

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA  
VETERINARIA**



“Efecto citotóxico del ácido hipocloroso en espermatozoides  
de caballo *equus caballus*”

Juan Manuel Seminario Lozano

Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

Asesor: Mg. Hugo Mauricio Gonzales Molfino

Lima, Perú 2020

Dedico esta tesis a mis padres, hermanas y mi abuela por su apoyo durante todos estos años. Sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Los quiero mucho.

## **Agradecimientos**

A mis padres Juan y Lilian por siempre darme su apoyo y estar ahí para mí, por tu todo su esfuerzo para poder lograr esta meta.

A mi abuela por sus consejos y su amor incondicional a lo largo de su vida.

A mi hermanas Lilian y Carla por su paciencia y apoyo a lo largo de todos estos años de carrera.

A mi asesor Mauricio Gonzales por su ayuda durante la realización de la tesis. Le agradezco infinitamente.

Al comandante Rodobel Olmos por brindarme las facilidades y su dedicación en la recolección de muestras. Muchas Gracias

A toda la tropa del Hospital veterinario Central del ejército por su colaboración al momento de tomar las muestras.

A los caballos que contribuyeron a que se realización de esta tesis.

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
Resumen.....	
Abstract.....	
1. Introducción.....	8
2. Planteamiento del problema.....	9
3. Justificación.....	10
4. Objetivos	
4.1 Objetivos generales.....	11
4.2 Objetivos específicos.....	11
5. Marco teórico	
5.1 Composición y estructura del espermatozoide.....	12
5.2 Fisiología del espermatozoide.....	13
5.2.1 Espermatogenesis.....	13
5.2.2 Análisis Seminal en equinos.....	14
5.3 Tipos de colecta de semen	
5.3.1 Vagina artificial.....	16
5.3.2 Métodos alternativos para colecta de semen.....	17
5.4 Desinfectantes más usados en reproducción equina.....	18
5.5 Actividad desinfectante y mecanismo de acción del Ácido hipocloroso.....	18
5.6 Usos terapéuticos del Ácido hipocloroso.....	19
5.7 Efectos nocivos del Ácido hipocloroso en espermatozoides.....	20
5.7.1 Estrés oxidativo y ERO.....	20
6. Antecedentes de la investigación.....	21
7. Hipótesis.....	23
8. Materiales y métodos	
8.1 Fecha y lugar de ejecución.....	23
8.2 Tipo y diseño de la investigación.....	23
8.3 Variables.....	23
8.4 Operacionalización de las variables.....	24
8.5 Población y muestra.....	24
8.6 Materiales y equipos.....	24
8.7 Procedimientos y análisis de datos.....	25
9. Resultados.....	27
10. Discusión.....	31
11. Conclusiones.....	33

12. Recomendaciones.....	34
13. Bibliografía.....	35
14. Anexos.....	39

## Resumen

Las células reproductoras son bastantes sensibles a muchos factores como el pH, temperatura y microorganismos patógenos, a este último se le da menor importancia en laboratorios de reproducción animal. Los antisépticos mayormente usados para desinfección de material de reproducción como el óxido de etileno y yodo povidona presentan gran corrosividad y un amplio tiempo residual lo que originaría daño a las células reproductoras. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto citotóxico del ácido hipocloroso (HCl), un potente antiséptico el cual se espera comprobar su toxicidad a 3 concentraciones (3.2 mg/ml, 6.4 mg/ml y 10mg/ml) en espermatozoides de caballo. Para el estudio se evaluaron 10 sementales y para el procesamiento de las muestras se realizó un espermatograma para cada muestra obtenida, se analizó la motilidad, vitalidad, concentración y morfología. Luego se comparó las muestras exponiéndolas a 3 concentraciones de HCl evaluando la citotoxicidad con los parámetros de motilidad y vitalidad a 3 tiempos diferentes. Los resultados fueron procesados en Microsoft Excel. Encontramos que el HCl a una concentración de 3.2mg/ml genera una mortalidad del 98.1% comparado con una mortalidad promedio control de 54.6%. En cuanto a la motilidad a la misma concentración de 100 espermatozoides, 2.4% fueron de tipo in situ y el 97.6 fueron inmóviles Los parámetros mayor afectados fueron los de motilidad PLR y motilidad PLL con un valor de 0%. En cuanto a la relación tiempo- efecto del HCl la vitalidad se vio afectada en un 100% desde los 5 minutos de exposición a una concentración de 3.2mg/ml. Concluyendo que el HCl es citotóxico y atenúa las células espermáticas de caballo en concentraciones bajas ya que en el análisis seminal existieron diferencias significativas en el grupo con exposición y sin exposición.

**Palabras claves:** Acido hipocloroso (HCl), citotoxicidad, motilidad, vitalidad, equino.

## **Abstract**

The reproductive cells are quite sensitive to many factors such as pH, temperature and pathogenic microorganisms, the latter being less important in animal reproduction laboratories. The antiseptics mostly used for disinfection of reproductive material, such as ethylene oxide and povidone iodine, present high corrosivity and a long residual time, which would cause damage to reproductive cells. The objective of this study is to evaluate the cytotoxic effect of hypochlorous acid (HCl), a powerful antiseptic that is expected to prove its low toxicity at 3 concentrations (3.2 mg / ml, 6.4 mg / ml and 10 mg / ml) in horse sperm. For the study, 10 stallions were evaluated and for the processing of the samples a spermatogram was made for each sample obtained, the motility, vitality, concentration and morphology were analyzed. The samples were then compared by exposing them to 3 concentrations of HCl evaluating cytotoxicity with the parameters of motility and vitality at 3 different times. The results were processed in Microsoft Excel. We found that HCl at a concentration of 3.2mg / ml generates a mortality of 98.1% compared to an average control mortality of 54.6%. Regarding motility at the same concentration of 100 sperm, 2.4% were of the in situ type and 97.6 were immobile. The parameters most affected were those of PLR motility and PLL motility with a value of 0%. Regarding the time relationship - effect of HCl, vitality was affected by 100% after 5 minutes of exposure at a concentration of 3.2mg / ml. Concluding that HCl is cytotoxic and attenuates horse sperm cells in low concentrations, since in the seminal analysis there were significant differences in the group with and without exposure.

**Key words:** Hypochlorous acid (HCl), cytotoxicity, motility, vitality, equine

## 1. INTRODUCCION

La inseminación artificial se ha desarrollado enormemente en los últimos años debido a las ventajas que aporta a la producción equina, podemos destacar entre ellas el aumento del número de yeguas cubiertas por cada semental, la mejora de los índices de concepción de algunos sementales y de yeguas subfértiles, la posibilidad de mejorar el almacenamiento y transporte del semen y la disminución de los accidentes en los animales y las personas ocurridos durante la cubrición.

La colecta de semen es una técnica común en la reproducción equina y se emplea para diagnosticar la infertilidad, evaluar la capacidad reproductiva y en la inseminación artificial con semen fresco o congelado. (Serres, 2015)

Uno de los mayores errores al momento de realizar técnicas de reproducción es la ineficiente desinfección del material reproductivo y esto suele ser perjudicial para las células que van a contener como lo son óvulos y espermatozoides. El acumulo de bacterias en el material de reproducción y el uso de la concentración inadecuada de antiséptico puede repercutir en un daño en la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides que en combinación con su fosfolípido adecuado, es un requisito previo importante para la fecundación exitosa del ovocito. (Serna 2011)

El ácido hipocloroso (HCl) es muy usado como antiséptico, presenta un mecanismo de oxidación y se cree que el oxígeno molecular es liberado por la acción del ácido sobre las enzimas y el metabolismo de las bacterias y sobre el ácido nucleico de las bacterias y los virus. El ácido hipocloroso tiene la capacidad de oxidar el aminoácido taurina e inducir la formación de cloro-aurina la cual posee actividad antimicrobiana de amplio espectro y larga duración y es la principal responsable del efecto antimicrobiano del ácido hipocloroso. (Lafaurie et al 2015.).

El presente proyecto busca determinar el efecto citotóxico del ácido hipocloroso frente al espermatozoide del caballo lo que al comprobarse su nula toxicidad permitiría el desarrollo de mejoras en protocolos de desinfección de material bioreproductivo

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad se vienen incrementando técnicas reproductivas teniendo mayor relevancia en la especie equina. Un ejemplo de ello es el uso masivo de la inseminación artificial (IA) ya sea por semen fresco o congelado en donde se busca tener el mayor porcentaje de efectividad cuidando las células reproductoras ya que son altamente sensibles al pH, temperatura y contaminación biológica que como sabemos al ser material biológico es altamente sensible a la contaminación de hongos, bacterias y virus. Este factor no es tomado debidamente en cuenta ya que en algunos centros de reproducción no se realiza de manera correcta la desinfección y no se llevan a cabo protocolos específicos para la desinfección de material reproductivo.

