasmática intacta equivalente a espermatozoides vivos (Total IP: [PI-/PNA-] + [PI-/PNA-]) y membrana acrosomal intacta (Total IA: [PI-/PNA-] + [PI+/PNA-]).

## 2.2.6.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo de muestras espermáticas congeladas-descongeladas y vitrificadas-calentadas de los cuatro tratamientos fue evaluado según lo detallado por Tamay et al. (2022), utilizando la sonda fluorescente CellROX Deep Red Reagent® (2,5 mM; CAT 10422 Life Technologies) diluida en DMSO a una concentración final de 2 mM (solución de trabajo). Esta solución de trabajo fue almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Este análisis se realizó mediante microscopía de epifluorescencia (modelo Eclipse Ci. L 100 -240V, Nikon, Tokio, Japón) con un aumento de 40X utilizando una combinación de tres filtros: B-2A (excitación 450-490 nm y emisión 520 nm), G-2A (excitación 510-560 nm y emisión 590 nm) y UV-2E/C 2A (excitación 330-380 nm y emisión 420 nm). Se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L de cada muestra criopreservada a una concentración de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/ml y se agregó 2  $\mu$ L de CellROX (2 mM) y 2 ml de Hoescht 33342 (en PBS a 1 mg/ml) y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Después de la incubación, cada muestra se centrifugó durante 5 min a 600 gravedades y se eliminó el sobrenadante; el pellet se suspendió en 50  $\mu$ l de medio TALP-sperm (NaCl 113,94 mM, KCl 3,08 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,30 mM, lactato de Na 1 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,97 mM,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,50 mM,

HEPES sódico 10 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, 6 mg/ml de BSA, 0,11 mg/ml de piruvato de sodio, y 5 µL/ml de gentamicina; 326 mOsm/kg, pH 7,6). Para evaluar los espermatozoides con presencia de ROS, se colocó una alícuota de 5 µL de cada muestra en un portaobjetos cubierto con un cubreobjetos y se contaron 200 células y se clasificaron en dos categorías: (1) espermatozoides sin estrés oxidativo (pieza intermedia no teñida); y (2) espermatozoides bajo estrés oxidativo intenso (pieza intermedia teñida de rojo fuerte).

#### **2.2.6.4. Evaluación de la estabilidad de la cromatina**

Las muestras descongeladas y calentadas de los 4 tratamientos fueron evaluados usando la prueba de tinción fluorescente de naranja de acridina. Para ello, se preparó un frotis de cada muestra descongelada en un portaobjetos de vidrio y se secaron al aire. Cada frotis se fijó durante al menos 12 horas en solución de 'Carnoy' (metanol + ácido acético glacial en proporción 6:1) y posteriormente se secaron. A esos frotis se les agregó una solución de tampón (80 mM/L de ácido cítrico y 15 mM/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 2,5) a 75 °C durante 5 min para probar la estabilidad de la cromatina. Posteriormente, los portaobjetos se tiñeron con colorante naranja de acridina (0,2 mg/ml en PBS). Se lavaron con agua para eliminar la tinción de fondo; aún húmedas, se cubrieron con cubreobjetos y se evaluaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (epifluorescencia D-FL, fuente de alimentación de mercurio de alta presión C-SHG1; Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE. UU.), usando los tres filtros, verde, violeta y rojo, con una excitación: 510-560 nm y emisión: 590 nm. Se analizaron 200 células en cada portaobjetos de cada pajuela. Los espermatozoides con contenido normal de cromatina presentaron una fluorescencia verde en su cabeza, mientras que los espermatozoides con la cromatina alterada o condensada emitieron una fluorescencia que varió entre amarillo naranja a rojo.

#### **2.2.6.5. Evaluación de las dimensiones morfométricas de la cabeza de los espermatozoides criopreservados**

Las dimensiones morfométricas de la cabeza de espermatozoides frescos, congelados-descongelados, y vitrificados-calentados de los cuatro tratamientos fueron evaluadas mediante el módulo ASMA del sistema CASA (SCA). Para ello, se realizó un frotis de cada muestra mezclando 15 µL de la tinción SpermBlue® más 5 µL de la muestra a analizar y se dejó secar en una placa térmica a 37°C. Las muestras fijadas se sellaron con medio de montaje (pegamento mounting medium). Se evaluaron en el sistema CASA usando la luz clara, la fase "A" y una magnificación de 60X. Se registró 100

espermatozoides por muestra según la metodología descrita por Galarza et al. (2021). El análisis morfométrico de la cabeza espermática incluye el largo, ancho, perímetro, área, elipticidad, elongación, rugosidad y regularidad.

## 2.2.7. Análisis estadístico

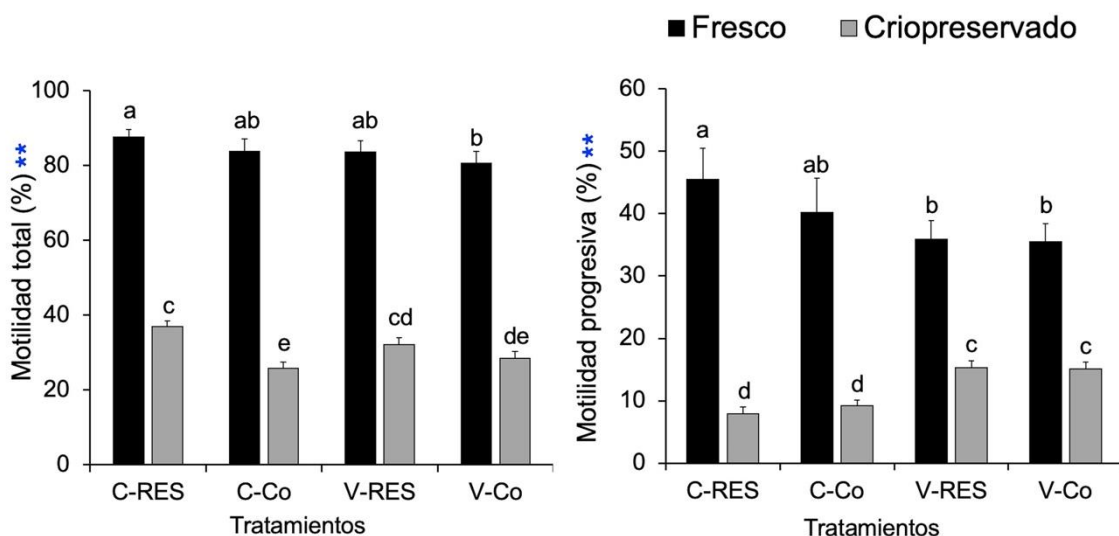
Los datos recogidos en el laboratorio fueron tabulados en una base en Excel y posteriormente se analizaron estadísticamente en un software STATISTICA versión 12.0 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA). Cada variable numérica fue sometida a la prueba estadística Shapiro-Wilk para determinar la normalidad. Los datos que no cumplieron una distribución normal fueron transformados a *Arcoseno* (variables porcentuales) y *Log-10* (variables numéricas) antes del análisis estadístico. Un ANOVA factorial de 2 x 2, dos métodos de criopreservación (C y V) y dos dosis de RES (100 y 0  $\mu\text{M}$ ) se utilizó para determinar las diferencias significativas entre las muestras de esperma congelado-descongelado y vitrificado-calentado en las variables cinemáticas, integridad de las membranas espermáticas y dimensiones de la cabeza. Cuando ANOVA reveló diferencias significativas, los valores fueron comparados mediante la prueba de rango múltiple de Tukey a un nivel de significancia de  $P < 0.05$ . Los datos fueron expresados en media  $\pm$  EEM (error estándar de la media).

## 3. Resultados

### 3.1. Cinemática espermática

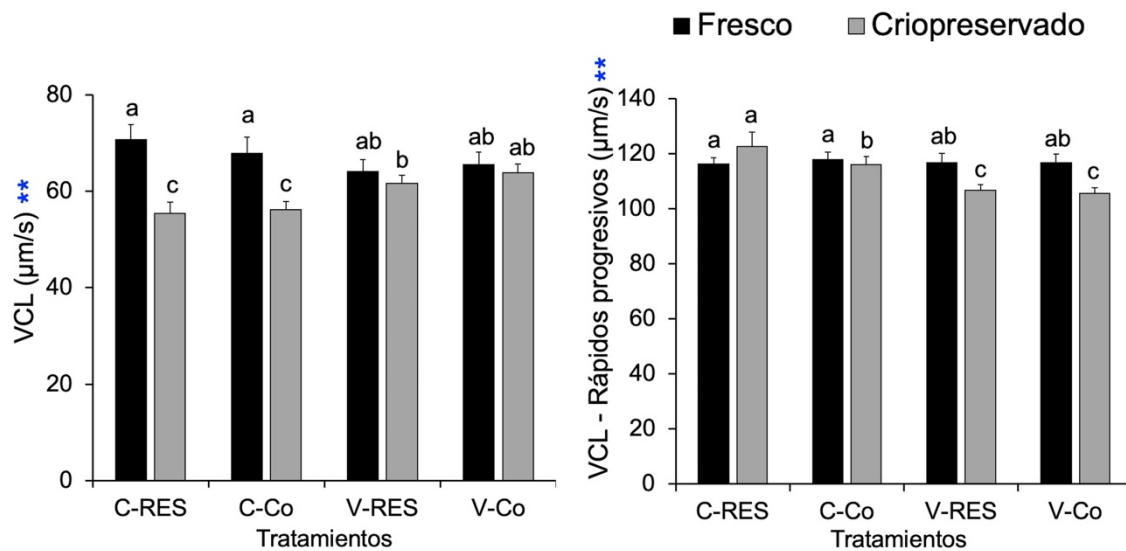
Una interacción significativa ( $P < 0,001$ ) entre el *tipo de criopreservación* (CONG y VIT) y *adición de RES* ( $100 \mu\text{M}$  y  $0 \mu\text{M}$ ) fue evidenciado en las siguientes variables cinemáticas: MT, MP, VCL, VCL-RAP, ALH y BCF.

La motilidad total (MT) y motilidad progresiva (MP) fueron afectadas en la criopreservación, independientemente de la adición del RES (Figura 2). El porcentaje de MT en muestras frescas fue más alto ( $P < 0,05$ ) con el tratamiento C-RES en comparación con el porcentaje del tratamiento V-Co. Asimismo, en muestras criopreservadas, el tratamiento C-RES produjo un porcentaje más alta ( $P < 0,05$ ) de MT comparado con los porcentajes de los tratamientos C-Co y V-Co. Con el mismo efecto, el tratamiento C-RES produjo una MP superior ( $P < 0,05$ ) en muestras frescas comparado con los tratamientos de vitrificación (V-RES y V-Co). No obstante, en las muestras criopreservadas, ambos tratamientos de vitrificación (V-RES y V-Co) produjeron porcentajes de MP más alta ( $P < 0,05$ ) en comparación con los aquellos tratamientos de congelación, independientemente de la adición de RES (Figura 2).



