

Artículo corto:

PRODUCCIÓN INTRACELULAR DE ANIÓN SUPERÓXIDO, PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE ALPACA

Intracellular production of superoxide anion, hydrogen peroxide and lipid peroxidation during the process of alpaca semen cryopreservation

S. Evangelista^{1*}, X. Trelles¹, D. Muchotrigo¹, 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 proyecto tuvo como objetivo cuantificar la producción intracelular de anión superóxido, peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica durante el proceso de criopreservación de semen de alpaca. Doce muestras de semen de alpaca fueron criopreservadas. Se evaluó la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno durante el enfriamiento (A los 25°C, 15°C, 5°C, 5°C-15 minutos y 5°C-30 minutos) y luego del descongelamiento, utilizando los fluorocromos dihidroethidium y dichlorofluorescindiacetate, respectivamente. Asimismo, se evaluó la peroxidación lipídica, mediante la determinación del malondialdehído. Se encontró a los 5°C-30 minutos, los espermatozoides de alpaca (62%) producen anión superóxido en mayor proporción ($P < 0.05$) que a los 25 °C (10%) ó luego del descongelamiento (29%). Del mismo modo, la producción de peróxido de hidrógeno a los 5°C-30 minutos (30%) es significativamente superior ($P < 0.05$) en comparación a los 25 °C (6%) y luego del descongelamiento (7%). No obstante, las mayores cantidades de malondiadehído encontradas al final de la curva de enfriamiento y luego del descongelamiento no fueron significativamente mayores. Estos resultados demuestran que existe un estrés oxidativo significativo durante el proceso de criopreservación de semen de alpaca.

Palabras clave: *estrés oxidativo, espermatozoide, alpaca, criopreservación, semen*

ABSTRACT

The objective of this study was to quantify the intracellular production of superoxide anion, hydrogen peroxide and lipid peroxidation during cryopreservation of alpaca semen. Twelve alpaca semen samples were cryopreserved. The production of superoxide anion and hydrogen peroxide were evaluated during cooling (25 °C, 15 °C, 5 °C, 5 °C-15 minutes, 5 °C-30 min) and after thawing, using dihydroethidium and dichlorofluorescein diacetate fluorochromes, respectively. Also, the lipid peroxidation was evaluated by measuring malondialdehyde. We found that at 5°C-30 min sperm alpaca (62%) produce superoxide anion in greater proportion ($P < 0.05$) than at 25°C (10%) or after thawing (29%). Similarly, the production of hydrogen peroxide at 5°C-30 minutes (30%) is significantly higher ($P < 0.05$) compared to 25 °C (6%) and after thawing (7%). However, malondiadehído levels at the end of the cooling curve and after thawing were not significantly higher. These results demonstrate that a significant oxidative stress is produced during cryopreservation of alpaca semen.

Keywords: *oxidative stress, alpaca, sperm, cryopreservation, semen*



INTRODUCCIÓN

El proceso de criopreservación involucra un estrés oxidativo importante en la fisiología de los espermatozoides. En ovinos (Santiani, 2003) y humanos (Wang, 1997), se ha demostrado que durante el proceso de criopreservación de semen se incrementa significativamente la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales afectan negativamente la motilidad y viabilidad espermática. Los principales efectos nocivos de ROS en espermatozoides incluyen la disminución de la motilidad, incremento de la peroxidación lipídica en la membrana plasmática e incremento en la fragmentación del ADN espermático (Kasimanickam *et al.*, 2006; Lukanov *et al.*, 2008).

Las evidencias en ovinos y humanos, nos llevan a presumir que durante el proceso de criopreservación de espermatozoides de alpaca también se estaría generando un gran estrés oxidativo, por lo cual nuestro objetivo fue cuantificar los niveles de especies reactivas de oxígeno (anión superóxido y peróxido de hidrógeno) y de peróxidos lipídicos durante el proceso de criopreservación en espermatozoides de alpaca.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Lugar de estudio y animales.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y en la Unidad de Zootecnia y Tecnología, ambos pertenecientes de la Universidad Científica del Sur, durante los meses de mayo a noviembre del 2013. Se colectaron 12 muestras de semen, provenientes de 4 alpacas machos adultos mediante el método de vagina artificial y utilizando como señuelo un maniquí ó hembra receptiva.

Manejo de muestras.