La contaminación de material bioreproductivo puede influir en la efectividad de las técnicas reproductivas y este desconocimiento podría ser una causa por el cual no se realicen protocolos de bioseguridad. Los desinfectantes mayores usados en nuestro medio no cubren con un alto margen microbicida por ejemplo el alcohol de 70°. También la relación costo-beneficio suele ser un factor importante al momento de adquirir un desinfectante en un laboratorio. Otra causa en el limitado uso de desinfectantes es desconocer su toxicidad y tiempo residual como es el uso de óxido de etileno muy usado en nuestro medio el cual ha demostrado ser altamente mutagenico.

Incluir nuevos desinfectantes como el ácido hipocloroso surge como una alternativa pero no hay estudios previos sobre el uso del desinfectante en material bioreproductivo por ende la información sobre toxicidad del ácido hipocloroso sobre células reproductoras es muy limitada.

No establecer protocolos efectivos puede tener consecuencias importantes como la disminución de la tasa de fertilidad que es lo que se busca en las técnicas reproductivas. Otras consecuencias es el tiempo residual que puedan tener algunos desinfectantes y la toxicidad sobre células sexuales altamente sensibles. Algunos desinfectantes pueden afectar directamente al ser humano ya que como se desconoce el óxido de etileno, muy usado en nuestro medio, tiene efectos cancerígenos e irrita los ojos y las mucosas

Con el uso del ácido hipocloroso y al comprobarse su baja citotoxicidad se pretende proponer un protocolo de limpieza y asepsia de los equipos que se utilizan en la colecta de semen equino y proporcionar una mayor tasa de efectividad en las técnicas de reproducción realizadas en nuestro país.

### 3. JUSTIFICACION

Esta investigación se realiza ya que surge la necesidad de mejorar los protocolos de desinfección de material reproductivo destinado a la inseminación artificial equina. Esta es una técnica muy usada hoy día destinada al mejoramiento genético que ofrece numerosas ventajas, con la mayor difusión de sementales de alto valor, eliminando la necesidad de desplazar las yeguas con los problemas que pueda suponer, evita enfermedades de transmisión venérea, disminuye los gastos de cubrición en muchas ocasiones, evita la sobre utilización de un semental, permite la utilización de un semental ubicado lejos de la yegua e incluso muerto, etc.

Un aspecto muy importante a considerar es que al trabajar con material biológico siempre existirán microorganismos como bacterias, hongos y algunos virus que disminuirán la efectividad de estos procedimientos por ello es necesario cumplir con protocolos de desinfección o esterilización que cumplan con eliminar en su gran mayoría a estos agentes patógenos.

Debido a que los desinfectantes usados actualmente en nuestro medio presenta una serie de desventajas como es no cumplir con un amplio margen microbicida, relación costo beneficio, ser toxico y corrosivo, entre otros. Surge la idea de establecer nuevos protocolos con nuevos desinfectantes.

El ácido hipocloroso ha evidenciado la seguridad y escasa toxicidad del ácido hipocloroso, con la exposición en ratones de forma oral, dérmica aguda, ocular, inhalatoria, intravenosa e intraperitoneal. Durante el tiempo de la prueba no se presentó mortalidad, ni signos de lesiones en los análisis macro y microscópicos de los órganos en los animales en estudio a ninguna de las concentraciones evaluadas. (Calderón J. L et al 2010) Cabe resaltar que este estudio no evidencia la toxicidad en células reproductoras y por ende se desconoce su efecto citotoxico en espermatozoides.

Para introducir al acido hipocloroso dentro de los protocolos de desinfección de material bioreproductivo de caballos es indispensable conocer su efecto citotoxico en células reproductoras y el fin de este estudio es evaluar su citotoxicidad en espermatozoides equinos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general:**

Evaluar la citotoxicidad del ácido hipocloroso en espermatozoides de caballo (*equus caballus*)

### **4.2 Objetivos específicos:**

- Evaluar que parámetros seminales se ven mayor afectados frente al ácido hipocloroso.
- Determinar que concentración de ácido hipocloroso (10 mg/ml, 6.4 mg/ml y 3.2 mg/ml) puede causar mayor daño espermático.
- Identificar si existe relación tiempo-efecto del ácido hipocloroso.

## 5. MARCO TEORICO

### 5.1. Composición y estructura del espermatozoide

Todo el espermatozoide está contenido en la membrana plasmática, la cual se ensancha en áreas especializadas y forma el componente más externo del espermatozoide. Permanece intacta, excepto en la región del acrosoma previo a la fertilización o como resultado de la muerte del espermatozoide (Davies, 1999).

La membrana plasmática del espermatozoide es heterogénea y tiene cinco dominios específicos: el acrosoma, segmento ecuatorial, basal, pieza media y cola (Aurich, 2005). La composición lipídica y proteica de cada membrana es única y ocurre muy poco o nada de intercambio de lípidos o proteínas entre ellas. Esta compartimentalización ocurre durante la espermatogénesis y se mantiene durante las modificaciones en el epidídimo, permite que cada membrana desarrolle su función específica. (McKinnon y Voss, 1995).

Estructuralmente se compone de tres capas o zonas: bicapa lipídica, interfase fosfolípidos-agua y glycocalix. (McKinnon y Voss, 1995).

La bicapa lipídica esta subdividida en fosfolípidos polares, que se orientan de tal forma que los grupos de cabezas polares hidrofílicas están situadas externamente y las cadenas de ácidos grasos orientadas internamente unas a otras. La mayoría de los lípidos presentes son fosfolípidos y colesterol, en una razón de 0.64:0.36. La cantidad de colesterol, relativo al fosfolípido, determina la fluidez de la membrana. En general mientras más alta la concentración relativa de los fosfolípidos, más fluida es la membrana. El colesterol, por lo tanto, actúa junto con proteínas integrales, como un estabilizador asegurando una configuración laminar de los fosfolípidos y de la bicapa. Es sabido que la concentración de colesterol varía entre las zonas de la membrana plasmática, siendo más alta en la región del acrosoma (Davies, 1999).

La siguiente área de la membrana es la interfase agua-fosfolípido, que es la unión entre los grupos de cabezas polares hidrofílicas de la capa lipídica y el medio circundante (principalmente agua) y en el cual se encuentra el glycocalix. (Davies, 1999)

El glycocalix es una capa externa de polisacáridos del espermatozoide equino. Su función exacta no es clara, pero se piensa que está involucrado en antigenicidad, adherencia celular y permeabilidad específica. Es sabido que dentro del glycocalix existen uniones para proteínas periféricas. Estas proteínas son provenientes del plasma seminal y actúan estabilizando al espermatozoide durante su paso por el tracto masculino y femenino. También pueden estar involucradas en la capacitación (Davies, 1999).

## **5.2. Fisiología del espermatozoide**

El espermatozoide es considerado la célula más especializada de todas, ha evolucionado hasta llegar a ser diferente de los demás tipos celulares, la particularidad de tener una cabeza la cual contiene la información genómica, una pieza media con mitocondrias que da movilidad al flagelo, son características que dan una diversidad morfológica entre las especies, no todos los espermatozoides son iguales y no todos llevan los procesos de capacitación y reacción acrosomal al mismo tiempo dentro del aparato reproductor de la hembra. Por ello es importante conocer los procesos que sufren los espermatozoides desde su producción hasta los cambios bioquímicos que desencadenan la interacción con el ovocito para dar lugar a la fertilización. (Hafez, et al 2002)

De Vos y col. 2003, indicaron que la morfología anormal (teratozoospermia) de los espermatozoides puede afectar drásticamente la fecundación, desarrollo embrionario e implantación. Para realizar la evaluación de la morfología espermática se han publicado diversos criterios, clasificándolas en dos: las primarias cuando reflejan anomalías producidas en el testículo, y secundarias cuando toman lugar durante el tránsito a través del sistema ductal o cuando se producen como consecuencia de errores de manejo del semen a partir del momento de la obtención del mismo (Jurado y col., 2008)

### **5.2.1 Espermatogénesis**

La espermatogénesis es el desarrollo y transformación de las células gaméticas del macho, este proceso está controlado por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo y este proceso se lleva a cabo de forma cíclica en los túbulos seminíferos la duración del ciclo depende de cada especie. El ciclo espermatogénico consta de tres fases:

Espermatocitogénesis, que consiste en divisiones mitóticas sucesivas de las espermatogonias para dar lugar a los espermatocitos primarios. (Hafez et al 2002).

Meiosis, que consiste en la división meiótica de los espermatocitos primarios que generan a los espermatocitos secundarios y posteriormente a las espermátides. (Hafez et al 2002).

Espermiogénesis, es la diferenciación morfológica y fisiológica de las espermátides a espermatozoides. El estudio de la morfología espermática ha tenido gran importancia al proporcionarnos parámetros que nos permiten lograr una adecuada selección de espermatozoides que garanticen resultados exitosos en tratamientos de reproducción asistida. La morfología espermática es uno de los parámetros más importantes de selección y se correlaciona con el potencial de fertilidad. (Hafez et al 2002).