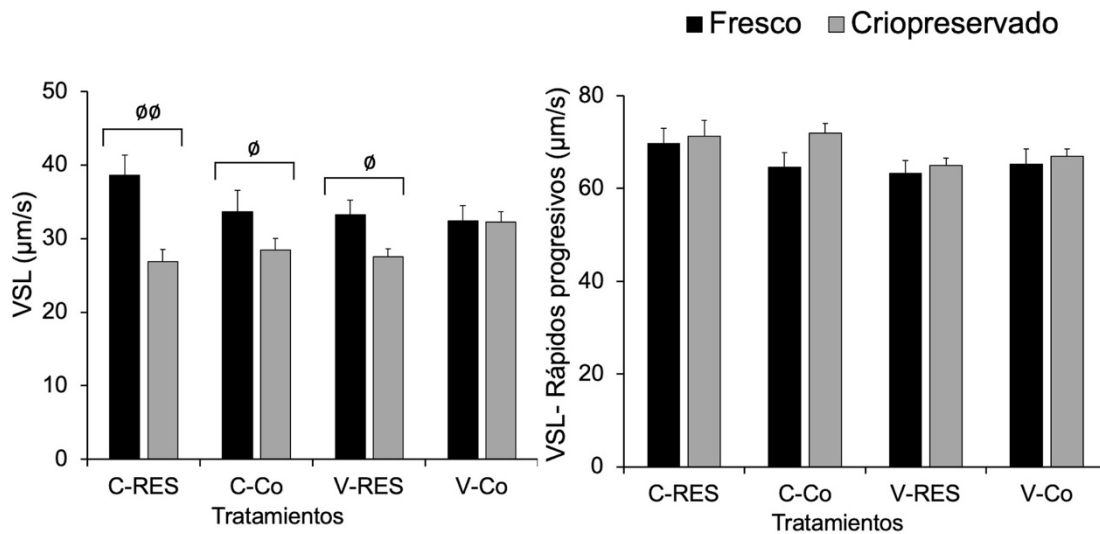
**Figura 2.** Motilidad total (MT) y motilidad progresiva (MP) de espermatozoides epididimarios caninos frescos, congelados (C-RES y C-Co [control]) y vitrificados (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol (RES). Asteriscos (\*\*) demuestran interacción significativa ( $P < 0,001$ ) entre “*tipo de espermatozoides* (frescos y criopreservados) y *tratamientos con RES*”. Letras diferentes entre cada tratamiento y motilidad expresan diferencias significativas (a – b – c – d,  $P < 0,05$ ).

No se evidenció diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre tratamientos ni en las velocidades curvilíneas (VCL y VCL-RAP) en muestras frescas. Una reducción significativa ( $P < 0,05$ ) de la VCL fue observada en los tratamientos de congelación (C-RES y C-Co) comparados con sus valores iniciales (frescos). Efectivamente, después de la criopreservación, los tratamientos de vitrificación (V-RES y V-Co) produjeron valores de VCL superiores ( $P < 0,05$ ) que los tratamientos de congelación (C-RES y C-Co). Por otro lado, con el tratamiento C-RES, la VCL-RAP no se redujo ( $P > 0,05$ ) después de la criopreservación; por el contrario, todos los otros tratamientos redujeron ( $P < 0,05$ ) sus valores de VCL-RAP después de la criopreservación. Finalmente, tratamiento C-RES produjo una mayor ( $P < 0,05$ ) VCL-RAP que todos los otros tratamientos C-Co, V-RES y V-Co (Figura 3) en muestras criopreservadas.



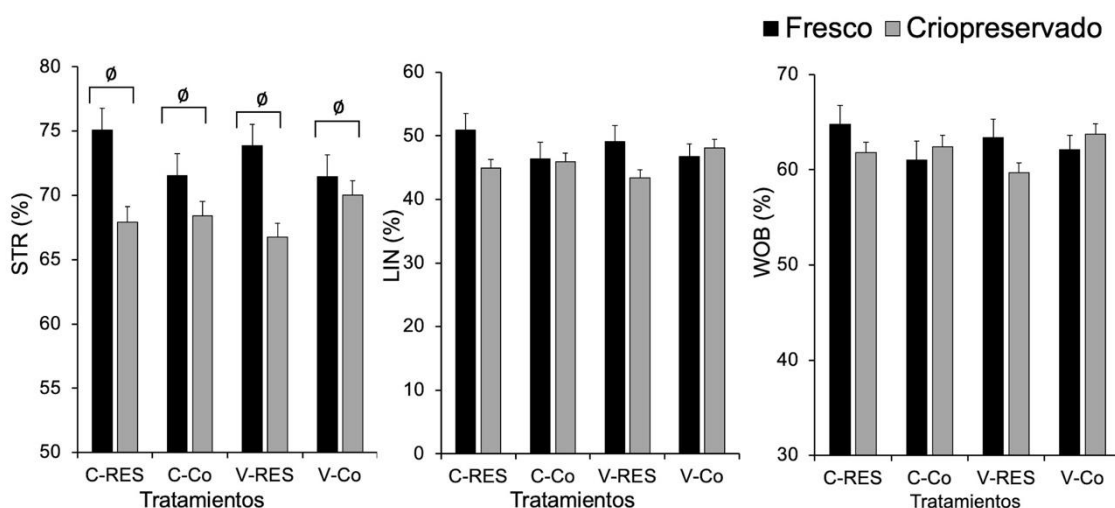
**Figura 3.** Velocidad curvilínea (VCL) y velocidad curvilínea de espermatozoides con velocidad rápida (VCL-RAP) de espermatozoides epididimarios caninos frescos, congelados (C-RES y C-Co [control]) y vitrificados (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol (RES). Asteriscos (\*\*) demuestran interacción significativa ( $P < 0,001$ ) entre “tipo de espermatozoides (frescos y criopreservados) y tratamientos con RES”. Letras diferentes entre cada tratamiento y velocidad expresan diferencias significativas (a – b – c,  $P < 0,05$ ).

La VSL se redujo significativamente ( $P < 0,05$ ) después de la criopreservación únicamente en los tratamientos C-RES, C-Co y V-RES. No se evidenció diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre tratamientos de muestras frescas ni criopreservadas, ni en la VSL, ni VSL-RAP (Figura 4).



**Figura 4.** Velocidad rectilínea (VSL) y velocidad rectilínea rápidamente progresivos (VSL-RAP) de espermatozoides epididimarios caninos frescos, congelados (C-RES y C-Co [control]) y vitrificados (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol (RES). Símbolos (∅) demuestran una reducción significativa ( $P < 0,01$ ) de sus valores después de la criopreservación en cada tratamiento

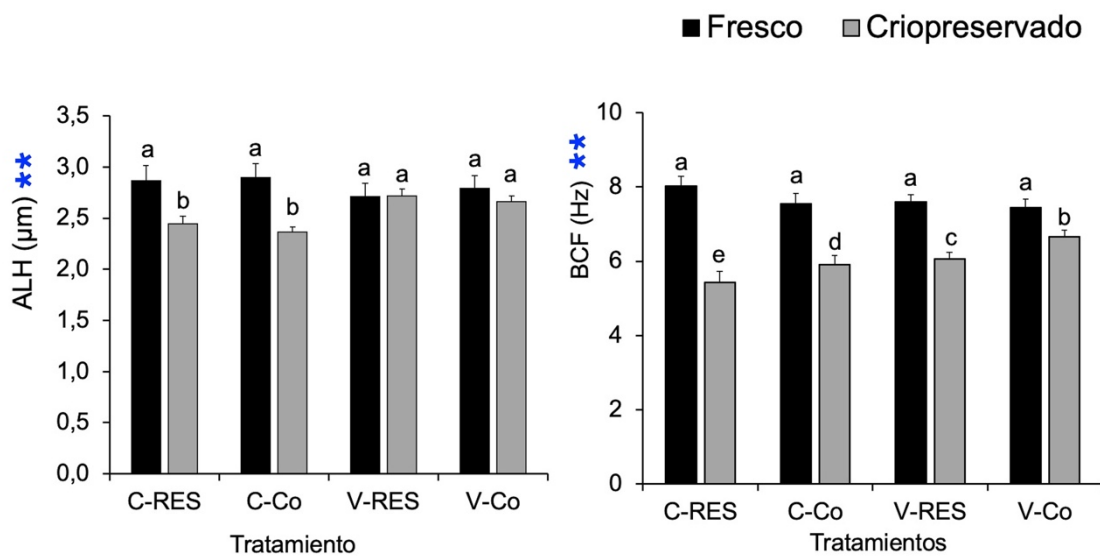
En cuanto a los parámetros de relación de progresión (STR, LIN y WOB), no se evidenciaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre tratamientos de muestras frescas ni criopreservadas. Sin embargo, después de la criopreservación, se evidenció una reducción significativa ( $P < 0,05$ ) de los porcentajes de STR en todos los tratamientos (Figura 5).



**Figura 5.** Parámetros de relación de progresión: rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de espermatozoides epididimarios caninos frescos, congelados (C-RES y C-Co [control]) y vitrificados (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol (RES). Asteriscos (\*\*)

demuestran una reducción significativa ( $P < 0,01$ ) de sus valores después de la criopreservación en cada tratamiento.

Se registraron reducciones significativas ( $P < 0,05$ ) de la ALH en los tratamientos de congelación (C-C-RES y C-Co), y de la BCF en todos los tratamientos después de la criopreservación. En muestras frescas, no se evidenció diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre tratamientos, ni en la ALH, ni en la BCF. Sin embargo, en muestras criopreservadas, los tratamientos de vitrificación (V-RES y V-Co) produjeron valores más altos ( $P < 0,05$ ) de ALH que aquellos tratamientos de congelación (C-RES y C-Co). Controversialmente, en muestras criopreservadas los tratamientos con RES tanto de congelación como de vitrificación produjeron valores inferiores ( $P < 0,05$ ) de BCF comparados con sus controles: C-RES vs. C-Co y V-RES vs. V-Co.



**Figura 6.** Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de espermatozoides epididimarios caninos frescos, congelados (C-RES y C-Co [control]) y vitrificados (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol (RES). Asteriscos (\*\*) demuestran interacción significativa ( $P < 0,001$ ) entre “tipo de espermatozoides (frescos y criopreservados) y tratamientos con RES”. Letras diferentes entre cada tratamiento y parámetro expresan diferencias significativas (a – b – c – d – e,  $P < 0,05$ ).

