

Artículo corto:

CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE ALPACA UTILIZANDO ANÁLOGOS DE SUPERÓXIDO DISMUTASA Y CATALASA

Alpaca semen cryopreservation using superoxide dismutase mimics and catalase

S. Evangelista^{1*}, D. Muchotrigo¹, X. Trelles¹, K. Choez², A. Santiani^{1,2}

¹ Laboratorio de Reproducción. Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas, Universidad Científica del Sur.

² Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

E-mail (Shirley Evangelista): shirley.evangelista@cientifica.edu.pe

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo estudiar el efecto de la adición de las enzimas antioxidantes SOD, catalasa y la interacción SOD*catalasa, durante el proceso de criopreservación de espermatozoides de alpaca sobre la motilidad espermática y peroxidación lipídica. Se utilizaron 12 muestras de semen provenientes de 6 alpacas machos, las cuales fueron alicuotadas en los siguientes grupos: (1) control, (2) control positivo, (3) tempol, (4) catalasa y (5) tempol*catalasa. Se evaluó la motilidad y peroxidación lipídica (determinación de malondialdehído) al inicio al inicio de la curva de enfriamiento, al final de la curva de enfriamiento y luego del proceso de criopreservación. Se encontró que la motilidad espermática en los grupos tempol y catalasa se mantuvo ligeramente superior ($P > 0.05$) luego del proceso de criopreservación en comparación con los controles, siendo el grupo control positivo el que presentó el mayor ($P < 0.05$) grado de peroxidación lipídica (810 ng/mL malondialdehído) en comparación con la muestra de inicio (346 ng/mL), catalasa-5 C (289 ng/mL) y tempol*catalasa descongelado (331 ng/mL). Estos resultados demuestran que el uso de los antioxidantes tempol*catalasa permite reducir los niveles de malondialdehído cuando se presenta un elevado estrés oxidativo durante el proceso de criopreservación.

Palabras clave: *tempol, catalasa, semen, alpaca, criopreservación*

ABSTRACT

The present study has the objective to study the effect of the addition of antioxidant enzymes SOD, catalase and SOD*catalase interaction during alpaca sperm cryopreservation on sperm motility and lipid peroxidation. Twelve semen samples from 6 male alpacas were used. Samples were aliquoted into the following groups: (1) control (2) positive control, (3) tempol, (4) catalase and (5) tempol*catalase. Motility and lipid peroxidation (malondialdehyde determination) were evaluated at the beginning of the cooling curve, at the end of the cooling curve and after cryopreservation. We found that sperm motility in tempol and catalase groups remained slightly higher ($P > 0.05$) after cryopreservation compared with controls, with the positive control group that had the highest ($P < 0.05$) degree of peroxidation lipid (810 ng / mL malondialdehyde) compared to the fresh sample (346 ng / mL), catalase-5 C (289 ng / mL) and thawed catalase*tempol (331 ng / mL). These results demonstrate that the use of antioxidant catalase*tempol reduced levels of malondialdehyde when high oxidative stress occurs during the cryopreservation process.

Keywords: *tempol, catalase, semen, alpaca, cryopreservation*



INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen de alpaca ha sido descrita por Santiani *et al.* (2013) y Morton *et al.* (2010), quienes reportan porcentajes de motilidad espermática alrededor del 20%, no obstante, es posible obtener porcentajes de viabilidad entre 40 a 50%. En esta especie, existen un par de estudios, que indican que la utilización de análogos de superóxido dismutasa (SOD) durante la criopreservación de semen de alpaca, mejoran la motilidad post descongelamiento y reducen la fragmentación del ADN espermático (Santiani *et al.*, 2012, 2013). Los análogos de SOD son nitróxidos que reaccionan en presencia del anión superóxido (O₂⁻), convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno (Offer *et al.*, 1998). Sin embargo, el peróxido de hidrógeno puede convertirse en un radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton (Aitken y Fisher, 1994) y ser responsable directo del inicio de la peroxidación lipídica, tal como se ha demostrado en espermatozoides de humanos y ratones (Aitken y Fisher, 1994). Los análogos de SOD podrían evitar la reacción Fenton a través de la oxidación de Fe y Cu (Luo, 2001), no obstante, la utilización de la enzima catalasa también podría contribuir a reducir el estrés oxidativo, mediante la conversión del peróxido de hidrógeno en agua. En ovinos, existen evidencias que la utilización de análogos de SOD pueden reducir el daño oxidativo durante la criopreservación (Santiani, 2003), mientras que espermatozoides humanos la utilización de SOD y catalasa logran prevenir los efectos fisiológicos espermáticos mediados por ROS (De Lamirande *et al.*, 1998).