### 5.2.2 Análisis seminal en equinos

La evaluación microscópica se realiza a 37°C y se analizan parámetros seminales que nos indicaran una buena calidad seminal: Concentración, Motilidad, y Morfología. (Mellisho 2010)

- **Concentración:**

El cálculo del número total de espermatozoides es importante ya que éste es uno de los parámetros más usados para estimar la fertilidad de un padrillo aunque esté sujeto a múltiples factores de variación, como por ejemplo: estación del año, frecuencia de servicios, edad, tamaño testicular, etc. El modelo de Neubauer es el más utilizado. La cámara de Neubauer posee un retículo central para el recuento de glóbulos rojos y un retículo periférico especial para el de glóbulos blancos. El retículo central consta de 16 cuadrados grandes separados entre sí por triples líneas excepto en dos de sus bordes, es decir que 7 cuadrados poseen en uno de los contornos líneas simples. Estos cuadrados grandes están divididos en 16 cuadraditos cada uno. Por lo tanto existen en total 256 cuadraditos. Esta cámara posee dos compartimentos reticulados independientes, por lo tanto se realiza el recuento en las dos cámaras y se promedia el resultado. (Mellisho 2010)

Para realizar el recuento, una alícuota de 10 µl de semen, es diluida con 4 ml (4000 µl) de una solución espermicida que mata los espermatozoides rápidamente (solución formolada o BSF). El grado de dilución es 1/200. La muestra diluida y bien homogeneizada se carga en una micropipeta. Después de esperar 5 minutos se enfoca a 100 x y se comienza el recuento. Se deben contar los espermatozoides contenidos en 80 cuadraditos o sea en 5 cuadrados grandes. Deben contarse los cuadrados grandes separados por triples líneas, evitando los 7 de los bordes que carecen de esta característica. Para estandarizar el conteo, en cada cuadradito chico se contarán los espermatozoides en él contenidos y aquellos cuyas cabezas se encuentren sobre los bordes superior e izquierdo, sin contar los que se encuentran sobre los bordes inferior y derecho. (Mellisho 2010)

La concentración de espermatozoides se obtiene según la siguiente fórmula:  $\text{Conc. esp./mm}^3 = A \times B \times C \times D \times E \times F$

A: número de espermatozoides contados.

B: inversa del tamaño del cuadradito ( $400 \text{ mm}^2$ )

C: inversa de la dilución realizada (200)

D: altura de la cámara (0.1 mm)

E: 10: se multiplica por 10 para que el resultado quede expresado en  $1 \text{ mm}^3$

F: número de cuadraditos contados (80) Una fórmula abreviada sería: realizar el conteo en las dos cámaras y promediarlos. Este valor se multiplica por 200 (inversa de la dilución) y por 50 (factor de corrección que incluye la superficie del cuadradito, número de cuadraditos contados y altura de la cámara). El resultado queda expresado como: número de espermatozoides por  $\text{mm}^3$ . Si quisiéramos expresar el resultado por mililitro sólo debemos multiplicar por 1000, es decir por 103. (Mellisho, 2010)

- **Motilidad**

La movilidad espermática refleja la viabilidad de un eyaculado. Por lo general se realiza la estimación visual de la motilidad colocando una gota de semen puro entre porta y cubre objetos y observando sobre platina térmica a  $37^\circ\text{C}$  con microscopio óptico. Aunque la estimación es bastante subjetiva, el personal experimentado puede realizar un análisis muy aceptable de la movilidad progresiva. Es interesante comparar y registrar el porcentaje de movilidad progresiva de la muestra sin diluir y luego del agregado de diluyente. (Mellisho, 2010)

- **Vitalidad**

La estimación de esta característica se puede realizar mediante una tinción en base a eosina 5 % y nigrosina 10% (Método de BLOM), la técnica consiste en mezclar una gota de semen, dos gotas de nigrosina y una gota de eosina sobre un portaobjeto, homogenizar bien y hacer un frotis sobre un porta objeto a  $37^\circ\text{C}$ . El resultado se expresa en porcentaje de espermatozoides no teñidos (vivos). Los espermatozoides muertos se tiñen rojos; (Díaz y Arancibia 1971). El nivel máximo de espermatozoides muertos aceptados en el eyaculado de potro medido por este método, no debe superar el 40 % y porcentajes inferiores al 20 % deberían ser calificados como muy buenos (Díaz y Díaz 1989).

- **Morfología:**

Para la evaluación de la morfología espermática se realizan extendidos sobre una porta objetos y se dejan secar al aire. Existen distintas tinciones para realizar sobre estos extendidos: Casarett, Wright's, May Grunwald-Giemsa, hematoxilina-eosina, nigrosina, Diff-Quick, etc. Las muestras así fijadas se deben observar con ayuda de un microscopio de contraste de fase o de contraste diferencial-interferencial (DIC). El número total de espermatozoides morfológicamente normales en un eyaculado puede proporcionar más información y correlación respecto de la fertilidad de un padrillo que el porcentaje o el número absoluto de espermatozoides morfológicamente anormales. (Mellisho, 2010)

### **5.3 Tipos de Colectas de Semen**

En la actualidad, normalmente el semen es recolectado mediante vagina artificial montando el caballo sobre una yegua o maniquí. Sin embargo, cuando esto no es posible existen otras posibilidades, puede recolectarse con vagina artificial en el suelo, mediante estimulación manual del pene, mediante condón o usando productos farmacológicos. (Estévez et al 2009)

#### **5.3.1 Vagina artificial:**

Se trata de un instrumento que intenta reproducir las condiciones naturales de la vagina de la yegua para estimular en el macho la eyaculación cuando se le introduce el pene en ésta. En especial intenta reproducir tres condiciones, temperatura, presión y lubricación. Existen muchos modelos distintos de vagina artificial, todas intentan reproducir las citadas condiciones. En todos los casos se trata de un cilindro rígido o flexible con una cubierta interior de igual o distinto material (normalmente látex) que crea una cámara dentro de la cual se introduce agua caliente para lograr las condiciones idóneas de temperatura y presión. La lubricación se consigue colocando un lubricante que debe colocarse sólo en el primer tercio para evitar que contamine el semen. La temperatura interior de la vagina debe estar entre los 40 y 47°C. Pueden utilizarse distintos tipos de recipientes de recogida, aunque los más utilizados son recipientes de plástico comercializados con este fin o biberones. Es importante también la asepsia de todo el material y que esté protegido de la luz solar directa, que así mismo afecta a los espermatozoides. (Estévez et al 2009)

### **5.3.2 Métodos alternativos para la recogida de semen:**

El Condón: Ocasionalmente algún semental acostumbrado a la monta natural rehúsa totalmente la colección de semen mediante vagina artificial, siendo entonces posible utilizar este método. Se coloca en el pene del caballo un condón de látex y se le permite cubrir una yegua en celo por monta natural. Inmediatamente tras la eyaculación, cuando el pene se exterioriza de la vagina, debe retirarse el condón. (Estévez et al 2009)

Inducción farmacológica de la eyaculación: En algunos casos, debido a la imposibilidad física del semental para la monta y la cópula, es posible la obtención de semen mediante productos farmacológicos. El eyaculado recogido de esta forma suele tener un volumen pequeño pero una concentración muy elevada, pudiéndose utilizar para congelarlo o en un programa de inseminación artificial con semen fresco o refrigerado con una fertilidad normal. Para su aplicación es muy importante que el semental esté tranquilo. Un posible protocolo sería la administración de 2.0mg/Kg de imipramina hidrocloreuro intravenosa. Si no se produce la erección y eyaculación en los 15 minutos siguientes se administrará 0.2-0.3 mg/Kg. de xilacina intravenosa. Si se utiliza xilacina sola la eyaculación normalmente se produce sin masturbación, cuando el caballo inicia el periodo de sedación y prolapsa el pene cuando se está recuperando de la sedación. (Estévez et al 2009)

Manipulación manual del pene: La masturbación manual puede ser útil en algunos caballos con problemas en la monta o en la erección. Este método requiere de alguien con destreza en su aplicación. Tiene como ventajas la ausencia de contacto con la yegua y que no es necesario ningún tipo de equipamiento especializado. La estimulación puede realizarse con el animal en el suelo o encima de un maniquí hasta la eyaculación. Los caballos a los que se aplique este método deben ser tranquilos y estar habituados a su manipulación. (Estévez et al 2009)

Recolección en el suelo: Es útil en animales con problemas motores que dificulten la monta o en animales que sin ningún problema aparente, ante la yegua entrar en erección pero no montan en ella de ninguna manera. (Estévez et al 2009)

Recolección de semen epididimario: Es útil en caballos vivos con problemas obstructivos de las vías genitales posteriores al epidídimo o en caballos muertos recientemente puede plantearse también la recogida de semen de la cola y la porción distal del cuerpo del epidídimo. El semen obtenido puede ser de gran calidad y ser perfectamente útil para la congelación. Aunque debe realizarse en un centro con cierta experiencia. (Estévez et al 2009)

#### 5.4 Desinfectantes usados en reproducción equina

**Alcohol al 70%:** Es un bactericida rápido más que bacteriostático contra formas vegetativas de bacterias. También tiene acción fungicida y virucida, pero no destruyen las esporas bacterianas. Reseca la piel, lesiona el epitelio y provocan ardor cuando se aplican sobre heridas abiertas. (Guerra, 2008)