### 3.2. Integridad de membranas

En el análisis del estado de las membranas espermáticas se demostró que la criopreservación en los espermatozoides disminuyó ( $P < 0,05$ ) los valores de PI-/PNA- (%) e incrementó ( $P < 0,05$ ) los valores indeseables de PI+/PNA+ (%) independientemente del tratamiento. En muestras criopreservadas, el RES produjo un efecto crioprotector de las membranas después del proceso de congelación, al obtener



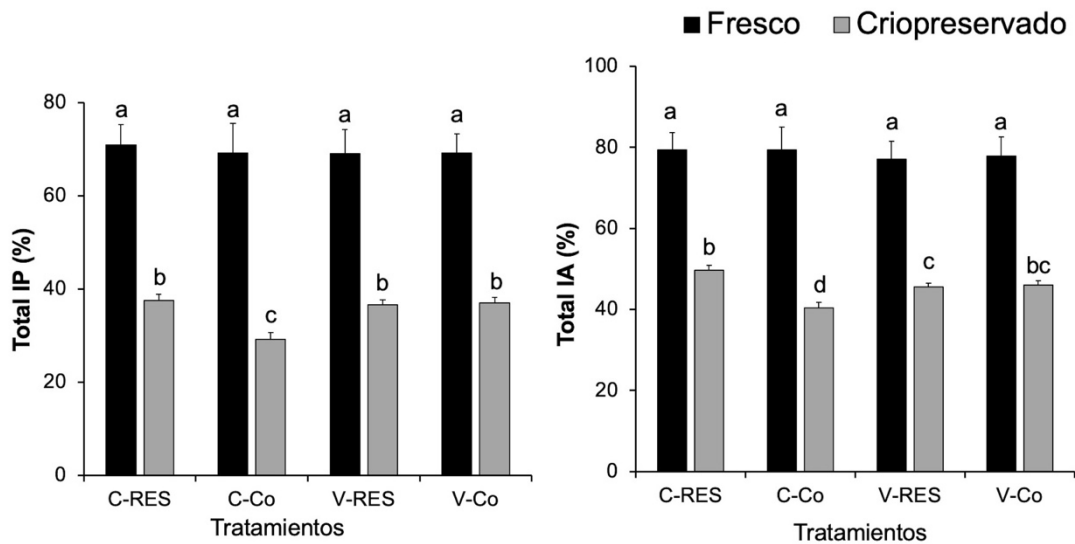
porcentajes más altos de PI-/PNA- y más bajos de PI+/PNA+ (indeseables) con el tratamiento C-RES en comparación con su control C-Co. De hecho, los valores de PI-/PNA- post-calentamiento de los tratamientos de vitrificación (V-RES y V-Co) fueron superiores ( $P < 0,05$ ) al tratamiento C-Co. En el mismo sentido, los tratamientos de vitrificación (V-RES y V-Co) produjeron valores más bajos de PI+/PNA+ en muestras criopreservadas que el tratamiento C-Co (Tabla 6).

**Tabla 6.** Estado de las membranas espermáticas en diferentes categorías de fluorescencia de acuerdo a la prueba de doble tinción fluorescente IP / PNA-FITC de espermatozoides epididimarios de perro diluidos con Resveratrol (RES) y congelados (C-RES y C-Co [control]) y vitrificados (V-RES y V-Co [control])

Categorías	Muestras frescas				Muestras criopreservadas			
	C-RES (n=16)	C-Co (n=16)	V-RES (n=15)	V-Co (n=15)	C-RES (n=52)	C-Co (n=55)	V-RES (n=63)	V-Co (n=64)
PI-/PNA- (%)	70,2 ± 4,66 <sup>a</sup>	68,8 ± 6,43 <sup>a</sup>	68,5 ± 5,32 <sup>a</sup>	68,5 ± 4,19 <sup>a</sup>	36,9 ± 1,31 <sup>b</sup>	28,4 ± 1,50 <sup>c</sup>	35,7 ± 1,13 <sup>b</sup>	36,0 ± 1,24 <sup>b</sup>
PI-/PNA+ (%)	0,67 ± 0,33	0,4 ± 0,16	0,5 ± 0,22	0,6 ± 0,16	0,56 ± 0,09	0,76 ± 0,11	0,9 ± 0,11	0,95 ± 0,10
PI+/PNA- (%)	9,1 ± 1,69 <sup>ab</sup>	10,6 ± 1,41 <sup>ab</sup>	8,5 ± 1,52 <sup>b</sup>	9,3 ± 1,51 <sup>ab</sup>	12,7 ± 0,58 <sup>a</sup>	12,1 ± 0,71 <sup>a</sup>	9,9 ± 0,43 <sup>ab</sup>	9,9 ± 0,50 <sup>ab</sup>
PI+/PNA+ (%)	20,0 ± 4,05 <sup>d</sup>	21,2 ± 5,14 <sup>d</sup>	22,4 ± 4,32 <sup>d</sup>	21,6 ± 4,69 <sup>d</sup>	62,2 ± 1,84 <sup>a</sup>	57,5 ± 1,23 <sup>b</sup>	53,6 ± 1,02 <sup>c</sup>	52,9 ± 1,08 <sup>c</sup>

Superíndices diferentes en cada fila expresan diferencias significativas entre tratamientos de muestras frescas y criopreservadas (a – b – c – d,  $P < 0,05$ ; a – c, a – d,  $P < 0,001$ ).

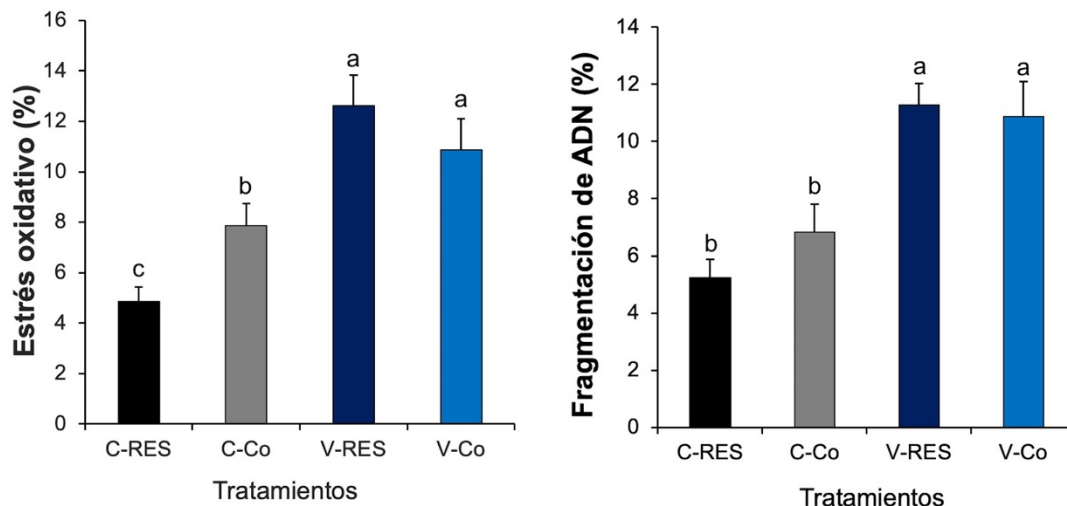
No se evidenció diferencias significativas entre tratamientos de muestras frescas, ni en la integridad total de la membrana plasmática (IP), ni acrosomal (IA). En muestras criopreservadas, no obstante, el RES evidenció un efecto crioprotector de la membrana plasmática y acrosomal después de la congelación y descongelación al mostrar valores superiores ( $P < 0,05$ ) de IP e IA con el tratamiento C-RES comparado con su control C-Co. De hecho, los tratamientos de vitrificación posterior al calentamiento, mostraron valores superiores de IP e IA comparados con el control (V-RES y V-Co vs. C-Co) (Figura 7).



**Figura 7.** Integridad total de la membrana plasmática (IP) y acrosomal (IA) de espermatozoides epididimarios caninos frescos, congelados (C-RES y C-Co [control]) y vitrificados (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol (RES). Letras diferentes entre cada tratamiento y parámetro expresan diferencias significativas (a – b – c – d,  $P < 0,05$ ; a – c, a – c, b – d,  $P < 0,001$ ).

### 3.3. Integridad de ADN y estrés oxidativo

En el análisis del estrés oxidativo y la fragmentación de ADN se evidenció que los tratamientos de congelación produjeron porcentajes menores ( $P < 0,05$ ) que aquellos tratamientos de vitrificación, independientemente de la adición del Resveratrol. La adición del RES, sin embargo, produjo un efecto antioxidante después del proceso de congelación al obtener porcentajes más bajos de espermatozoides con estrés oxidativo con el tratamiento C-RES en comparación con su control C-Co.



**Figura 8.** Porcentajes de estrés oxidativo y fragmentación de ADN de espermatozoides epididimarios caninos frescos, congelados (C-RES y C-Co [control]) y vitrificados (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol (RES). Letras diferentes entre cada tratamiento y parámetro expresan diferencias significativas (a – b – c,  $P < 0,05$ ; a – c,  $P < 0,001$ ).

### 3.4. Morfometría de los espermatozoides

El análisis de las dimensiones morfométricas demostró un incremento significativo ( $P < 0,05$ ) de la longitud, anchura, área y perímetro de los espermatozoides después de congelar con Resveratrol (C-RES). Asimismo, se evidenció un incremento de la anchura de los espermatozoides después de vitrificar con Resveratrol (V-RES). En muestras criopreservadas, el tratamiento C-RES mostró un valor de la longitud ( $P < 0,05$ ) más alta que todos los tratamientos (Tabla 7).

Por otro lado, a excepción de la anchura, las muestras espermáticas vitrificadas con Resveratrol (V-RES) mostraron valores más altos ( $P < 0,05$ ) de longitud, anchura, área, perímetro y ancho de la pieza intermedia en comparación con aquellas muestras vitrificadas sin Resveratrol (V-Co). De hecho, la longitud de la cabeza de los espermatozoides se redujo notablemente ( $P < 0,01$ ) en muestras vitrificadas sin Resveratrol (V-Co) en comparación con los otros tratamientos y las muestras frescas.