Posteriormente a la colecta se procedió a medir el volumen del eyaculado, e inmediatamente después se eliminó la viscosidad del plasma seminal con el fin de favorecer el manejo de muestras seminales. La técnica a utilizar para eliminar la viscosidad del plasma seminal fue la de acción mecánica mediante el paso repetido a través de una jeringa de tuberculina (aspirado y eyectado múltiple), para licuar las muestras de semen. Luego se procedió a realizar una evaluación inicial de la muestra en la cual se evaluaron motilidad (%), concentración espermática (millones de espermatozoides /mL) y morfología (%). Se trabajaron solo con aquellos eyaculados que presentaron un volumen > 0.5 mL, motilidad > 30% y concentración >50 x 10⁶ espermatozoides/mL

Proceso de criopreservación.

Se utilizó un dilutor preparado con 95 ml de leche descremada, 5 ml de yema de huevo y 4.85 g de fructosa, teniendo una concentración final de dimetilacetamida de 1M. Los eyaculados y/o alícuotas de eyaculados fueron diluidos 1:1 con el dilutor. La curva de enfriamiento (60 minutos) fue realizada colocando las muestras en baño maría en refrigeración, para conseguir un descenso lento de la temperatura (-1°C / 3 minutos). Cuando las muestras llegaron a 5°C, se adicionó la dimetilacetamida para llegar a una concentración final de 1 M, y posteriormente las muestras fueron envasadas en pajillas de plástico de 0.25 mL. El periodo de estabilización con el crioprotector fue de 30 minutos. Finalmente se utilizaron

vapores de nitrógeno líquido descender de 5°C a -20°C, luego de lo cual, las pajillas fueron sumergidas en nitrógeno líquido. El descongelamiento de las pajillas se realizó al día siguiente de la criopreservación, utilizando un baño maría a 37°C por 1 minuto.

Determinación de especies reactivas de oxígeno y peroxidación lipídica.

La determinación de anión superóxido fue realizada mediante el marcador de fluorescencia dihydroethidium (DHE), de acuerdo a lo descrito por Mahfouz *et al.* (2009). Se consideraron espermatozoides que producen anión superóxido a aquellos que presentaron fluorescencia roja/naranja, mientras que se consideraron como espermatozoides que no producen anión superóxido a aquellos que presentaron fluorescencia verde. Por otro lado, la determinación de peróxido de hidrógeno fue realizada mediante el marcador de fluorescencia dichlorofluoresceína diacetate (DCFH-DA), de acuerdo a lo descrito por Mahfouz *et al.* (2009). Se consideraron espermatozoides que producen peróxido de hidrógeno a aquellos que presentaron fluorescencia verde, mientras que se consideraron como espermatozoides que no producen peróxido de hidrógeno a aquellos que presentaron fluorescencia roja/naranja. En ambos casos, se realizaron lecturas de 100 espermatozoides a través de microscopía de fluorescencia. Los peróxidos lipídicos fueron determinados mediante la cuantificación del malondialdehído por el método del ácido tiobarbitúrico, descrito por Aitken (1989).

Análisis estadístico.

Se utilizó el programa estadístico Prism® versión 3.0. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de los tiempos/temperaturas en los porcentajes de espermatozoides que producen anión superóxido y peróxido de hidrógeno. En los casos donde el ANOVA fue significativo, se realizó el post test de TUKEY para determinar entre que grupos existieron diferencias.

RESULTADOS

En el experimento, se cuantificó la producción de 2 especies reactivas de oxígeno (ROS): anión superóxido y peróxido de hidrógeno. En la tabla 1 se observa que los menores porcentajes de espermatozoides que producen anión superóxido se encontraron en las muestras evaluadas a los 25 °C (10%), 15°C (23%) y luego del proceso de criopreservación (29%). Estos valores fueron significativamente inferiores a los encontrados en las muestras evaluadas 30 minutos después de mantenerlas a 5 °C (62%). En forma similar, encontramos que los menores porcentajes de espermatozoides que producen peróxido de hidrógeno se encontraron en las muestras evaluadas a los 25 °C (6%), 15 °C (10%) y luego del proceso de criopreservación (7%). Estos valores también fueron significativamente inferiores a los encontrados en las muestras evaluadas 15 y 30 minutos después de mantenerlas a 5 °C (24 y 30% respectivamente)

Los niveles de peroxidación lipídica (malondialdehído) al iniciar la curva de enfriamiento fueron 346.50 ± 299.37 ng/mL, luego al finalizar la curva de enfriamiento (5 °C), estos valores se incrementaron ligeramente hasta 401.14 ± 194.32 ng/mL. Finalmente, luego del proceso de criopreservación, estos llegaron hasta los 527.66 ± 424.38 ng/mL. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico, no se encontraron diferencias