MATERIALES Y MÉTODOS:

Lugar de estudio, animales y muestras.

Se utilizaron 12 eyaculados de alpaca provenientes de 6 alpacas adultos, que se encontraron alojados en la Unidad de Zootecnia y Tecnología, de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas de la Universidad Científica del Sur, entre mayo a noviembre del 2013. La colección de semen fue realizada mediante el método de vagina artificial, utilizando como señuelo un maniquí ó hembra receptiva. Las muestras colectadas que cumplieron con presentar una cvalidad mínima (volumen > 0.5 mL, motilidad > 30% y concentración >50 x 10⁶ espermatozoides/mL) fue sometidas a acción mecánica para eliminar la viscosidad del plasma seminal.

Diseño experimental.

Cada eyaculado (n=12) fue dividido en 5 partes, y cada una de las alícuotas fue utilizada para formar los siguientes grupos:

- Grupo control: criopreservación estándar
- Grupo control positivo: criopreservación con ascorbato Fe 2+ para inducir formación adicional de ROS (Mata-Campuzano *et al.*, 2012).
- Grupo antioxidante SOD: Adicionando un análogo de SOD (Tempol 1 mM) al dilutor de semen. (Santiani *et al.*, 2012).
- Grupo antioxidante catalasa: Adicionando catalasa (50 µg/mL) al dilutor de semen (Maia *et al.*, 2010).
- Grupo interacción SOD*catalasa: adicionando el análogo de SOD (Tempo 1 mM y catalasa (50 µg/mL) al dilutor de semen.

Proceso de criopreservación.

Se utilizó el dilutor y el procedimiento descrito por Santiani *et al.* (2005) con una concentración final de dimetilacetamida de 1 M. La curva de enfriamiento fue realizado durante 90 minutos (-1 C/3 minutos), se adicionó a los 5 C, dimetilacetamida para llegar a una concentración final de 1 M, las muestras fueron envasadas en pajillas de plástico de 0.25 mL y se dejó estabilizar por 30 minutos. Se utilizaron vapores de nitrógeno líquido descender de 5 C a -20 C y finalmente las pajillas fueron sumergidas en nitrógeno líquido. El descongelamiento de las pajillas se realizó a 37 C por 1 minuto.

Evaluación de motilidad espermática.

Para evaluar la motilidad espermática se colocaron 25 µL de la muestra en una lámina portaobjetos temperada y se observó a 400x. Se determinó el porcentaje de espermatozoides móviles sobre el total de espermatozoides en cada campo, evaluando un total de 10 campos. Los resultados fueron expresados como porcentaje de motilidad. En el caso de la evaluación de motilidad post descongelamiento, se estimó la motilidad en función del porcentaje de motilidad inicial, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Motilidad post descongelamiento} = \frac{\text{Motilidad observada} \times 100}{\text{Motilidad inicial}}$$

Peroxidación lipídica.