**Tabla 7.** Dimensiones morfométricas de la cabeza y pieza intermedia de espermatozoides epididimarios de perro diluidos con Resveratrol (RES) y congelados (C-RES y C-Co [control]) y vitrificados (V-RES y V-Co [control])

Dimensiones	Muestras Frescas (n=12)	Muestras criopreservadas			
		C-RES (n=12)	C-Co (n=12)	V-RES (n=12)	V-Co (n=12)
<b>Longitud (µm)</b>	6,04 ± 0,03 <sup>b</sup>	6,22 ± 0,05 <sup>a</sup>	6,09 ± 0,04 <sup>b</sup>	5,98 ± 0,06 <sup>bc</sup>	5,83 ± 0,04 <sup>d</sup>
<b>Anchura (µm)</b>	3,54 ± 0,02 <sup>b</sup>	3,68 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,61 ± 0,04 <sup>ab</sup>	3,69 ± 0,06 <sup>a</sup>	3,51 ± 0,03 <sup>b</sup>
<b>Área (µm)</b>	21,1 ± 0,020 <sup>bc</sup>	22,5 ± 0,43 <sup>a</sup>	21,8 ± 0,33 <sup>ab</sup>	22,1 ± 0,50 <sup>ab</sup>	20,5 ± 0,31 <sup>c</sup>
<b>Perímetro (µm)</b>	13,8 ± 0,04 <sup>cd</sup>	14,3 ± 0,12 <sup>a</sup>	14,0 ± 0,12 <sup>abc</sup>	13,9 ± 0,18 <sup>bc</sup>	13,5 ± 0,11 <sup>d</sup>
<b>Elipticidad</b>	1,71 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,70 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,69 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,63 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,67 ± 0,01 <sup>ab</sup>
<b>Elongación</b>	0,26 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,00 <sup>ab</sup>
<b>Rugosidad</b>	1,39 ± 0,02	1,38 ± 0,01	1,4 ± 0,01	1,42 ± 0,01	1,42 ± 0,01
<b>Regularidad</b>	0,8 ± 0,01	0,8 ± 0,01	0,8 ± 0,00	0,79 ± 0,00	0,79 ± 0,00

Superíndices diferentes en cada fila expresan diferencias significativas entre tratamientos de muestras frescas y criopreservadas (a – b – c – d, P<0,05; a – c, a – d, P<0,001).

## 4. Discusión

El Resveratrol (RES) es un poderoso antioxidante con propiedades eliminadoras de radicales libres que reducen la producción excesiva de las ROS y, en consecuencia, provoca una disminución de la LPO durante y después de la criopreservación de espermatozoides caninos (Leonard et al., 2003). Los resultados de esta investigación demostraron que al adicionar 100  $\mu$ M de RES al medio de congelación, mejoraron algunos parámetros cinéticos (es decir, MT, VC-RAP, y la ALH), la integridad de las membranas plasmática y acrosomal, y redujo el estrés oxidativo, después de la descongelación. No obstante, después de la vitrificación, el RES no provocó ningún efecto benéfico, pero algunos parámetros cinemáticos (MP, VCL, BCF y ALH) fueron superiores a los obtenidos después de la congelación, independientemente de la adición de RES. De hecho, la integridad total de las membranas plasmática (IP) y acrosomal (IA) fueron similares a las obtenidas después de la congelación con RES. Otros hallazgos indican que después del proceso de congelación con RES, las dimensiones morfométricas de la cabeza de los espermatozoides (largo, ancho, área y perímetro) incrementaron en comparación con sus valores frescos; contrariamente a aquello, después de la vitrificación con RES, las dimensiones de la cabeza mantuvieron sus medidas. Por lo tanto, estos hallazgos indican que el RES provocó un efecto beneficioso y estimulador de la locomoción, protector de las membranas y ejerció un efecto antioxidante, durante y después del proceso de congelación de espermatozoides epididimarios caninos; sin embargo, su efecto se vio limitado en la vitrificación.

Algunas investigaciones sobre la suplementación con RES a medios de congelación han sido desarrolladas en la criopreservación de espermatozoides de otras especies domésticas. El efecto crioprotector del RES ha sido previamente investigado en espermatozoides de carneros, conejos, cabras, verracos y toros, incluso en humanos, y se ha demostrado que el RES ejerció su propiedad crioprotectora y antioxidante debido su efecto en la biogénesis mitocondrial y, en consecuencia, la calidad espermática post-descongelación resultó mejorada (Branco et al., 2010; Bucak et al., 2015; Lv et al., 2019; Shin et al., 2008; Zhu et al., 2019). Una reciente investigación determinó que la suplementación de 50  $\mu$  mM de RES al medio de congelación de espermatozoide de toro mejoró la integridad del acrosoma y de la membrana plasmática, sin embargo, no tuvo efecto en la fertilidad *in vitro* (Assunção et al., 2021). Otra investigación evaluó la suplementación de 5-20 ng/ml de RES al diluyente Tris-yema de huevo-glicerol en la congelación de espermatozoides de carnero, y obtuvo una reducción del estrés oxidativo

(bajos niveles de ROS) dado que disminuyó el potencial de membrana mitocondrial (Silva et al., 2012). Otro estudio desarrollado en semen de chivo demostró que el RES adicionado al medio de congelación mejoró la viabilidad post-descongelación (Lv et al., 2019). En humanos, se ha informado que el medio de congelación suplementado con RES mejoró la calidad y funcionalidad de los espermatozoides después de la descongelación, al reducir las criolesiones y el nivel de ROS (Li et al., 2018). Del mismo modo, Nouri et al. (2018) concluyeron que la suplementación de Resveratrol al semen de caballo mejoró la motilidad total y progresiva, la viabilidad y tuvo un efecto positivo sobre la integridad de la membrana espermática después de la descongelación. Asimismo, Longobardi et al. (2017) demostraron que la suplementación con RES al medio de congelación mejoró la estabilidad de la membrana y la capacidad fecundante (*in vitro*) del semen de búfalo. Los resultados de la presente investigación son consistentes a los resultados obtenidos en los trabajos mencionados anteriormente debido a que el RES mejoró algunos parámetros cinemáticos, la integridad de membranas y disminuyó el estrés oxidativo.

La inclusión de 100 – 200  $\mu\text{M}$  de RES al medio de congelación de espermatozoides eyaculados como fuente antioxidante ha sido sugerida como una estrategia efectiva para la criopreservación en caninos (Bang et al., 2021). Se ha determinado que dosis más altas (Ej. 400  $\mu\text{M}$ ) de RES provocó toxicidad reduciendo los valores de motilidad y viabilidad espermática. Nuestros resultados, a diferencia de aquellos, se usó una dosis más baja (de 100  $\mu\text{M}$ ) de RES pero en espermatozoides epididimarios, y no de origen eyaculado, como el mencionado anteriormente.

Varios mecanismos de acción del RES se han propuesto para demostrar el efecto crioprotector y antioxidante en diferentes ensayos de criopreservación espermática. El RES disminuye la secreción de interleucina-1 $\beta$  y la expresión de genes para la apoptosis celular; lo que provoca una fuerte reducción en la actividad de la vía del inflammasoma, que desemboca en apoptosis celular (Bang et al., 2021; Chalons et al., 2018). El potencial antiinflamatorio del RES se ha demostrado al contrarrestar una inflamación inducida por macrófagos 'U-937' en concentraciones plasmáticas representativas (Walker et al., 2014). En este sentido, la reducción de la vía del inflammasoma por el RES podría ser el mecanismo para mejorar la motilidad y la tasa de supervivencia del espermatozoide de perro después de la descongelación. También se ha sugerido que el RES podría desempeñar un papel en la reducción del proceso de apoptosis desencadenado por la criopreservación de espermatozoides. Sin embargo, esta vía de acción sigue sin estar claro.

Otro mecanismo de acción antioxidante del RES propuesto se atribuye a la eliminación de las ROS, nitrógeno reactivo y radicales orgánicos secundarios con mecanismos de transferencia de átomos de hidrógeno y electrones de pérdida secuencial de protones, protegiendo así a las biomoléculas celulares del daño oxidativo. De igual manera, el RES reduce la producción de óxido nítrico, impidiendo la generación de peroxinitrito lo que conlleva a un menor daño celular (Meng et al., 2023; Truong et al., 2018). Además, el RES controla la actividad de antioxidantes enzimáticos impidiendo daño del ADN por la presencia de radicales libres siendo la causa subyacente de la reducción de la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Algunos autores indicaron que el RES induce el incremento de enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSH-Px), las cuales actúan como mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo y LPO (Ahmed et al., 2020). De igual manera aumenta la expresión de proteínas de la vía de señalización de Nrf<sub>2</sub> y OH-1, lo que provoca una atenuación de la producción de mediadores inflamatorios (Meng et al., 2021), sin embargo su mecanismo de acción debe todavía esclarecerse.

Se cree que la capacidad antioxidante del RES se atribuye a la velocidad con la que elimina el hidroxilo "OH-", uno de los radicales libres más reactivos que perjudica la integridad de la membrana celular (Leonard et al., 2003). Por otro lado, se ha informado que el RES disminuye el complejo de la cadena oxidativa generado por el incremento de ROS; esto condiciona una competencia del RES con la coenzima Q, eliminando los radicales libres O<sub>2</sub>- en las mitocondrias e inhibiendo la LPO (Gambini et al., 2013). Como resultado funcional, el RES mejora la motilidad, la integridad del acrosoma y la fluidez de la membrana plasmática de los espermatozoides bovinos criopreservados, así como contribuye a la biogénesis mitocondrial (Tvrdá et al., 2015). Los resultados de la presente investigación demostraron que únicamente después de la descongelación, el RES redujo el estrés oxidativo generado durante la criopreservación; no obstante, este efecto no se evidenció en la vitrificación. Además, el efecto del RES no mejoró la fragmentación de ADN ni después del proceso de congelación ni de la vitrificación.

Finalmente, en cuanto a la morfometría de los espermatozoides, se observó un aumento significativo en la longitud, anchura, área y perímetro de los espermatozoides después de la congelación convencional con Resveratrol (C-RES). Se conoce previamente que la forma y el tamaño de la cabeza de los espermatozoides pueden influir en su susceptibilidad al daño osmótico durante el proceso de congelación y descongelación, especialmente en subpoblaciones de espermatozoides más heterogéneas (Esteso et al., 2006; Watson, 2000). Estudios previos han determinado que las muestras

espermáticas epididimarias criopreservadas (Esteso et al., 2006) o espermatozoides eyaculados criopreservados (Bóveda et al., 2020), sufren una reducción del tamaño de la cabeza respecto a sus valores antes de la congelación (frescos). Este efecto solo se denotó en la disminución del largo de la cabeza de espermatozoides vitrificados con RES.