**Yodo Povidona:** Es un compuesto químico entre la Polivinilpirrolidona (PVP) y el Yodo o el ion Triioduro, con una fórmula específica, de la cual dependen muchas de sus propiedades. La solución jabonosa resulta útil para el lavado de manos antiséptico y para el baño pre quirúrgico de los pacientes. Tiene corta acción residual. Además de las bacterias Gram positivas y Gram negativas, elimina virus hongos, protozoos y levaduras. Puede presentar toxicidad (Guerra, 2008)

**Gluconato de clorhexidina al 4 %:** Es un antiséptico jabonoso de amplio espectro, bactericida eficaz contra gérmenes Gram positivos y Gram negativos. Es también efectivo contra hongos y virus. Su efecto germicida es rápido y prolongado. Tiene una importante acción residual sobre la piel, entre tres y seis horas. No es tóxico y puede usarse en recién nacidos. (Guerra 2008)

**Óxido de etileno:** Actúa como agente alquilante, provocando una modificación irreversible en enzimas e inhiben la actividad su actividad. Es activo contra todo tipo de bacterias, incluyendo esporas bacterianas, virus y bacilos tuberculosos. Por otro lado es altamente tóxico para los seres vivos, pudiendo provocar reacciones locales sobre piel y mucosas y efectos tóxicos sistémicos con manifestaciones clínicas como disnea, cianosis, trastornos gastrointestinales, hemólisis, necrosis. (Instrumentación UPC 2011)

#### 5.5 Actividad desinfectante del Ácido hipocloroso y mecanismo de acción

El Ácido hipocloroso biológicamente, se clasifica dentro de un grupo de pequeñas moléculas conocidas como especies reactivas del oxígeno (ERO) sintetizadas por células del sistema inmune (neutrófilos y macrófagos) en un proceso inmunológico conocido como "estallido respiratorio", durante la fagocitosis de antígenos (Weiss, 1989).

Cuando un patógeno invade los tejidos, los polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos son activados y la fagocitosis de los antígenos es el resultante del ensamblaje e inicio del estallido respiratorio, mediado por la NADPH oxidasa en la membrana del fagolisosoma. A su vez grandes cantidades de oxígeno molecular son utilizadas para producir radicales libres. NADPH oxidasa, induce una reducción de oxígeno molecular ( $O_2$ ) catalizado en la membrana del fagosoma produciendo el anión superóxido. (Lekstrom-Himes & Gallin, 2000; Mainnemare et al., 2004)

En cuanto al mecanismo de acción del ácido hipocloroso este provoca la oxidación de los aminoácidos, oxidando los grupos –SH (sulfhidrilo) y disulfuros (SS) de las paredes bacterianas. Altera su proceso de respiración y nutrición. Inhibe la síntesis de proteínas. Altera el metabolismo de los microorganismos disminuyendo drásticamente la producción de ATP lo que provoca la ruptura de su membrana celular eliminando al microorganismo (García, 2015) El ácido hipocloroso es el componente activo del hipoclorito de sodio sin sus efectos adversos (Gray et al 2013)

El ácido hipocloroso tiene un amplio rango de acción es efectivo contra bacterias vegetativas, esporas y virus. La desinfección con ácido hipocloroso está basada en un mecanismo de oxidación y se cree que el oxígeno molecular es liberado por la acción del ácido sobre las enzimas y el metabolismo de las bacterias y sobre el ácido nucleico de las bacterias y los virus. El ácido hipocloroso tiene la capacidad de oxidar el aminoácido taurina e inducir la formación de cloro-aurina la cual posee actividad antimicrobiana de amplio espectro y larga duración y es la principal responsable del efecto antimicrobiano del ácido hipocloroso. (Lafaurie et al 2015.).

## **5.6 Usos terapéuticos del ácido hipocloroso**

Los usos del ácido hipocloroso inician en la Primera Guerra Mundial con los estudios de Alexis Carrel y Henry Dakin quienes obtuvieron una solución de hipoclorito de sodio acidificado y tamponado (solución de Dakin), el cual generaba concentraciones ideales de HCl, la cual fue utilizada exitosamente para desinfección de heridas (Levine, 1991). La solución de Dakin modificada a una concentración del 0,025% mostró ser terapéuticamente efectiva como apósito en el manejo de heridas ya que preserva las propiedades terapéuticas con la eliminación del efecto tóxico potencial en la cicatrización de heridas (Hegggers et al, 1991).

El ácido hipocloroso ha sido evaluado como antiséptico en desinfección de heridas de piel. El ácido hipocloroso obtenido por electrólisis de sales ha mostrado ser efectivo en eliminación de esporas persistentes de *Bacillus anthracis* y *Clostridium difficile* en manos y piel. La utilidad del ácido hipocloroso también ha sido evaluada en el tratamiento de úlceras y lesiones de piel que tienden a hacer a una lenta y deficiente cicatrización. (Nerandzic et al., 2013)

Usos en odontología: Soluciones ácido hipocloroso han sido desarrolladas para uso odontológico para irrigación en endodoncia. El Aquatine (irrigante a base de ácido hipocloroso ha sido comparado con el hipoclorito de sodio y la efectividad antimicrobiana y de remoción de barrillo dentinario del Aquatine mostró un comportamiento similar al del hipoclorito de sodio al 6% cuando fueron acompañados con una irrigación con EDTA. Sin embargo, el Aquatine fue superior al hipoclorito de sodio en términos de biocompatibilidad, convirtiéndose en una alternativa segura para la irrigación y desinfección de los conductos radiculares (García et al 2015)

## 5.7 Efectos nocivos del ácido hipocloroso en espermatozoides

En la actualidad, la calidad espermática ha tomado una gran relevancia debido a que se ha conseguido efectuar mayor capacidad de fecundación lo que se traduce en una eficiencia reproductiva y por lo tanto mayores ganancias para el productor, por lo que es necesaria una buena conservación del semen. (Duchens, 1999)

En los seres humanos la motilidad y viabilidad de los espermatozoides está directamente relacionada con la capacidad fecundante de estos. Estos parámetros se ven afectados por los que son las especies reactivas de oxígeno (ERO). (Hernández et al 2010)

El ácido hipocloroso forma parte de las ERO (Especies Reactivas de Oxígeno) y estas pueden dañar proteínas, ácidos nucleicos y causar la pérdida de la movilidad espermática y con ello afectar la fertilidad. Debido al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), los espermatozoides humanos son especialmente sensibles al daño por ERO, y al parecer el  $H_2O_2$  es el más tóxico de estos agentes químicos para estas células. (Feldman, 2015)

### 5.7.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO) y Estrés oxidativo

Las ERO pueden tener efectos beneficiosos así como también perjudiciales sobre las funciones espermáticas, lo cual depende de la naturaleza y la concentración de la especie involucrada, así como del momento y el sitio de exposición.

El estrés oxidativo es causado por la formación de gran cantidad de especies reactivas al oxígeno (ERO). En este grupo se incluye a un grupo de especies químicas que sin ser radicales libres, son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno solo, el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito y los hidroperóxidos orgánicos (Venereo,2002).

Ellas pueden clasificarse desde el punto de vista químico en radicalarias y no radicalarias, de las cuales las más importantes son el radical anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $OH^-$ ) y el óxido nítrico (NO) y se conocen como no radicalarias el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el ácido hipocloroso (HCl) y el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ). Estas especies químicas se producen como consecuencia del metabolismo celular del oxígeno durante procesos fisiológicos o en respuesta a factores exógenos. (Hernández-Matos Janet, 2010)

## 6. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION

El ácido hipocloroso ha sido sometido a diversas pruebas en animales de laboratorio (ratas wistar y conejos nueva Zelanda) con el fin de evidenciar su seguridad y escasa toxicidad. Basados en las guías para la evaluación de la toxicidad aguda de una solución de la Environmental Protection Agency (EPA), se diseñó un estudio para hallar la DL50 (dosis simple de una sustancia que se espera pueda causar muerte en el 50% de los animales tratados), evaluando toxicidad oral aguda, dérmica aguda, ocular, inhalatoria, intravenosa e intraperitoneal. Brevemente, se utilizaron 10 ratas jóvenes adultas por cada una de las 3 concentraciones a evaluar (5000, 2500 y 1250 mg/ kg de peso). El producto se dosificó según protocolo y se observaron los animales durante 5 horas por 14 días (2 veces/día) con el objeto de determinar signos de toxicidad o muerte. Durante el tiempo de la prueba no se presentó mortalidad, ni signos de lesiones en los análisis macro y microscópicos de los órganos en los animales en estudio a ninguna de las concentraciones evaluadas. (Calderón J. L et al 2010)

Análisis cuantitativos demostraron que al activar  $1 \times 10^6$  neutrófilos se producen aproximadamente  $2 \times 10^{-7}$  mol de ácido hipocloroso durante una incubación de dos horas, esta cantidad es capaz de destruir 150 millones de Escherichia coli (Weiss, 1989)