Los peróxidos lipídicos fueron determinados mediante la cuantificación del malondialdehído por el método del ácido tiobarbitúrico, descrito por Aitken *et al.* (1989). El método consistió en incubar 20 x 10⁶ espermatozoides de alpaca en 250 uL de PBS con 125 µL de sulfato ferroso (0,2mM) y 125 µL de ascorbato de sodio (1mM). Esta solución fue incubada en baño maría a 37 C durante 1 hora. Posteriormente se enfrió en baño de hielo por 15 minutos. Con la muestra en el baño de hielo, se le agregó 250uL de PBS y 250uL de ácido tricloroacético al 40%. La muestra fue luego centrifugada a 2500 G durante 10 minutos a 4 C. Por otro lado, en un tubo de vidrio con tapa, se colocó 125 uL de ácido tiobarbitúrico al 2%, se aclaró con 5 µL de hidróxido de sodio (5M) y se agregó 500 µL del sobrenadante de la muestra centrifugada. La mezcla fue incubada a 90 C en baño maría durante 10 minutos. Finalmente, las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente por 30 minutos y se leyeron en un espectrofotómetro a 532nm contra un blanco reactivo.

Análisis estadístico.

Se utilizó el programa estadístico Prism® versión 3.0. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de los grupos (control, control positivo, tempol, catalasa y tempol*catalasa) y tiempos (A los 5 C y luego del descongelamiento) en los porcentajes de motilidad y niveles de malondialdehído (ng/mL). En los casos donde el ANOVA fue significativo, se realizó el post test de TUKEY para determinar entre que grupos existieron diferencias.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se pueden observar los valores de malondialdehído iniciales, a los 5 C y luego del proceso de criopreservación en los 5 grupos que se trabajaron: control, control positivo, tempol, catalasa y tempol*catalasa. Se realizó una análisis comparando las medias de todos los grupos, encontrado que los valores de malondialdehído en el grupo de

semén fresco (346.50 ± 299.37 ng/mL), catalasa a los 5 °C (289.96 ± 173.26 ng/mL) y tempol*catalasa luego de la criopreservación (331.26 ± 246.66 ng/mL) fueron significativamente menores ($P < 0.05$) al grupo control positivo luego de la criopreservación (810.00 ± 228.10 ng/mL). En relación a los parámetros de función espermática, en la Tabla 2 se pueden observar los porcentajes de motilidad espermática al finalizar la curva de enfriamiento y luego del proceso de criopreservación. Se puede observar que un 30 a 40% de motilidad se pierde durante el proceso de enfriamiento, mientras que luego del proceso de criopreservación, estos porcentajes se reducen a alrededor del 20%. La motilidad al finalizar la curva de enfriamiento fue mayor en los grupos tempol (66.23%) y tempol*catalasa (67.50%), aunque sin presentarse diferencias significativas ($P > 0.05$). Del mismo modo, la motilidad post descongelamiento en el grupo tempol (25.64%) fue mayor a los demás grupos, aunque tampoco se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$).

Tabla 1. Peroxidación lipídica (ng/mLmalondialdehído) en espermatozoides de alpaca sometidos a distintos tratamientos (control, control positivo, tempol, catalasa, tempol*catalasa) y en distintas etapas del congelamiento (frescos, enfriados a 5 °C y luego del proceso de criopreservación).

	Fresco	A los 5°C	Descongelado
Control	346.50 ± 299.37 ^a	401.14 ± 194.32	527.66 ± 428.38
Control (+)		429.03 ± 359.66	810.00 ± 228.10 ^b
Tempol		389.06 ± 253.91	410.05 ± 314.03
Catalasa		289.96 ± 173.26 ^a	406.03 ± 292.14
Tempol*Catalasa		384.46 ± 324.92	331.26 ± 246.66 ^a

Valores son Porcentajes ± D.S.

Letras diferentes en el cuadro indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

Tabla 2. Efecto de los antioxidantes tempol, catalasa e interacción tempol*catalasa en los porcentajes de motilidad espermática al finalizar la curva de enfriamiento (A los 5 °C y luego del proceso de criopreservación de semen de alpaca)

	A los 5°C	Congelado/Descongelado
Control	58.48 ± 5.57 ^a	17.89 ± 6.65 ^b
Control (+)	60.57 ± 5.49 ^a	22.92 ± 4.41 ^b
Tempol	66.23 ± 5.19 ^a	25.64 ± 4.87 ^b
Catalasa	63.62 ± 5.53 ^a	23.14 ± 3.92 ^b
Tempol*Catalasa	67.50 ± 5.01 ^a	16.10 ± 3.74 ^b

Valores son Porcentajes ± S.E.M.