Se ha sugerido que la sobrecondensación de la cromatina espermática, el plasma y las lesiones de la membrana acrosómica, así como la pérdida de acrosoma y el daño en el citoesqueleto celular podrían causar una reducción en el tamaño de la cabeza (Arruda et al., 2002; Santiago-Moreno et al., 2016). Cerdeira et al. (2020) determinaron que la congelación convencional tendía a disminuir las dimensiones de la cabeza de espermatozoides eyaculados de perro. Sin embargo, nuestros resultados son contradictorias dado que solo la congelación convencional con RES aumentó significativamente las dimensiones de la cabeza; las dimensiones de la cabeza de espermatozoides congelados y descongelados no se alteró con respecto a sus valores pre-congelación.

En un análisis de microscopía electrónica de barrido (Cryo-SEM), se determinó recientemente que las variaciones en el área de la cabeza del espermatozoide de perro dependieron del procedimiento de criopreservación (congelación convencional o congelación ultrarrápida - vitrificación) (Cerdeira et al., 2020). La congelación convencional tendió a disminuir las dimensiones de la cabeza, y la congelación ultrarrápida - vitrificación provocó un aumento general en el tamaño de la cabeza del espermatozoide eyaculado de perro debido a la probable descondensación de la cromatina y la formación de ampollas en la membrana plasmática en la región de la cabeza (Cerdeira et al., 2020). O'brien et al. (2019) sugiere que el aumento de las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides de algunas especies silvestres después del proceso de congelación y descongelación se debe a que las células quedan expuestas a un ambiente extracelular hipotónico y pueden sufrir hinchazón a través de la difusión pasiva de agua (Meyers, 2005; Sieme et al., 2015); la cantidad de hinchazón que se produce puede depender de las tolerancias osmóticas individuales o específicas de la especie (Benson et al., 2012). La vacuolización nuclear o la descondensación de la cromatina inducida por la congelación (Boitrelle et al., 2012) también podrían explicar este aumento de tamaño. Nosotros creemos que la adición de RES, probablemente, facilitó la vacuolización nuclear y que la difusión pasiva del agua durante la descongelación produjo un ambiente extracelular hipotónico dando como resultado un aumento significativo de las cabezas de espermatozoides epididimarios de perros. No



obstante, más estudios deben ser realizados sobre la acción del RES en la morfometría de la cabeza de los espermatozoides.

## Conclusiones

Basándonos en los resultados de la investigación, esta investigación concluye que el Resveratrol provocó un efecto beneficioso y estimulador de la locomoción, crioprotector de las membranas, y ejerció un efecto antioxidante, durante y después del proceso de congelación de espermatozoides epididimarios caninos debido al incremento de la cinemática espermática y la integridad de las membranas plasmática y acrosomal, y la reducción del estrés oxidativo, después de la descongelación. Además, el Resveratrol produjo un incremento de las dimensiones morfométricas de la cabeza de los espermatozoides. En la vitrificación, sin embargo, el Resveratrol no provocó ningún efecto benéfico.

## Referencias

- Ahmed, H., Jahan, S., Ullah, H., Ullah, F., & Salman, M. M. (2020). The addition of resveratrol in tris citric acid extender ameliorates post-thaw quality parameters, antioxidant enzymes levels, and fertilizing capability of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Theriogenology*, *152*, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.034>
- Aitken, R. J., & Roman, S. D. (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *1*(1), 15–24. <https://doi.org/10.4161/oxim.1.1.6843>
- Alagawany, M. M., Farag, M. R., Dhama, K., Abd El-Hack, M. E., Tiwari, R., & Alam, G. M. (2015). Mechanisms and beneficial applications of resveratrol as feed additive in animal and poultry nutrition: A review. *International Journal of Pharmacology*, *11*(3), 213–221. <https://doi.org/10.3923/ijp.2015.213.221>
- Allen, E. (1993). *Fertilidad y Obstetricia Canina* (S. A. Acribia, Editorial (ed.)).
- Alvarez, J., & Storey, B. (1983). Epinephrine and Albumin Inhibit Lipid Peroxidation in Rabbit Spermatozoa and Protect Against Loss of Motility medium of Keyhani and Storey Haber-Weiss. *Biology of Reproduction*, *29*, 548–555.
- Andrade, A. (2005). Influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino. In *Universidad Complutense de Madrid*.
- Angrimani, D. S. R., Lucio, C. F., Veiga, G. A. L., Silva, L. C. G., Regazzi, F. M., Nichi, M., & Vannucchi, C. I. (2014). Sperm maturation in dogs: Sperm profile and enzymatic antioxidant status in ejaculated and epididymal spermatozoa. *Andrologia*, *46*(7), 814–819. <https://doi.org/10.1111/and.12154>
- Arango, J. D., Castrillón, V., Correa, N., Suarez, M., & Carrillo, D. F. (2020). Criopreservación de semen canino (*Canis familiaris*) en pajilla francesa en el municipio de Medellín, Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, *12*(1), e754. <https://doi.org/10.24188/recia.v12.n1.2020.754>
- Armas R., S., Fernández A., V., Vásquez C., M., & Santiani A., A. (2011). Determinación Del Tiempo Máximo Para Recuperar Y Criopreservar Espermatozoides Obtenidos De La Cola Del Epidídimo En Caninos Post Orquiectomía. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, *22*(3). <https://doi.org/10.15381/rivep.v22i3.257>
- Ávila-Portillo, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L., Gómez, C., Lozano, J., & Reguero, M. (2006). Fundamentos de la criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, *57*(4), 291–300.

- Bang, S., Qamar, A. Y., Tanga, B. M., Fang, X., & Cho, J. (2021). Resveratrol supplementation into extender protects against cryodamage in dog post-thaw sperm. *Journal of Veterinary Medical Science*, 83(6), 973–980. <https://doi.org/10.1292/jvms.21-0125>
- Bastianetto, S., Ménard, C., & Quirion, R. (2015). Neuroprotective action of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(6), 1195–1201. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.09.011>
- Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J., & Meyers, S. A. (2003). Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 24(4), 621–628. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02714.x>
- Beconi, M. T., Francia, C. R., Mora, N. G., & Affranchino, M. A. (1993). Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, 40(4), 841–851. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90219-U](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90219-U)
- Benítez-González, E., Chamba-Ochoa, H., Sánchez-Sánchez, E., Luzón-Cevallos, F., & Sánchez-Carrillo, J. (2018). Evaluación comparativa de dos métodos de recuperación espermática de epidídimos bovinos post-mortem. *Abanico Veterinario*, 8(1), 59–74. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21929/abavet2018.81.6>
- Benson, J. D., Woods, E. J., Walters, E. M., & Critser, J. K. (2012). The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*, 78(8), 1682–1699. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.007>
- Boitrelle, F., Albert, M., Theillac, C., Ferfour, F., Bergere, M., Vialard, F., Wainer, R., Bailly, M., & Selva, J. (2012). Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. *Journal of Andrology*, 33(6), 1371–1378. <https://doi.org/10.2164/jandrol.112.016980>
- Bóveda, P., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Estesó, M. C., López-Sebastián, A., Rizos, D., Bielli, A., Ungerfeld, R., & Santiago-Moreno, J. (2020). Ultra-rapid cooling of ibex sperm by spheres method does not induce a vitreous extracellular state and increases the membrane damages. *PLoS ONE*, 15(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227946>
- Branco, C. S., Garcez, M. E., Pasqualotto, F. F., Erdtman, B., & Salvador, M. (2010). Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*, 60(2), 235–237. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.10.012>
- Bucak, M. N., Ataman, M. B., Başpınar, N., Uysal, O., Taşpınar, M., Bilgili, A., Öztürk, C.,

- Güngör, S., Inanç, M. E., & Akal, E. (2015). Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: Sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. *Andrologia*, *47*(5), 545–552. <https://doi.org/10.1111/and.12301>
- Cerdeira, J., Sánchez-Calabuig, M. J., Pérez-Gutiérrez, J. F., Hijon, M., Castaño, C., & Santiago-Moreno, J. (2020). Cryopreservation effects on canine sperm morphometric variables and ultrastructure: Comparison between vitrification and conventional freezing. *Cryobiology*, *95*(March), 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.03.007>
- Cerdeira Lozano, J., Castaño, C., Sánchez-Calabuig, M.-J., & Santiago-Moreno, J. (2023). Epididymal Spermatozoa Show Higher Cryoresistance to Vitrification Process Than Ejaculated Spermatozoa in Dogs. *Biopreserv Biobank*, *21*(5), 527–532. <https://doi.org/https://doi.org/10.1089/bio.2022.0101>
- Chalons, P., Amor, S., Courtaut, F., Cantos-Villar, E., Richard, T., Auger, C., Chabert, P., Schni-Kerth, V., Aires, V., & Delmas, D. (2018). Study of potential anti-inflammatory effects of red wine extract and resveratrol through a modulation of interleukin-1-beta in macrophages. *Nutrients*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/nu10121856>
- Chohan, K. R., Griffin, J. T., & Carrell, D. T. (2004). Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia*, *36*(5), 321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2004.00626.x>
- Colenbrander, B., Gadella, B., & Stout, T. (2003). The Predictive Value of Semen Analysis in the Evaluation of Stallion Fertility. *Reprod Dom Anim*, *38*, 305–311.
- Condemayta Cutipa, D. (2017). Criopreservación de espermatozoides colectados del epidídimo de carneros criollos y viabilidad In vitro. In *Universidad Nacional del Altiplano*.
- Critser, J. K., Huse-Benda, A. R., Aaker, D. V., Arneson, B. W., & Ball, G. D. (1988). Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertility and Sterility*, *50*(2), 314–320. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)60079-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)60079-1)
- Cruz, I., Colmenares, M., Berrueta-Carrillo, L., Gomez-Perez, R., Montes, H., Berrueta, L., Salmen, S., & Osuna, J. A. (2010). Evaluación de la calidad del espermatozoide humano: Comparación entre la integridad del ADN espermático y variables del semen. *Investigacion Clinica*, *51*(1), 87–99.
- da Rosa Filho, R. R., Angrimani, D. S. R., Brito, M. M., Nichi, M., Vannucchi, C. I., & Lucio, C. F. (2021). Susceptibility of epididymal sperm against reactive oxygen