Los procesos de investigación desarrollados en Colombia durante más de 15 años en la química del cloro, han permitido la estabilización y optimización de la molécula de ácido hipocloroso (HCl). Un compuesto de amplio espectro antimicrobiano y alto perfil de seguridad. Debido a su eficacia a concentraciones iguales o superiores de 0.1% y pH 4.2, se postula como una importante herramienta en la desinfección de alto nivel en el medio hospitalario. Además su baja concentración de sólidos probablemente minimice los daños por corrosión ocasionados a los materiales utilizados en la práctica médica y de laboratorio clínico; alteraciones que normalmente genera el hipoclorito de sodio. (Calderón, 2010)

En un estudio se demostró que el HCl tiene un efecto antimicrobiano de amplio espectro en concentraciones que van desde 0,1 a 2,8 mg/ml en un periodo de exposición de 2 min. Esta actividad microbicida, a pesar de ser más efectiva para formas bacterianas que para esporas y hongos, y abarca microorganismos clínicamente relevantes como lo son bacterias Gram negativas, Gram positivas, parásitos y hongos (Wang et al 2007)

El ácido hipocloroso a 1000 y 2000 ppm (1mg/ml y 2mg/ml) no fue efectivo como sustancia desinfectante de material odontológico ya que disminuyó al mínimo la carga bacteriana producida por enterobacterias. (Bustos, 2018)

Un estudio realizado en el año 2002 evaluó la actividad bactericida del ácido hipocloroso sobre cinco cepas bacterianas causantes de infección intrahospitalaria (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*), utilizando la técnica de Kelsey Maurer en condiciones controladas de temperatura, concentración del ácido hipocloroso y tiempo de acción, además de modificaciones con adición de albúmina al 5% como interferente biológico. Se determinó que el ácido hipocloroso es efectivo al 99.9% a concentraciones iguales o mayores a 900 ppm, luego de 5 minutos de acción para todas las cepas estudiadas, a diferentes rangos térmicos, con y sin la adición de interferentes, mostrando la gran efectividad del ácido hipocloroso. (Henaó et al 2003)

## 7. HIPOTESIS

### Hipótesis nula

El ácido hipocloroso no presenta efecto citotóxico a bajas concentraciones en espermatozoide de equino.

### Hipótesis alternativa

El ácido hipocloroso presenta efecto citotóxico a bajas concentraciones en espermatozoide de equino.

## 8. MATERIALES Y METODOS

### 8.1 Fecha y Lugar de ejecución:

La colecta de semen de caballos se realizó en el Hospital Veterinario Central del Ejército en Chorrillos. La parte experimental se ejecutó en el Laboratorio 78 de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma durante el periodo de Febrero- Marzo 2020.

### 8.2 Tipo y diseño de investigación:

- Diseño experimental porque existe una medición de variables evaluando concentraciones en tiempos diferentes y consecuentemente el diseño estadístico está en función de los tratamientos e interacciones.

### 8.3 Variables

- **Variable dependiente:** Parámetros seminales: motilidad, vitalidad, concentración, morfología.
- **Variable independiente:** Concentraciones de Ácido Hipocloroso, tiempo.

## 8.4 Operacionalización de las variables

VARIABLES	CONCEPTUALIZACIÓN	TIPO DE VARIABLE	INDICADOR	INSTRUMENTO	RANGO
<b>Concentración</b>	Concentración de espermatozoides para cada muestra	Cuantitativa continua	Millones (x10 <sup>6</sup> )	espermatoograma	Millones de espermatozoides
<b>Motilidad</b>	Cantidad de espermatozoides con diferentes tipos de motilidad.	Cuantitativa Discreta	Porcentaje	espermatoograma	%móviles
<b>Vitalidad</b>	Cantidad de espermatozoides vivos y muertos	Cuantitativa discreta	Porcentaje	espermatoograma	% vivos
<b>Morfología</b>	Conteo de espermatozoides normales y anormales.	Cuantitativa discreta	Porcentaje	espermatoograma	% normales %anormales
<b>Tiempo</b>	Tiempo en los que se produce la mortalidad de espermatozoide	Cuantitativa discreta	Minutos	Cronometro	5 min 10 min

## 8.5 Población y muestra

La población está constituida por 100 caballos del Hospital Veterinario Central del Ejército, estos están distribuidos en caballerizas individuales de machos sementales utilizados para reproducción, yeguas gestantes, yeguas lactantes y corrales de caballos que ya no prestan servicio al Ejército. Las muestras frescas de semen fueron colectadas de 10 potros sementales que oscilan entre las edades de 7 a 11 años.

## 8.6 Materiales y Equipos

Para la colecta de semen, el mantenimiento y el procesamiento de las muestras se utilizó una vagina artificial modelo Missouri, guantes de látex, guante de palpación, gel, jabón neutro, alcohol al 90%, un Equitainer, tubos Eppendorf, un microscopio 3S Cientific YJ-2016TL, una pipeta automática, una platina térmica, una cámara Neubauer, reactivo eosina, jeringas de 1 y 5 ml, guantes de látex, suero fisiológico, portaobjetos y cubreobjetos y ácido hipocloroso 6.4 mg/ml y 10 mg/ml.

## 8.7 Procedimiento y análisis de datos

Para la colecta se utilizó una yegua a la que se preparó realizándole un seguimiento ecográfico adecuado para hacer un diagnóstico preciso del celo, adicionalmente algunos signos como el guiño vulvar de la yegua y los reflejos de Flehmen en el semental fueron complementos ideales para una correcta colecta. Antes de realizar la colecta se procedió a realizar el protocolo de limpieza que consistió en el lavado del pene del caballo 2 veces con un jabón de pH neutro.

Para la colecta de semen se utilizó una vagina artificial modelo Missouri que está constituida por un forro de látex doble termo sellado que forma una doble cámara en donde mediante una válvula se introduce el agua para proveer la presión y temperatura adecuadas, se empleó una temperatura de 42 °C. (Estévez et al 2009) En el momento previo a la colecta la vagina artificial se lubricó con una pequeña cantidad de gel.

Se tomaron 2 muestras por día durante 10 días. Las muestras obtenidas fueron colocadas en tubos Eppendorf e identificadas con el nombre del caballo. Las muestras fueron colocadas en un Equitainer para mantener las muestras a una temperatura y trasladadas al Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas URP para su procesamiento y fueron mantenidas en una platina térmica a 37°C

Para el procesamiento de las muestras se realizó un espermograma control para cada muestra obtenida, en las que se analizó la motilidad, vitalidad, concentración y morfología.

Para la evaluación de la toxicidad del ácido hipocloroso se utilizaron 3 concentraciones. Dos concentraciones, de 6.4 mg/ml y 10 mg/ml, fueron obtenidas gracias al Laboratorio Eca quien proporciona el ácido hipocloroso al mercado. La tercera concentración se obtuvo diluyendo 1:1 la concentración de 6.4 mg/ml con suero fisiológico.

Cada muestra de semen equino paso por la exposición de ácido hipocloroso a las 3 concentraciones: 3,2 mg/ml, 6.4 mg/ml y 10mg/ml. Seguido se realizó la comparación del grupo control con los 3 tratamientos analizando la motilidad y vitalidad espermática expresado en porcentajes. Para la motilidad se contabilizaron 100 células en 3 campos y se evaluaron 4 tipos: Motilidad Progresiva Lineal rápida (PLR), Motilidad Progresiva Lineal Lenta, (PLL), Motilidad in situ, Inmóviles. Para la vitalidad se utilizó la colorante eosina y se contabilizaron 100 células. Las que se tiñeron se consideraron muertas y las que no se tiñeron se consideraron como vivas. Para identificar si existe relación tiempo- efecto se realizó una incubación de 5 y 10 minutos para las 10 muestras control. Y una exposición de 5 y 10 minutos para las 10 muestras con los 3 tratamientos.

### **Procedimiento para recolección de datos**

Los datos que se registraron, como ejemplar, grupo control vitalidad y motilidad tratamientos vitalidad y motilidad (Progresiva lineal rápida, progresiva lineal lenta, espermatozoides in situ y espermatozoides inmóviles) vita fueron pasados a una base de datos en Microsoft Office Excel para su procesamiento.

### **Procesamiento de la información**

- Prueba de Ley de signos y Kruskalwalis.
- Gráficas en Excel y Word

## 9 . RESULTADOS

Se utilizaron 10 caballos que fueron sometidos a colecta de semen en el Hospital Veterinario Central del Ejército y el procesamiento de la muestra se realizó en el Laboratorio de Reproducción y Biotecnología Animal de la Universidad Ricardo Palma. Respecto a la edad, el promedio fue de 8 años. En cuanto al volumen del eyaculado el promedio fue de 45 cc. La concentración espermática presento un promedio de 566 millones/mililitro y en cuanto a la morfología, un promedio presento 92.5 % de espermatozoides normales y un 7.5 de espermatozoides anormales.

Para evaluar que parámetros seminales se ven mayor afectados se realizó un análisis seminal de vitalidad y motilidad control para cada muestra.

