

*Artículo original:*

## **EVALUACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN ESPERMATOZOIDES DE ALPACA MEDIANTE EL MÉTODO DEL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO MODIFICADO**

### **Evaluation of lipid peroxidation in alpaca sperm using the modified thiobarbituric - acid assay**

**Trelles X.(1), Muchotrigo D.A.(1), Choez K.(2), Pantoja C.(3), Solis R.(3), Evangelista S.(1), Santiani A.(1,2)**

(1) Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú.

(2) Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

(3) Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Pasco, Perú.

Email: xtrelles@gmail.com

*Palabras Clave:*

*Alpaca, espermatozoide, peroxidación, ROS*

#### **INTRODUCCIÓN**

La peroxidación lipídica es el deterioro de los ácidos grasos insaturados de la membrana plasmática causada por estrés oxidativo. El malondialdehído (MDA) es el producto final de la peroxidación de ácidos grasos y un marcador de la actividad de radicales libres de oxígeno (Gallardo *et al.*, 2007). El grado peroxidativo en espermatozoides puede ser calculado por el método del ácido tiobarbitúrico (TBA), el cual reacciona con el malondialdehído. De esta manera, la cantidad de malondialdehído generado luego de la incubación de espermatozoides con un promotor del ión ferroso va a depender de la cantidad de peróxidos lipídicos que se hayan acumulado en la célula antes del ensayo (Aitken *et al.*, 1989). Los espermatozoides de alpaca serían particularmente sensibles a experimentar esta peroxidación en su membrana, la cual a su vez, estaría relacionada con pérdida de motilidad y viabilidad espermática. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue cuantificar la producción de MDA en espermatozoides de alpaca. Entonces la determinación del nivel de peroxidación lipídica en espermatozoides de alpaca podría constituir un indicador del grado de exposición a ROS.

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Científica del Sur, Lima, durante el primer semestre del año 2013. Se utilizaron 9 muestras de semen, provenientes de 4 alpacas machos adultos de raza Huacaya, con pesos entre 45 a 75 Kg. La colección de semen se realizó con una hembra receptiva, desviando el pene hacia una vagina artificial (42°C) protegida con una manta térmica. El semen colectado fue trasladado al Laboratorio, para ser evaluado a través del método del -ácido tiobarbitúrico (TBA) modificado (Descrito por Álvarez *et al.*, 1982 y modificado por Aitken *et al.*, 1989). Una vez colectada la muestra está fue lavada con PBS y centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos con el fin de obtener un pellet, el cual fue nuevamente diluido con PBS para llegar a una concentración final de 20 millones. Posteriormente se incubó 0.250 ml de la muestra diluida (20 millones de espermatozoides/ml) de alpaca con 0.125 ml de sulfato ferroso (0.2 mM) y 0.125 ml de ascorbato de sodio (1 mM). La muestra fue incubada a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente se enfrió en baño de hielo por 15 minutos. Manteniendo el tubo en el hielo, se agregó 0.25 ml de PBS y 0.25 ml de ácido tricloroacético al 40%. Luego se centrifugaron los tubos a 2500 g durante 10 minutos a 4°C. Por otro lado, en un tubo de vidrio con tapa, se colocaron 0.125 ml de ácido tiobarbitúrico al 2%, se aclaró con 5 L de hidróxido de sodio 5 M y se agregó 0.5 ml del sobrenadante de los tubos centrifugados. Esta mezcla fue incubada a 90 °C durante 10 minutos. Finalmente, las mezclas fueron enfriadas a temperatura ambiente por 30 minutos. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 532 nm contra un blanco reactivo.

#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los niveles de peroxidación lipídica (ng/ml de malondialdehído) en espermatozoides de alpaca se presentan en la tabla 1. El promedio de MDA fue 544.90 ng/ml, con una desviación estándar de 174.54 ng/ml. Estos constituyen los primeros valores referenciales para espermatozoides de alpaca. En espermatozoides frescos de ovino, los valores de MDA son  $671 \pm 101$  ng/ml (Santiani, 2003), en bovino  $8 \pm 2.6$  nmol/ $\mu$ g (Sajjad, 2011), en ciervo  $1.0 \pm 1.8$  nmol/ 108 (Dominguez, 2010).

Por otro lado, cuando las muestras de espermatozoides han sido sometidas a diversos grados de estrés oxidativo se observa que los valores de MDA se incrementan significativamente. En ese sentido, (Santiani, 2003) reporta valores de  $1837 \pm 499$  ng/mL para espermatozoides de ovino, (Sajjad, 2011) reporta valores de  $16.4 \pm 2.5$  nmol/ $\mu$ g en bovino luego del proceso de criopreservación, en ciervo se reportan valores de  $5.6 \pm 2.7$  nmol/ 108 tras ser sometido a tratamiento con peróxido de hidrogeno 1mM (Dominguez, 2010). Estos resultados indicarían que es posible cuantificar el grado de estrés oxidativo a través de la determinación del MDA.

Nuestros resultados constituirían una base para realizar estudios sobre estrés oxidativo en semen de alpaca.



Tabla 1. Evaluación de la peroxidación lipídica mediante el método del ácido tiobarbitúrico modificado en semen de alpaca.

Ítem	Concentración de Spermatozoides (x10 <sup>6</sup> /ml)	Color del Spermatozoides	Malondialdehído (MDA) (ng/ml)
1	2.5	Blanquecino	194.39
2	1.5	Blanquecino	622.27
3	1.5	Blanquecino	520.48
4	0.9	Blanquecino	376.12
5	1.5	Blanquecino	483.52
6	2.5	Blanquecino	640.10
7	3.0	Blanquecino	701.92
8	0.8	Terroso	610.77
9	3.0	Amarillento	754.55
Promedio			544.90
D.S.			174.54

## CONCLUSIÓN

Los niveles de malondialdehído 544.90 ng/ml en espermatozoides frescos de alpaca son similares a los reportados como niveles basales en otras especies de mamíferos.

## BIBLIOGRAFIA

- Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. *Biol Reprod.* 1989. 40:183-197.
- Álvarez JG, Storey BT. *Biol Reprod.* 1982.27: 1102-1108.
- Domínguez A. 2010. 185 Páginas. [Tesis Doctoral]
- Gallardo J. *Rev. Invest. Clin.* 2007. 1: 42- 47.
- Sajad M. 2011. 124 Páginas. [Tesis]
- Santiani A. 2003. *Tesis Doctoral*, FMV-UNMSM. 95pg.

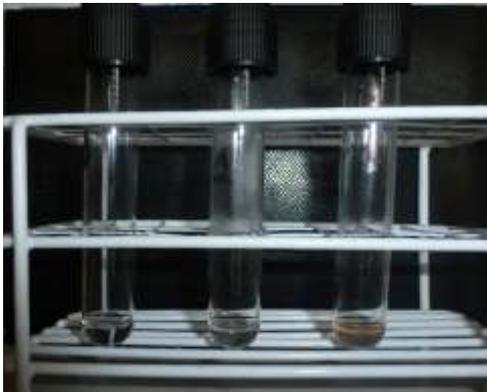


Figura 1: b) Equipamiento y a) muestras para análisis de peroxidación lipídica