- species in dogs. *Animal Biotechnology*, 32(1), 92–99.  
<https://doi.org/10.1080/10495398.2019.1657126>
- Davis, R. O., & Gravance, C. G. (1993). Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. *Fertility and Sterility*, 59(2), 412–417. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)55686-6](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)55686-6)
- Eilts, B. E. (2005). Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology*, 64(3), 692–697.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.019>
- Esteso, M. C., Fernández-Santos, M. R., Soler, A. J., Montoro, V., Quintero-Moreno, A., & Garde, J. J. (2006). The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm heads. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(3), 241–246.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00676.x>
- Feldman, E., & Nelson, R. (2004). *Canine and feline endocrinology and reproduction* (Third). Elsevier Science. <http://www.elsevier.com>
- Ferrian, S. (2007). *Influencia de las características seminales del eyaculado de conejo sobre la calidad espermática post-descongelación*.  
<http://riunet.upv.es/handle/10251/12203>
- Flor, A. C., Doshi, A. P., & Kron, S. J. (2016). Modulation of therapy-induced senescence by reactive lipid aldehydes. *Cell Death Discovery*, 2(1).  
<https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.45>
- Galarza, D. A., Landi, G., Mejía, E., Samaniego, J. X., Méndez, S., Soria, M. E., ... & Santiago-Moreno, J. (2021). Cryopreservation of dog epididymal spermatozoa by conventional freezing or ultra-rapid freezing with nonpermeable cryoprotectant. *Cryobiology*, 103, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.10.002>
- Gambini, J., López-Gruoso, R., Olaso-González, G., Inglés, M., Abdelazid, K., El Alami, M., Bonet-Costa, V., Borrás, C., & Viña, J. (2013). Resveratrol: Distribución, propiedades y perspectivas. *Revista Espanola de Geriatria y Gerontologia*, 48(2), 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2012.04.007>
- Gamboa, S., Rodrigues, A. S., Henriques, L., Batista, C., & Ramalho-Santos, J. (2010). Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 73(7), 950–958.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.023>
- Gao, D. Y., Liu, J., Liu, C., MCGann, L. E., Watson, P. F., Kleinhans, F. W., Mazur, P., Critser, E. S., & Critser, J. K. (1995). Andrology: Prevention of osmotic injury to

- human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction*, 10(5), 1109–1122. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136103>
- Gardela, J., Ruiz-Conca, M., Palomares, A., Olvera-Maneu, S., García-Calvo, L., López-Béjar, M., Martínez-Pastor, F., & Álvarez-Rodríguez, M. (2023). Effect of Honey, Coenzyme Q10, and  $\beta$ -Carotene/ $\alpha$ -Tocopherol as Novel Additives in Rabbit-Sperm Cryopreservation Extender. *Animals*, 13(14), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ani13142392>
- Gessner, D. K., Ringseis, R., & Eder, K. (2017). Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(4), 605–628. <https://doi.org/10.1111/jpn.12579>
- Giaretta, E., Spinaci, M., Bucci, D., Tamanini, C., & Galeati, G. (2013). Effects of resveratrol on vitrified porcine oocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/920257>
- Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2 SPEC. ISS.), 445–457. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.024>
- Gloria, A., Zambelli, D., Carluccio, A., Cunto, M., Ponzio, P., & Contri, A. (2020). Is the protective effect of egg yolk against osmotic and cryogenic damage on dog spermatozoa dose-dependent? *Animal Reproduction Science*, 213(December 2019), 106259. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106259>
- Gobello, C., & Olivera, M. (2005). *El libro latinoamericano de reproducción canina y felina*. Editorial Biognesis.
- Gonzalez-Santos, J., Tadeo-Rosas, J., Ortega-Caramillo, C., Toledano, A., Vergara, M., & Avalos, A. (2013). Criopreservación de espermatozoides epididimales a diferentes tiempos postmortem en caninos. *Revista de Salud Animal.*, 35, 137–141. [https://www.researchgate.net/publication/262719878\\_Criopreservacion\\_de\\_espermatozoides\\_epididimales\\_a\\_diferentes\\_tiempos\\_postmortem\\_en\\_caninos](https://www.researchgate.net/publication/262719878_Criopreservacion_de_espermatozoides_epididimales_a_diferentes_tiempos_postmortem_en_caninos)
- Gonzalez, K., Mcvey, S., Cunnick, J., Udovichenko, I. P., & Takemoto, D. J. (1995). Acridine Orange differential staining of total DNA and RNA in normal and galactosemic lens epithelial cells in culture using flow cytometry. *Current Eye Research*, 14(4), 269–273. <https://doi.org/10.3109/02713689509033525>
- Graham, J. K., & Mocé, E. (2005). Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, 64(3), 492–504. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.006>
- Gravance, C. G., Garner, D. L., Baumber, J., & Ball, B. A. (2000). Assessment of equine

- sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*, 53(9), 1691–1703.  
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00308-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00308-3)
- Gravance, C. G., Vishwanath, R., Pitt, C., Garner, D. L., & Casey, P. J. (1998). Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *Journal of Andrology*, 19(6), 704–709.
- Grötter, L. G., Cattaneo, L., Marini, P. E., Kjelland, M. E., & Ferré, L. B. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4), 655–665.  
<https://doi.org/10.1111/rda.13409>
- He, W. hua, Zhai, X. hu, Duan, X. jun, & Di, H. shuang. (2020). Effect of resveratrol treatment on apoptosis and apoptotic pathways during boar semen freezing. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 21(6), 485–494.  
<https://doi.org/10.1631/jzus.B1900520>
- Hernández, C. L. B., & Mejía, R. B. (2007). Evaluación de la capacidad fecundante del semen canino congelado, comparando glicerol, etilenglicol y DMSO como crioprotectores en el diluyente tris glucosa. *Ciencia Unisalle*, 6–13.
- Hewitt, D. A., Leahy, R., Sheldon, I. M., & England, G. C. W. (2001). Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science*, 67(1–2), 101–111.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00090-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00090-2)
- Jiménez Vaquero, E. (2013). Aportaciones a la criopreservación del esperma del gato doméstico: Influencia de las soluciones crioconservadoras. *Universidad de Córdoba, España*, 183.  
<https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/10299/749.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Johnston, S., Root Kustritz, M., & Olson, P. (2001). *Canine and Feline Theriogenology* (Saunders (ed.)).
- Kawai, G. K. V., Gurgel, J. R. C., Losano, J. D. de A., Dalmazzo, A., Rocha, C. C., Tsunoda, R. H., Góes, P. A. de A., Rui, B. R., Angrimani, D. de S. R., Assumpção, M. E. O. D. A., Mendes, C. M., Barnabe, V. H., & Nichi, M. (2017). Susceptibility of Stallion Spermatozoa to Different Oxidative Challenges: Role of Seminal Plasma. *Journal of Equine Veterinary Science*, 55, 76–83.  
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.03.225>
- Kefer, J. C., Agarwal, A., & Sabanegh, E. (2009). Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *International Journal of Urology*, 16(5), 449–457.  
<https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2009.02280.x>
- Kessopoulou, E., Powers, H. J., Sharma, K. K., Pearson, M. J., Russell, J. M., Cooke, I.



- D., & Barratt, C. L. R. (1995). A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertility and Sterility*, 64(4), 825–831. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)57861-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)57861-3)
- Khemthongcharoen, N., Ruangpracha, A., & Sarapukdee, P. (2011). Acridine orange staining for cell analysis. *8th Asian Congress for Microcirculation, September 2020*.
- Kosowe, N. S., Katayose, H., & Yanagimachi, R. (1992). Thiol-Disulfide Status and Acridine Orange Fluorescence of Mammalian Sperm Nuclei. *Journal of Andrology*, 13(4), 342–348. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1992.tb00335.x>
- Kulkarni, S., & Canto, C. (2014). Molecular targets of resveratrol. *Biochimica Biophysica Acta-Mol.*
- Kuršvietienė, L., Stanevičienė, I., Mongirdienė, A., & Bernatoniene, J. (2016). Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina (Lithuania)*, 52(3), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.medici.2016.03.003>
- Lee, H. H., Kim, D. H., Lee, K. W., Kim, K. E., Shin, D. E., & An, B. K. (2019). Dietary effects of natural polyphenol antioxidant on laying performance and egg quality of laying hens fed diets with oxidized oil. *Revista Brasileira de Ciencia Avicola*, 21(1). <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2018-0791>
- Len, J. S., Koh, W. S. D., & Tan, S. X. (2019). The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. *Bioscience Reports*, 39(8). <https://doi.org/10.1042/BSR20191601>
- Leonard, S. S., Xia, C., Jiang, B. H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G. K., & Shi, X. (2003). Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309(4), 1017–1026. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.105>
- Li, S.-J., Su, W.-D., Qiu, L.-J., Wang, X., & Liu, J. (2018). Resveratrol protects human sperm against cryopreservation-induced injury. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 24(6), 499–503. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30173453/>
- Ligocka, Z., Partyka, A., Schäfer-somi, S., & Mucha, A. (2023). *Does Better Post-Thaw Motility of Dog Sperm Frozen with CLC Mean Better Zona Pellucida Binding Ability?* 1–14.
- Longobardi, V., Zullo, G., Salzano, A., De Canditiis, C., Cammarano, A., De Luise, L., Puzio, M. V., Neglia, G., & Gasparri, B. (2017). Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. *Theriogenology*, 88, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.046>

- Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J. G., & Casper, R. F. (1998). Reactive oxygen species: Potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 13(4), 896–900. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.4.896>
- Love, C. C., Thompson, J. A., Brinsko, S. P., Rigby, S. L., Blanchard, T. L., Lowry, V. K., & Varner, D. D. (2003). Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology*, 60(6), 1127–1138. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00122-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00122-5)
- Luo, H., Yang, A., Schulte, B. A., Wargovich, M. J., & Wang, G. Y. (2013). Resveratrol Induces Premature Senescence in Lung Cancer Cells via ROS-Mediated DNA Damage. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060065>
- Lv, C., Larbi, A., Wu, G., Hong, Q., & Quan, G. (2019). Improving the quality of cryopreserved goat semen with a commercial bull extender supplemented with resveratrol. *Animal Reproduction Science*, 208(July), 106127. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106127>
- Marnet, B., Vieitez, G., Milhet, P., Richoille, G., Lesourd, F., & Parinaud, J. (2000). Computer-assisted assessment of sperm morphology: Comparison with conventional techniques. *International Journal of Andrology*, 23(1), 22–28. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2000.00199.x>
- Mascotti, K., McCullough, J., & Burger, S. R. (2000). HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion*, 40(6), 693–696.
- Melnik, V. I., Bikbulatova, L. S., Gulyaeva, N. V., & Bazyan, A. S. (2001). Synaptic vesicle acidification and exocytosis studied with acridine orange fluorescence in rat brain synaptosomes. *Neurochemical Research*, 26(5), 549–554. <https://doi.org/10.1023/A:1010973214930>
- Meng, Q., Li, J., Wang, C., & Shan, A. (2023). Biological function of resveratrol and its application in animal production: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 14(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00822-z>
- Meng, T., Fukada, T., & Tonks, N. K. (2002). <Oxidation and inhibition of phosphatase activity.pdf>. 9, 387–399.
- Meng, T., Xiao, D., Muhammed, A., Deng, J., Chen, L., & He, J. (2021). Anti-Inflammatory Action and Mechanisms of Resveratrol. *Molecules*, 26(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26010229>
- Meyers, S. A. (2005). Spermatozoal response to osmotic stress. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4 SPEC. ISS.), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.026>