En cuanto al parámetro de vitalidad, el conteo de espermatozoides vivos tuvo un promedio de 54.6% y una mortalidad de 45.4%. En relación al parámetro de motilidad, la motilidad PLR fue de 56.9%, la motilidad PLL fue de 7.8%, la motilidad in situ de 9.4 y los espermatozoides inmóviles un 25.9. Se expuso al ácido hipocloroso en 3 concentraciones. (3.2, 6.4 y 10 mg/ml) y se obtuvieron nuevos porcentajes en los parámetros seminales.

Con el primer tratamiento (3.2mg/ml) la vitalidad promedio fue de 1.9% y una mortalidad de 98.1%. En cuanto a la motilidad promedio la motilidad PLR fue de 0%, la motilidad PLL fue de 0%, la motilidad in situ de 2,4% y los espermatozoides inmóviles 97.6%

Con el segundo tratamiento (6.4mg/ml) la vitalidad promedio fue de 0% y la mortalidad del 100%. En cuanto a la motilidad promedio, la motilidad PLR fue de 0%, la motilidad PLL fue de 0%, la motilidad in situ de 0% y los espermatozoides inmóviles 100%

Con la aplicación del tercer tratamiento (10 mg/ml) la vitalidad promedio fue de 0% y la mortalidad del 100%. En cuanto a la motilidad promedio, la motilidad PLR fue de 0%, la motilidad PLL fue de 0%, la motilidad in situ de 0% y los espermatozoides inmóviles de 100%

Para validar cual es la concentración que causo mayor daño espermático, se analizó el grupo control y luego se comparó con las muestras expuestas a las 3 concentraciones de ácido hipocloroso.

Se obtuvo que la media de los espermatozoides sin exposición al ácido hipocloroso fue de 54.6% y muertos 45.4%.

Con la concentración de 3,2 mg/ml de ácido hipocloroso la media de vivos fue de 1.9% y de muertos 98.1%.

Para la concentración de 6.4 y 10 mg/ml la media de vivos fue de 0% y de muertos el 100%

Para identificar si existe relación tiempo efecto en cuanto a la vitalidad espermática, el grupo control y las muestras expuestas con el ácido hipocloroso a las 3 concentraciones fueron incubados por 5 y 10 minutos. La vitalidad fue expresada en medias.

En cuanto a la vitalidad espermática control, esta presento un 54.6 % a los 0 minutos, 43.8% a los 5 minutos y un 35,1% a los 10 minutos de incubación. Aproximadamente muere el 20% de espermatozoides cada 5 minutos.

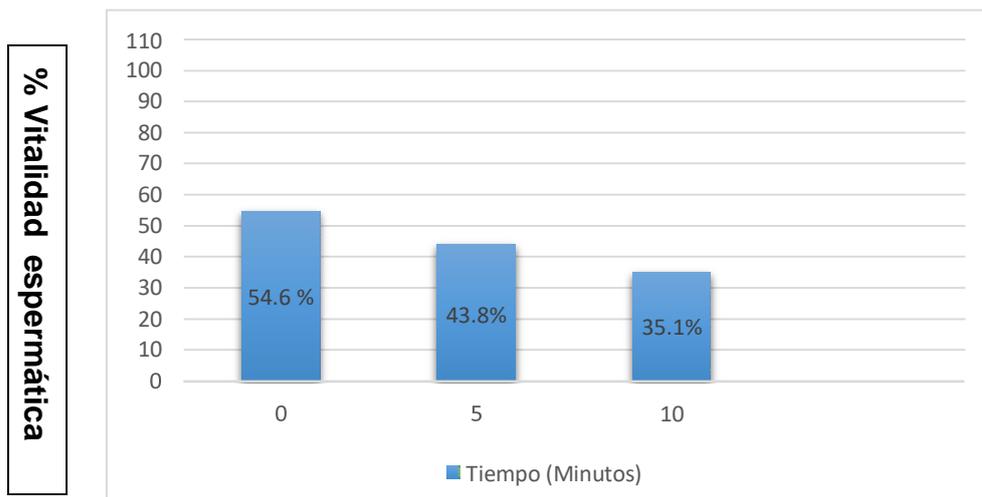


Grafico 1. Vitalidad espermática control a diferentes tiempos de incubación.

Utilizando la primera concentración (3.2 mg/ml) la vitalidad espermática presento un 1.9% a los 0 minutos, 0% a los 5 minutos y 0% a los 10 minutos de exposición. El 100% de espermatozoides murieron a los 5 minutos de exposición.

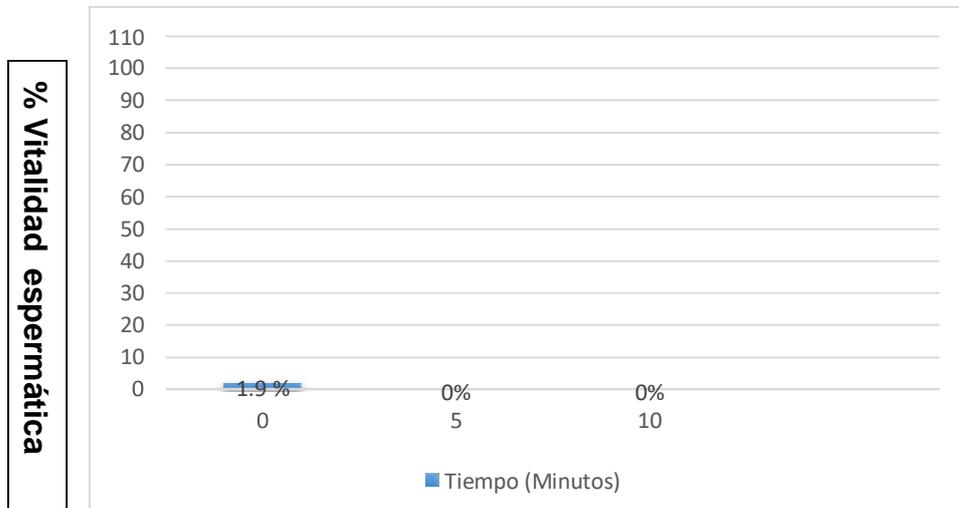


Grafico 2. Vitalidad espermática con el ácido hipocloroso a 3.2 mg/ml a diferentes tiempos de exposición

Utilizando la segunda concentración (6.4 mg/ml) y tercera concentración (10 mg/ml) en ambos casos la vitalidad espermática presento un 0% a los 0 minutos, 0% a los 5 minutos y 0% a los 10 minutos de exposición.

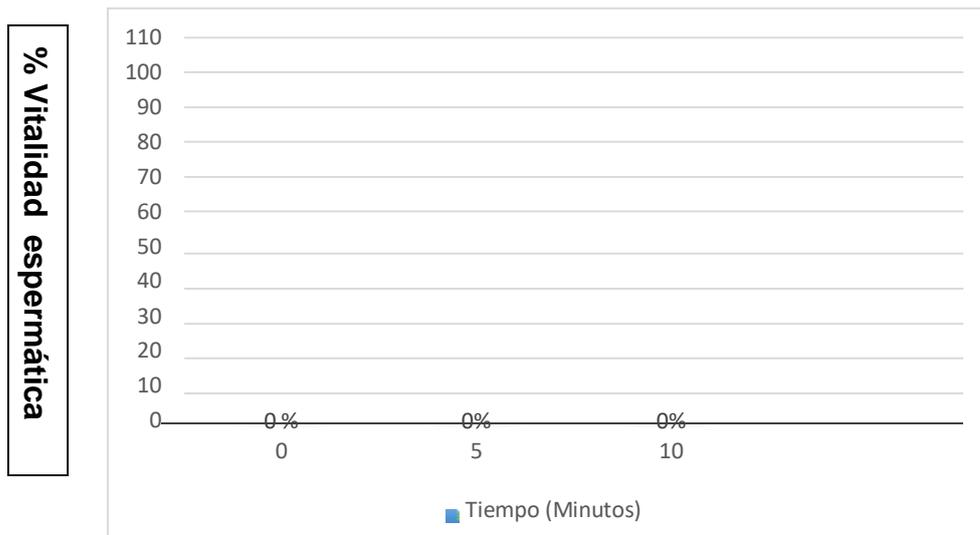


Grafico 3. Vitalidad espermática con el ácido hipocloroso a 6.4 y 10 mg/ml a diferentes tiempos de exposición

Se realizó la prueba de t student para vitalidad, para comparar el grupo control y el grupo expuesto al HCL, sabiendo que mi hipótesis nula es que no existen diferencias significativas entre ambos grupos y mi hipótesis alternativa es que si existen diferencias significativas entre ambos grupos. Dado que la diferencia entre ambos grupos es significativa y dado el valor de  $t = -22.5$  ( $p < 0.02$ ) aceptamos la hipótesis alternativa.

Para comparar los parámetros de motilidad utilizamos la prueba de Kruskalwalis para dos grupos.

En el primer caso para los resultados de motilidad in situ control y los resultados de la motilidad con la exposición del ácido hipocloroso a 3.2 mg/ml. Para determinar si existen diferencias entre los mismos se aplicó un nivel de confianza del 95%. El valor  $H = 17.21$  ( $p < 0.05$ ) nos indica que nuestra hipótesis es nula y aceptamos la hipótesis alternativa ya que existen diferencias significativas entre los mismos.