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

DISCUSIÓN

En nuestro estudio encontramos que la adición de Tempol en combinación con catalasa produjeron los mejores resultados en relación a peroxidación lipídica. Es decir, en el grupo donde se utilizó esta combinación de antioxidantes, se produjo el menor estrés oxidativo (menos malondialdehído). El Tempol aparentemente no tiene efecto sobre el peróxido de hidrógeno (Offer *et al.* 1998), pero al oxidar Fe y Cu evita la reacción de Fenton (Luo, 2001). De esta manera, este nitróxido evitaría la formación de radicales hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno y por lo tanto bloquearían el inicio de la peroxidación lipídica.

También es probable que el peróxido de hidrógeno sea removido mediante la acción de la catalasa presente en la leche (Foote *et al.*, 2002; Maia *et al.*, 2010). Por otro lado, en los grupos Tempol ó Catalasa en forma individual también se observaron los mejores porcentajes de motilidad, no obstante no fueron significativos. El antioxidante Tempol es un análogo de superóxido dismutasa (Mitchell *et al.*, 1990) que reacciona en presencia del anión superóxido y lo convierte en peróxido de hidrógeno (Offer *et al.*, 1998). Según Santiani (2003), la adición de Tempo entre 0.5 a 1 mM permite obtener mayores porcentajes de motilidad (entre 10 a 15%) en espermatozoides de ovinos.

CONCLUSIÓN

Consecuentemente, la disminución en la peroxidación lipídica como resultado de la adición de tempol y catalasa indicarían que la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno y/o el bloqueo de la formación de radicales hidroxilo interfieren con el inicio de la peroxidación lipídica en espermatozoides de alpaca. En conclusión, se demuestra que la adición de los antioxidantes tempol y/o catalasa logran disminuir el estrés oxidativo, tal cual se ha demostrado midiendo niveles de peroxidación lipídica.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias a la subvención del CONCYTEC a través del Proyecto PROCYT 366-2012. Se agradece la colaboración de la Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión.

REFERENCIAS

- Aitken R, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 1994; 16:259-267.
- De Lamirande E, Tsai C, Harakat A, Gagnon C. Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. *J Androl* 1998; 19:585-594.
- Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 2002; 71:13-23.
- Luo J. Nitroxides-metal-independent SOD mimics. *Free Radicals in Biology and Medicine. Free radical and Radiation Biology Program*. The University of Iowa. 2001.
- Maia S, Bicudo S, Sicherle C, Rodello L, Gallego I. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Anim Reprod Sci* 2010; 122:118-123.
- Mata-Campuzano M, Alvarez-Rodriguez M, Del Olmo E, et al. Quality, oxidative markers and DNA damage (DNA) fragmentation of red deer thawed spermatozoa after incubation at 37 °C in presence of several antioxidants. *Theriogenology* 2012; 78:1005-1019.
- Mitchell JB, Samuni A, Krishna MC, et al. Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics. *Biochemistry* 1990; 29:2802-2807.
- Morton K, Evans G, Maxwell W. Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome

integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology* 2010; 74:311-316.

- Offer T, Mohsen M, Samuni A. An SOD-mimicry mechanism underlies the role of nitroxides in protecting papain from oxidative inactivation. *Free Radic Biol Med* 1997; 25:832-838.
- Santiani A. Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. *Tesis Magister en Ciencias*. Temuco, Chile: Univ. La Frontera. 2003; 95p.
- Santiani A, Evangelista S, Valdivia M, Risopatrón J, Sánchez R. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. *Theriogenology* 2013; 79:842-846.