- Michael, A., Alexopoulos, C., Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Saratsis, P., & Boscos, C. (2007). Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, *68*(2), 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.053>
- NCBI. (2023). *PubChem Compound Summary for CID 62344, Acridine orange*. National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acridine-orange>.
- Nichi, M., Goovaerts, I. G. F., Cortada, C. N. M., Barnabe, V. H., De Clercq, J. B. P., & Bols, P. E. J. (2007). Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 °C. *Theriogenology*, *67*(2), 334–340. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.08.002>
- Nishiwaki, H., & Ogura, Y. (1995). Evaluation of leukocyte dynamics in retinal microcirculation. *Japanese Journal of Clinical Ophthalmology*, *49*(8), 1393–1397.
- Nordberg, J., & Arnér, E. S. J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, *31*(11), 1287–1312. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00724-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00724-9)
- Nouri, H., Shojaeian, K., Samadian, F., Lee, S., Kohram, H., & Lee, J. I. (2018). Using Resveratrol and Epigallocatechin-3-Gallate to Improve Cryopreservation of Stallion Spermatozoa With Low Quality. *Journal of Equine Veterinary Science*, *70*, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.07.003>
- Oettlé, E. (1993). Sperm morphology and fertility in the dog. *J Reprod Fertil Suppl.*, *47*(257), 60.
- Oettle, E. E. (1986). Changes in Acrosome Morphology During Cooling and. *Animal Reproduction Science*, *12*, 145–150.
- Ozmic, S., Ban-Frangez, H., & Stimpfel, M. (2023). Sperm Cryopreservation Today: Approaches, Efficiency, and Pitfalls. *Current Issues in Molecular Biology*, *45*(6), 4716–4734. <https://doi.org/10.3390/cimb45060300>
- Pannu, N., & Bhatnagar, A. (2019). Resveratrol: from enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *109*(November 2018), 2237–2251. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.075>
- Páramo, R., & Blacázar, J. (2005). *Manual de prácticas en manejo reproductivo de perros*. Departamento de Reproducción de la Universidad Nacional Autónoma de México. [https://fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales\\_2013/Manual](https://fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales_2013/Manual)

de Practicas de Profundizacion en Reproduccion Animal Perros.pdf

- Peña, A. (2000). *Flow Cytometry in the Assessment of Fresh and Frozen-Thawed Dog Semen, and the Effects of Different Cryopreservation Methods on Post-Thaw Sperm Survival and Longevity*.
- Perez-Osorio, J., Mello, F. G. ., Juliani, G. C., Lagares, M. A., Lago, L. A., Henry, M., Perez-Osorio, J., Mello, F. G. ., Juliani, G. C., Lagares, M. A., Lago, L. A., & Henry, M. (2018). Effect on post-thaw viability of equine sperm using stepwise addition of dimethyl formamide and varying cooling and freezing procedures. *Animal Reproduction (AR)* , 5(3), 103–109. <http://animal-reproduction.org/journal/animreprod/article/5b5a6076f7783717068b4797>
- Pervaiz, S., & Holme, A. L. (2009). Resveratrol: Its biologic targets and functional activity. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(11), 2851–2897. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2412>
- Pesch, S., Bostedt, H., Failing, K., & Bergmann, M. (2006). Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy. *Animal Reproduction Science*, 91(3–4), 285–298. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.04.004>
- Quintero-Moreno, A., Miró, J., Teresa Rigau, A., & Rodríguez-Gil, J. E. (2003). Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, 59(9), 1973–1990. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01297-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01297-9)
- Ramalho-Santos, J. . A. A. . S. P. . R. A. S. ;Martins. L. . B. M. . M. C. . T. R. . A. S. and G. S. (2007). Probing the Structure and Function of Mammalian Sperm using Optical and Fluorescence Microscopy. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*. Vol 1, January, 397–402. <http://www.formatex.org/microscopy3/pdf/pp394-402.pdf>
- Restrepo, G. B., Úsuga Suárez, A., Alberto Rojano, B., & . (2013). Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino Techniques for analyzing the potential fertility of stallion semen. *Rev CES Med Zootec*, 8(1), 69–81. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321428109006%0ACómo>
- Restrepo, G., Úsuga, A., & Rojano, B. (2013). Techniques for analyzing the potential fertility of stallion semen. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 8(1), 115–127.
- Restreto Betancur, G., Vasquez Araque, N., & Andres Garcia, E. (2009). Criopreservación de semen canino y su aplicación en la inseminación artificial. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 4(2), 119–129. <https://www.redalyc.org/pdf/3214/321428102012.pdf>

- Rigler, R. (2010). Fluorescence and single molecule analysis in cell biology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(1), 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.070>
- Root Kustritz, M. V., Olson, P. N., Johnston, S. D., & Root, T. K. (1998). The Effects of Stains and Investigators on Assessment of Morphology of Canine Spermatozoa. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 34(4), 348–352. <https://doi.org/10.5326/15473317-34-4-348>
- Sánchez R., A., & Bravo V., C. (2014). Efecto De La Adición De Fluido Prostático Autólogo Y Heterólogo Sobre La Calidad Espermática Del Semen Canino. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 24(4), 466–472. <https://doi.org/10.15381/rivep.v24i4.2745>
- Schaäfer, S., & Holzmann, A. (2000). The use of transmigration and Spermac<sup>TM</sup>stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 59(3–4), 201–211. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00073-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00073-7)
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Shin, S., Jeon, J. H., Park, D., Jang, M. J., Choi, J. H., Choi, B. H., Joo, S. S., Nahm, S. S., Kim, J. C., & Kim, Y. B. (2008). Trans-Resveratrol Relaxes the Corpus Cavernosum Ex Vivo and Enhances Testosterone Levels and Sperm Quality in Vivo. *Archives of Pharmacal Research*, 31(1), 83–87. <https://doi.org/10.1007/s12272-008-1124-7>
- Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2015). Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 20–26. <https://doi.org/10.1111/rda.12594>
- Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2016). Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*, 169, 2–5. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.004>
- Silva, E. C. B., Cajueiro, J. F. P., Silva, S. V., Soares, P. C., & Guerra, M. M. P. (2012). Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, 77(8), 1722–1726. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.023>
- Soler, A. J., Estes, M. C., Fernández-Santos, M. R., & Garde, J. J. (2005). Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5°C in the epididymis for several days. *Theriogenology*, 64(7), 1503–1517.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.03.013>

- Stojanović, S., Sprinz, H., & Brede, O. (2001). Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 391(1), 79–89. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2388>
- Stornelli, M., Stornelli, M., Arauz, M., & De la Sota, L. (2001). Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado aplicación y desarrollo en caninos. *Analecta Vet*, 58–66. [http://old.fcv.unlp.edu.ar/analecta/vol21n1/056\\_VE21n1\\_stornelli\\_inseminacion\\_caninos.pdf](http://old.fcv.unlp.edu.ar/analecta/vol21n1/056_VE21n1_stornelli_inseminacion_caninos.pdf)
- Stuart, C. C., Vaughan, J. L., Kershaw, C. M., de Graaf, S. P., & Bathgate, R. (2019). Effect of diluent type, cryoprotectant concentration, storage method and freeze/thaw rates on the post-thaw quality and fertility of cryopreserved alpaca spermatozoa. *Scientific Reports*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49203-z>
- Tejerina, F., Morrell, J., Petterson, J., Dalin, A.-M., & Rodriguez-Martinez, H. (2009). Routine assessment of motility of ejaculated stallion spermatozoa using a novel computer-assisted motility analyzer (Qualisperm™). *Animal Reproduction*, 6(2), 380–385. <http://www.biophos.com>
- Towler, M. C., & Hardie, D. G. (2007). AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circulation Research*, 100(3), 328–341. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000256090.42690.05>
- Truong, V. L., Jun, M., & Jeong, W. S. (2018). Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *BioFactors*, 44(1), 36–49. <https://doi.org/10.1002/biof.1399>
- Tvrđá, E., Kováčik, A., Tušimová, E., Massányi, P., & Lukáč, N. (2015). Resveratrol offers protection to oxidative stress induced by ferrous ascorbate in bovine spermatozoa. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 50(14), 1440–1451. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.1071153>
- Van Der Horst, G., & Maree, L. (2009). SpermBlue®: A new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis. *Biotechnic and Histochemistry*, 84(6), 299–308. <https://doi.org/10.3109/10520290902984274>
- Vázquez, J. M., Martínez, E., Martínez, P., & Roca, J. (1995). El test de endosmosis como prueba para evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática de

- los espermatozoides de verraco. *Dpto. Patología Animal (Reproducción y Obstetricia)*, 413–415.
- Verstegen, J., Igner, M., & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, *57*, 149–179. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00664-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00664-1)
- Vieira, N. de M. G., Losano, J. D. de A., Angrimani, D. de S. R., Kawai, G. K. V., Bicudo, L. de C., Rui, B. R., da Silva, B. do C. S., Assumpção, M. E. O. D. A., & Nichi, M. (2018). Induced sperm oxidative stress in dogs: Susceptibility against different reactive oxygen species and protective role of seminal plasma. *Theriogenology*, *108*, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.020>
- Wakamatsu, T. H., Dogru, M., Matsumoto, Y., Kojima, T., Kaido, M., Ibrahim, O. M. A., Sato, E. A., Igarashi, A., Ichihashi, Y., Satake, Y., Shimazaki, J., & Tsubota, K. (2013). Evaluation of lipid oxidative stress status in Sjögren syndrome patients. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *54*(1), 201–210. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10325>
- Walker, J., Schueller, K., Schaefer, L. M., Pignitter, M., Esefelder, L., & Somoza, V. (2014). Resveratrol and its metabolites inhibit pro-inflammatory effects of lipopolysaccharides in U-937 macrophages in plasma-representative concentrations. *Food and Function*, *5*(1), 74–84. <https://doi.org/10.1039/c3fo60236b>
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, *60–61*, 481–492. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)
- Woelders, H., Matthijs, A., & Engel, B. (1997). Effects of Trehalose and Sucrose, Osmolality of the Freezing Medium, and Cooling Rate on Viability and Intactness of Bull Sperm after Freezing and Thawing. *Cryobiology*, *35*(2), 93–105. <https://doi.org/10.1006/cryo.1997.2028>
- Woods, E. J., Benson, J. D., Agca, Y., & Critser, J. K. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, *48*(2), 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.03.002>
- Yan, Y., Yang, J. Y., Mou, Y. H., Wang, L. H., Zhou, Y. N., & Wu, C. F. (2012). Differences in the activities of resveratrol and ascorbic acid in protection of ethanol-induced oxidative DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(2), 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.10.046>
- Zhang, R., Dong, H., Zhao, P., Shang, C., Qi, H., Ma, Y., Gao, C., Zhang, D., Shen, J., Lei, Y., Jin, Y., & Lin, P. (2022). Resveratrol and lycium barbarum polysaccharide