En el segundo caso para los resultados de % espermatozoides inmóviles control y % espermatozoides inmóviles con la exposición del ácido hipocloroso a 3.2 mg/ml. Para determinar si existen diferencias entre los mismos se aplicó un nivel de confianza del 95%. El valor  $H$  ( $p < 0.05$ ) nos indica que nuestra hipótesis es nula y aceptamos la hipótesis alternativa ya que existen diferencias significativas entre los mismos.

## 10. DISCUSIÓN

Una de las características del ácido hipocloroso es su gran potencial como antimicrobiano sin embargo presenta un efecto citotóxico a las concentraciones que ofrece el mercado. En nuestro trabajo encontramos que el HCL a una concentración de 3.2mg/ml genera una mortalidad espermática del 98.1% comparado con una mortalidad promedio de 54.6% en 10 caballos sementales. En nuestro estudio también se comprobó que la citotoxicidad del ácido hipocloroso a la misma concentración afecta significativamente la motilidad espermática ya que de 100 espermatozoides, 2.4% fueron de tipo in situ y el 97.6 fueron inmóviles comparados con una motilidad viéndose mayor afectados la motilidad tipo in situ de 9.4% y espermatozoides inmóviles en 25.9%

A partir de los resultados encontrados, aceptamos la hipótesis alternativa que establece que el ácido hipocloroso causa efecto citotóxico en espermatozoide de equino.

Estos resultados guardan relación con lo que sostiene Feldman (2015) quien señala que las Especies reactivas de oxígeno (ERO) como el ácido hipocloroso pueden dañar proteínas, ácidos nucleicos y causar pérdida de la motilidad espermática afectando la fertilidad. Debido al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados los espermatozoides humanos son sensibles al daño por ERO. Los lipoperóxidos y sus productos de degradación son altamente tóxicos para las células sexuales masculinas y provocan daños irreversibles en la motilidad.

Esto es acorde con lo que en nuestro estudio se señala; mas lo que Feldman no especifica en su estudio es a que concentraciones puede generarse la alteración o daño espermático por las ERO y cabe resaltar que su estudio realizado es en humanos a comparación con este estudio que fue realizado en caballos y la mínima concentración de ácido hipocloroso que ocasiono daño espermático fue ligeramente inferior a las que ofrecía el mercado.

En lo que respecta al estudio hecho por Calderón J.L en el 2010 pruebas hechas en animales de laboratorio (ratas Wistar) con el fin de evidenciar su seguridad y escasa toxicidad, se diseñó un estudio para hallar la dosis simple de un sustancia que se espera pueda causar muerte en el 50% de los animales tratados, evaluando toxicidad oral aguda, dérmica aguda, ocular, inhalatoria, intravenosa e intraperitoneal. Brevemente, se utilizaron 10 ratas jóvenes adultas por cada una de las 3 concentraciones a evaluar (5000, 2500 y

1250 mg/ kg de peso). El producto se dosificó según protocolo y se observaron los animales durante 5 horas por 14 días (2 veces/día)

Durante el tiempo de la prueba no se presentó mortalidad, ni signos de lesiones en los análisis macro y microscópicos de los órganos en los animales a ninguna de las concentraciones evaluadas, y por más que estas fueran bastante elevadas ya que un ratón aproximadamente pesa 20 gramos y la dosis media usada fue de 2500 mg/kg. Quiere decir que cada ratón fue expuesto a 50 mg/ml de HCl, cabe resaltar que la exposición no fue directamente a una célula como en nuestro estudio que evidencio el daño espermático inmediato alterando la vitalidad y la motilidad de la célula sexual equina a una concentración mínima de 3.2 mg/ml.

Los tratamientos empleados en nuestro estudio al ser altamente toxicas se esperaría usar concentraciones inferiores, aunque la capacidad antiséptica no sería la de esperarse ya que según un estudio realizado por Wang en el 2007 se demostró que el HCl tiene un efecto antimicrobiano optimo a concentraciones de 2.8 mg/ml contra bacterias Gram negativas, Gram positivas, parásitos y hongos. De igual estudios hechos en Colombia por Calderón en el 2002 sostiene que concentraciones de HCl iguales o superiores a 0.1% (1mg/ml), es una importante herramienta en la desinfección de alto nivel en el medio hospitalario. Además su baja concentración de sólidos probablemente minimice los daños por corrosión ocasionados a los materiales utilizados en la práctica médica y de laboratorio clínico; alteraciones que normalmente genera el hipoclorito de sodio a través.

La concentración mínima usada en nuestro estudio fue de 3,2 mg/ml y la mortalidad espermática fue alta concluyendo que si se hallaría una concentración de HCl con baja mortalidad espermática, esta sería inferior a lo expresado por Wang y Calderón para que la acción antiséptica sea efectiva. Esto contradice a lo expresado por Bustos en el 2018 quien sostiene que el ácido hipocloroso en las concentraciones inferiores a los 2 mg/ml no fue efectivo como sustancia desinfectante en material de odontología, ya que no disminuyo como se esperaba la carga bacteriana por enterobacterias.

## 11. CONCLUSIONES

- 1) El HCl es citotóxico en células espermáticas de caballo en 3 concentraciones utilizadas, ya que en el análisis seminal existieron diferencias significativas en el grupo con exposición y sin exposición.
- 2) Los parámetros seminales que se observaron mayor afectados con la exposición del ácido hipocloroso fueron los de motilidad progresiva lineal rápida y motilidad progresiva lineal lenta ya que su valoración fue de 0% en el análisis seminal con el HCl
- 3) Las concentraciones de 6.4 y 10 mg/ml causaron mayor daño espermático ya que los espermatozoides expuestos a ambas concentraciones tuvieron una valoración de 0% en cuanto a la vitalidad y un 100% de espermatozoides inmóviles.
- 4) Si existió una correlación tiempo-efecto ya que a los 0 minutos de exposición con el HCl la vitalidad fue de 1.9% y a los 5 minutos fue de 0%

## 12. RECOMENDACIONES

- 1) Implementar espermogramas de control en los centros de reproducción equina de manera recurrente y realizar un seguimiento espermático para identificar agentes que puedan ocasionar algún daño en las células sexuales del semental.
- 2) Realizar otro estudio con mayor cantidad de casos y usando diluciones menores a las usadas en este trabajo de investigación, al igual que realizar los espermogramas inmediatamente extraída la muestra ya que el tiempo es un factor muy importante y puede afectar la motilidad y vitalidad cuando se trabaja con semen fresco.
- 3) Incrementar el entrenamiento de la bioseguridad en los centros de reproducción ya que la contaminación por microorganismos patógenos puede disminuir la efectividad de las técnicas reproductivas

### 13. BIBLIOGRAFIA

- BUSTOS, ERIKA. (2018). EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE UN PROTOTIPO DESINFECTANTE DE CEPILLOS DENTALES. 2020, de UNIVERSIDAD EL BOSQUE Sitio web: [https://repositorio.unbosque.edu.co/bitstream/handle/20.500.12495/2382/Bustos\\_Rios\\_Erika\\_Yineth\\_2018.pdf?sequence=1](https://repositorio.unbosque.edu.co/bitstream/handle/20.500.12495/2382/Bustos_Rios_Erika_Yineth_2018.pdf?sequence=1)
- CALDERON, J.L. (2010). ÁCIDO HIPOCLOROSO (HOCl) “Una nueva alternativa en antisepsia y desinfección desarrollada en Colombia”. Laboratorio Actual, 42, 27-31.
- DUCHENS, MARIO. (1999). Examen de fertilidad para selección en toros de carne. 2004, de Tecnovet Sitio web: [http://web.uchile.cl/vignette/tecnovet/CDA/tecnovet\\_articulo/0,1409,SC\\_ID%253D9752%2526ISID%253D460,00.html](http://web.uchile.cl/vignette/tecnovet/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SC_ID%253D9752%2526ISID%253D460,00.html)
- DIAZ, H. y ARANCIBIA, C (1971) Calificación de la fertilidad potencial de los animales domésticos. Edit. Vera y Giannini, Santiago, Chile.
- DIAZ, H. y DIAZ, A. (1989) Sexualidad y control reproductivo en equino. Edit. Ograma S.A., Santiago, Chile.
- ESTÉVEZ, A GARCIA, A GISPERT, M. (2009). INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CABALLOS. 2019, de UAB Sitio web: [https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2009/80139/inseminacion\\_artificial\\_en\\_caballos.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2009/80139/inseminacion_artificial_en_caballos.pdf)
- FELDMAN, RODOLFO. (2015). Importancia de la evaluación del estrés oxidativo en el semen humano. 2015, de Scielo Uruguay Sitio web: [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1688-423X2015000100002](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-423X2015000100002)
- GARCIA, F.; MURRAY, P. E.; GARCIA-GODOY, F. & NAMEROW, K. N.(2010) Effect of Aquatine Endodontic Cleanser on smear layer removal in the root canals of ex vivo human teeth. J. Appl. Oral Sci., 18(4):403-8.
- GARCIA R. (2015). ¿QUE ES EL ÁCIDO HIPOCLOROSO (HClO) Y COMO FUNCIONA? 2015, de Vetoxzyn Sitio web: <https://vetoxzyn.wordpress.com/2015/06/13/que-es-el-acido-hipocloroso-hclo-y-como-funciona>
- GRAY, M. J.; WHOLEY, W. Y. & JAKOB, U. BACTERIAL RESPONSES

TO REACTIVE CHLORINE SPECIES. ANNU. REV. MICROBIOL.,  
67:141-60, 2013.