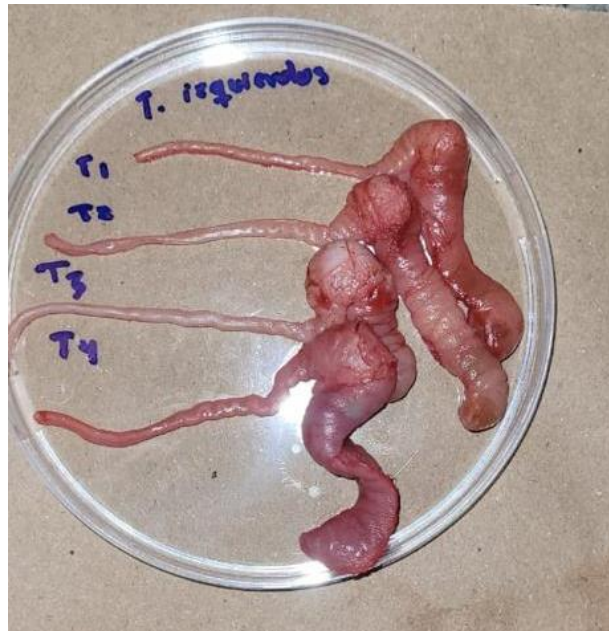
improve Qinling giant panda (*Ailuropoda melanoleuca Qinlingensis*) sperm quality during cryopreservation. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03122-2>

Zhu, Z., Li, R., Fan, X., Lv, Y., Zheng, Y., Hoque, S. A. M., Wu, D., & Zeng, W. (2019). Resveratrol Improves Boar Sperm Quality via 5'AMP-Activated.pdf. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.



## Anexos

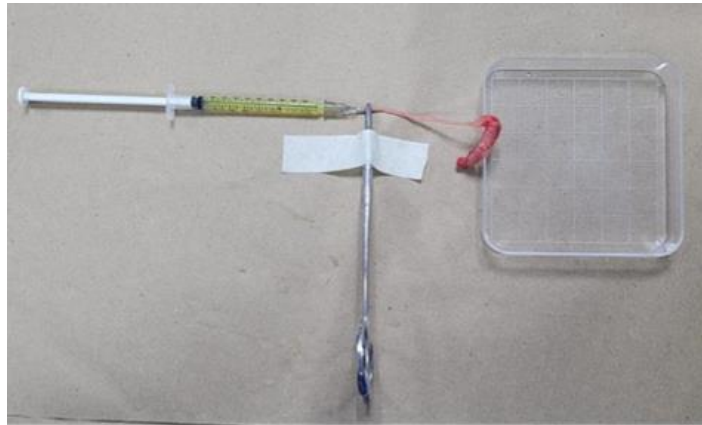
**Anexo A.** Epidídimos obtenidos mediante orquiectomía



**Anexo B.** Separación del testículo para facilitar la extracción de semen.



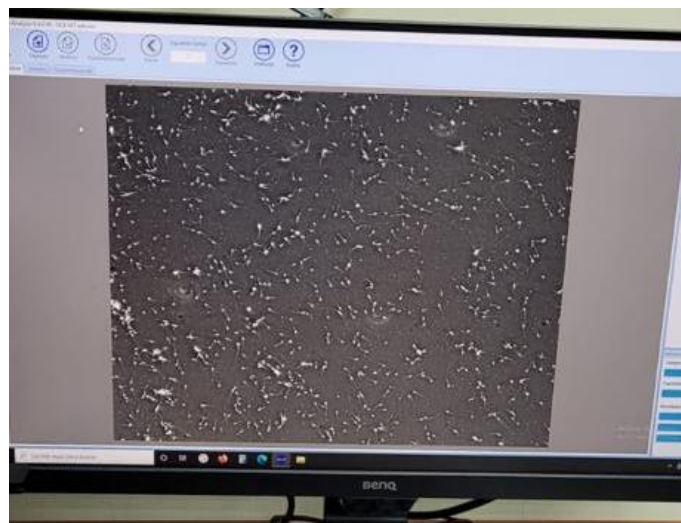
**Anexo C.** Flujo retrógrado: Técnica utilizada para la recuperación de semen.



**Anexo D.** Tubos endorf (1.5 ml) con pools obtenidos de las diferentes muestras.



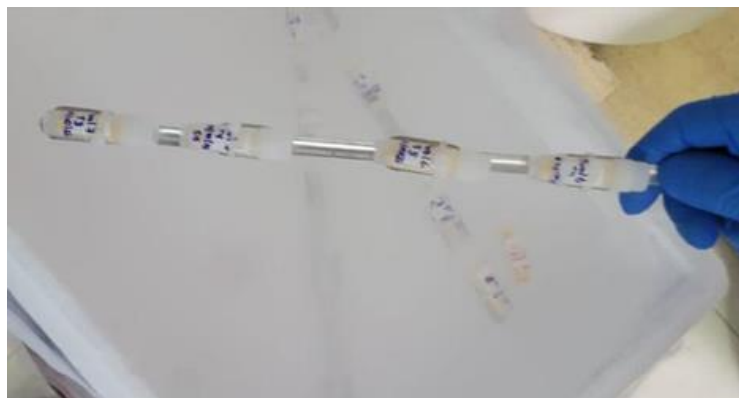
**Anexo E.** Evaluación espermática en el sistema CASA previo a la congelación y vitrificación de las muestras.



**Anexo F.** Proceso de vitrificación para la obtención de pellets.



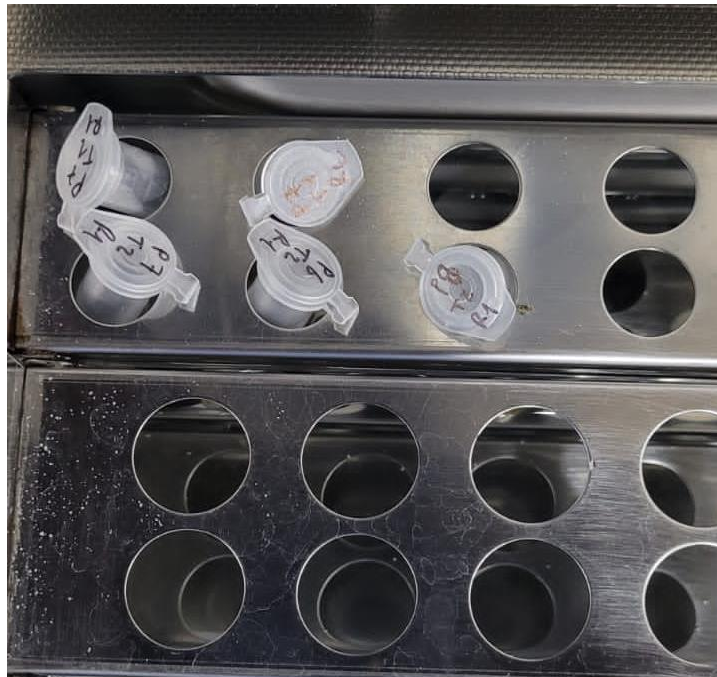
**Anexo G.** Almacenamiento de pellets en criotúbulos, posteriormente en los portagoblets para su conservación en nitrógeno líquido.



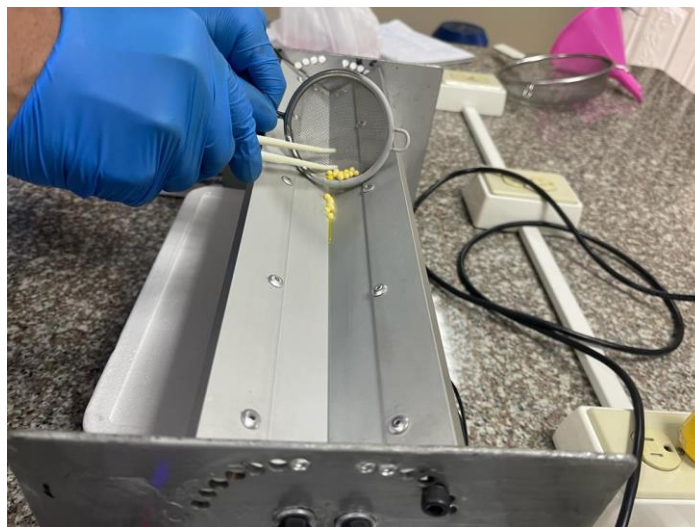
**Anexo H.** Pajuelas de 0.25 microlitros previo al almacenamiento y congelación de las muestras.



**Anexo I.** Semen descongelado a baño maría (37°C) previo al análisis de motilidad.



**Anexo J.** Calentamiento de pellets a 65°C.



**Anexo K.** Calentamiento de la muestra para los posteriores análisis morfológicos.



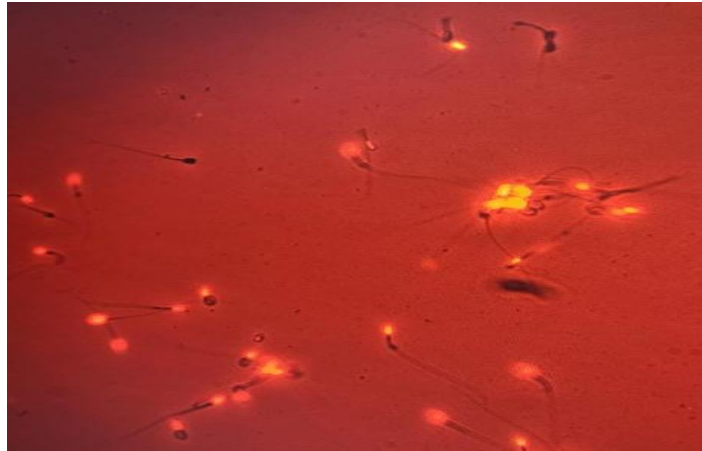
**Anexo L.** Muestras listas para centrifugación y posterior análisis.



**Anexo M.** Tinción de naranja de acridina.



**Anexo N.** Resultados obtenidos tras la tinción de naranja de acridina.



**Anexo O.** Fijación con Sperm blue: medirá el estrés oxidativo de los espermatozoides.