- GUERRA, D. (2008). USO DE ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES. 2008, de FUNLARGUIA Sitio web: <http://www.funlarguia.org.ar/Herramientas/Guia-de-Prevencion-de-Infecciones-Intra-Hospitalarias/Uso-de-Antisepticos-y-Desinfectantes>
- HAFEZ, E.S.E., HAFEZ, B. (2002) Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. McGrawhill. Pp.199-215.
- HEGGERS, J. P.; SAZY, J. A.; STENBERG, B. D.; STROCK, L. L.; MCCAULEY, R. L.; HERNDON, D. N. & ROBSON, M. C.(1991) Bactericidal and wound-healing properties of sodium hypochlorite solutions: the 1991 Lindberg Award. J. Burn Care Rehabil., 12(5):420- 4.
- HENAO, SANDRA. (2003). Actividad bactericida del ácido hipocloroso. Revista Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, 51(3), 136-142.
- INSTRUMENTACION UPC. (2011). ESTERILIZACIÓN POR OXIDO DE ETILENO. 2011, de Universidad Popular del Cesar Sitio web: <https://instrumentacionupc.wordpress.com/2011/10/22/esterilizacion-por-oxido-de-etileno/>
- JURADO, S.; SARMIENTO, P. Y STORNELLI, A. (2008) La microscopía electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino. Analecta veterinaria., 28 (1): 7-14.
- KIM, C. & CHA, Y. (2014.) Taurine chloramine produced from taurine under inflammation provides anti-inflammatory and cytoprotective effects. Amino Acids, 46(1):89-100,
- Lafaurie, Gloria., Justo Calderón, Leonardo., Zaror, Carlos., Millán Lina, Viviana., Castillo, Diana. (2015). Ácido Hipocloroso: una Nueva Alternativa como Agente Antimicrobiano y para la Proliferación Celular para Uso en Odontología. Mayo 2019, de Scielo Sitio web: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-381X2015000300019](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X2015000300019)
- LEKSTROM-HIMES, J. A. & GALLIN, J. I. (2000) Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. N. Engl. J. Med., 343(23):1703-14,

- LEVINE, J. M. (2013) Dakin's solution: past, present, and future. *Adv. Skin Wound Care*, 26(9):410-4.
- MAINNEMARE, A.; MÉGARBANE, B.; SOUEIDAN, A.; DANIEL, A. & CHAPPLE, I. L. Hypochlorous acid and taurine-N-monochloramine in periodontal diseases. *J. Dent. Res.*, 83(11):823-31, 2004.
- MCKINNON Y VOSS. (1995). *Equine Reproduction*. EEUU: Blackwel.
- MELLISHO E (2010). RECOLECCIÓN, EVALUACIÓN Y CONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO. 2010, de Universidad Agraria la Molina Sitio web: [https://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/IA\\_archivos/Recoleccion%20y%20evaluacion%20de%20semen%20equino%20.pdf](https://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/IA_archivos/Recoleccion%20y%20evaluacion%20de%20semen%20equino%20.pdf)
- MOREL DAVIES. (1999). *Equine Artificial Insemination*. Inglaterra: CABI Publishing
- NERANDZIC, M. M.; RACKAITYTE, E.; JURY, L. A.; ECKART, K. & DONSKEY, C. J.(2013) Novel strategies for enhanced removal of persistent *Bacillus anthracis* surrogates and *Clostridium difficile* spores from skin. *PLoS One*, 8(7):e68706.
- OPS. (2015). Establecimiento: mantenimiento, limpieza y desinfección. 2015, de OMS Sitio web: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10822:2015-establecimiento-mantenimiento-limpieza-desinfeccion&Itemid=42210&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10822:2015-establecimiento-mantenimiento-limpieza-desinfeccion&Itemid=42210&lang=es)
- . SERRES CONSUELO. (2015). MÉTODOS TRADICIONALES Y ALTERNATIVOS DE EXTRACCIÓN DE SEMEN. *RCCV*, I, 125- 133
- VIGNOLI, RAFAEL. (2002). ESTERILIZACION Y DESINFECCION. *HIGIENE.EDU*, 1, 6.
- WEISS, S. J. (1989) TISSUE DESTRUCTION BY NEUTROPHILS. *N. ENGL. J. MED.*, 320(6):365-76.
- WANG, L.; BASSIRI, M.; NAJAFI, R.; NAJAFI, K.; YANG, J.; KHOSROVI, B.; HWONG, W.; BARATI, E.; BELISLE, B.; CELERI, C. & ROBSON, M. C. HYPOCHLOROUS ACID AS A POTENTIAL WOUND CARE AGENT: PART I. STABILIZED HYPOCHLOROUS ACID: A COMPONENT OF THE INORGANIC ARMAMENTARIUM OF INNATE IMMUNITY. *J. BURNS WOUNDS*, 6:E5, 2007
- YANET HERNÁNDEZ-MATOS. (2010). Impacto de las especies reactivas del oxígeno sobre la fertilidad masculina. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, Vol. 18, 153-158.



## 14. ANEXOS

Tabla 1. Vitalidad y motilidad espermática control, y la vitalidad y motilidad espermática en cada de los 3 tratamientos de ácido hipocloroso.

Ejemplar	Control						Tratamiento 1						Tratamiento 2						Tratamiento 3					
	%Vitalidad		%Motilidad				%Vitalidad		%Motilidad				%Vitalidad		%Motilidad				%Vitalidad		%Motilidad			
	Vivos	Muertos	PL R	P L L	In sit u	Inmóvil	Vivos	Muertos	P L R	P L L	In situ	Inmóvil	Vivo s	Muertos	P L R	P L L	In situ	Inmóvil	Vivos	Muertos	P L R	P L L	In situ	Inmóvil
1	46	54	55	9	12	24	2	98	0	0	3	97	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100
2	58	42	45	7	15	33	2	98	0	0	2	98	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100
3	63	37	61	2	10	27	1	99	0	0	1	99	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100
4	54	46	60	12	8	20	3	97	0	0	4	96	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100
5	49	51	56	8	5	31	1	99	0	0	1	99	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100
6	52	48	55	8	9	28	2	98	0	0	3	97	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100
7	61	39	63	6	8	23	2	98	0	0	2	98	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100
8	57	43	59	11	8	22	3	97	0	0	3	97	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100
9	59	41	65	3	7	25	1	99	0	0	1	99	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100
10	47	53	50	12	12	26	2	98	0	0	4	96	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100

Tabla 2. Porcentaje comparativo de la vitalidad afectada para cada tratamiento (3.2, 6.4 y 10 mg/ml) expresado en medias.

	N	$\bar{X}$ VIVOS	$\bar{X}$ MUERTOS
CONTROL	10	54.6	45.4
3.2 mg/ml	10	1.9	98.1
6.4 mg /ml	10	0	100
10 mg /ml	10	0	100

Tabla 3. Porcentajes de vitalidad espermática control y vitalidad expuesta al acido hipocloroso a 3,2 mg/ml

%Vitalidad control	%Vitalidad con la exposición del HCL
46	2
58	2
63	1
54	3
49	1
52	2
61	2
57	3
59	1
47	2

Tabla 4. Porcentajes de motilidad in situ control y motilidad in situ expuesta al ácido hipocloroso a 3,2 mg/ml

%Motilidad in situ control	%Motilidad in situ expuesta al HCL
12	3
15	2
10	1
8	4
5	1
9	3
8	2
8	3
7	1
12	4

Tabla 5. Análisis de variancia método Kruskalwallis

Grupo 1		Grupo 2	
%Motilidad in situ control	Rango	%Motilidad in situ expuesta al HCL	Rango
12	18.5	3	7
15	20	2	4.5
10	17	1	2
8	14	4	9.5
5	11	1	2
9	16	3	7
8	14	2	4.5
8	14	3	7
7	12	1	2
12	18.5	4	9.5
	155		55

Tabla 6. Porcentajes de espermatozoides inmóviles control y espermatozoides inmóviles expuestos al ácido hipocloroso a 3,2 mg/ml

%Espermatozoides inmóviles	%Espermatozoides inmóviles expuestos al HCL
24	97
33	98
27	99
20	96
31	99
28	97
23	98
22	97
25	99
26	96

Tabla 7. Análisis de variancia método Kruskalwallis

Grupo 1		Grupo 2	
%Espermatozoides inmóviles	Rango	%Espermatozoides inmóviles expuestos al HCL	Rango
24	4	97	14
33	10	98	16.5
27	7	99	19
20	1	96	11.5
31	9	99	19
28	8	97	14
23	3	98	16.5
22	2	97	14
25	5	99	19
26	6	96	11.5
	55		155