

*Artículo original:*

## ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLOS DE DETECCIÓN INTRACELULAR DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y ANIÓN SUPERÓXIDO EN ESPERMATOZOIDES DE ALPACA

### Standardization of protocols for detection of intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion in sperm of alpaca

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

(1) Universidad Científica del Sur  
(2) Universidad Nacional Daniel A. Carrión  
(3) Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Email: shirleyevangelista@gmail.com

*Palabras Clave:*  
Alpaca, espermatozoide, ROS

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el anión superóxido ( $O_2^-$ ) son especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por el espermatozoide como parte de su fisiología normal (Ball *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha demostrado en espermatozoides humanos, que un exceso en la producción de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  causa una elevada fragmentación del ADN, reduce la motilidad y afecta la capacidad fecundante de los mismos (Aitken *et al.*, 1998). Los espermatozoides que generan mayor cantidad de ROS son los morfológicamente anormales y los dañados durante el proceso de criopreservación (Ball *et al.*, 2001). En espermatozoides humanos, Mahfouz *et al.* (2009) emplearon diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) y dihidroetidio (DHE) para detectar  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  respectivamente. Determinar si los espermatozoides de alpaca producen grandes cantidades de ROS antes, durante y/o después del proceso de criopreservación, es sumamente importante para establecer un adecuado protocolo de criopreservación para esta especie. Es por ello que nuestro objetivo fue estandarizar protocolos que nos permitan detectar  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  en espermatozoides de alpaca.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Universidad Científica del Sur (UCSUR), Lima, durante el primer semestre del año 2013. La colección de semen se realizó en la Unidad de Tecnología y Zootecnia de la UCSUR. La evaluación de las muestras se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Se trabajó con 10 eyaculados provenientes de 4 alpacas machos adultos de raza Huacaya, con pesos entre 45 a 75 Kg. El método de colección de semen empleado fue el de desviación de pene hacia una vagina artificial protegida con manta térmica (42°C), utilizando para dicho fin una hembra receptiva como señuelo. El semen colectado fue trasladado al laboratorio para su evaluación. Como parte de la estandarización de los protocolos, se realizó la determinación de las concentraciones óptimas de cada fluorocromo, para ello se probaron 3 diferentes concentraciones. Cada eyaculado fue dividido en dos alícuotas, siendo estas clasificadas como: muestra A (semen sin diluir) y muestra B (semen diluido a una concentración de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/ml).

### Estandarización del protocolo de detección de $H_2O_2$

Se probaron 3 concentraciones: C1 (DCFH-DA 2.5  $\mu$ M), C2 (DCFH-DA 12.5  $\mu$ M) y C3 (DCFH-DA 25  $\mu$ M). Las muestras A (n=10) y B (n=10) fueron incubadas en oscuridad a 25°C por 40 minutos con cada una de las concentraciones de DCFH-DA (C1, C2 y C3). Posterior a la incubación se agregó 0.1  $\mu$ M de Ioduro de Propidio (IP) como control de fluorescencia negativo a todas las muestras. Las lecturas se realizaron utilizando un microscopio de fluorescencia LW Scientific I4S-EPT4-IPL3 con un rango de excitación de 485 – 510 nm.

Para interpretar los resultados debemos tomar en cuenta que los espermatozoides que producen peróxido de hidrógeno deberían mostrar fluorescencia verde (DCFH-DA), mientras los espermatozoides que no producen peróxido de hidrógeno deberían mostrar fluorescencia roja (IP).

### Estandarización del protocolo de detección de $O_2^-$

Se probaron 3 concentraciones: C1 (DHE 1.25 $\mu$ M), C2 (DHE 6.25 $\mu$ M) y C3 (DHE 12.5 $\mu$ M). Las muestras A (n=10) y B (n=10) fueron incubadas en oscuridad a 25°C por 20 minutos con cada una de las concentraciones de DHE. Posteriormente a la incubación, se agregó 1  $\mu$ M de Yo-Pro1 como control de fluorescencia negativo a todas las muestras. Las lecturas se realizaron utilizando un microscopio de fluorescencia LW Scientific I4S-EPT4-IPL3 con un rango de excitación de 485 – 510 nm. Para interpretar los resultados debemos tomar en cuenta que los espermatozoides que producen anión superóxido deberían mostrar fluorescencia roja o naranja (DHE), mientras los espermatozoides que no producen anión superóxido deberían mostrar fluorescencia verde (Yo-Pro1).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según los protocolos de detección de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  descritos por Mahfouz *et al.* (2009) la concentración óptima de DCFH-DA y de DHE para espermatozoides humanos es de  $25 \mu M$  y  $1.25 \mu M$  respectivamente; sin embargo, en el caso de alpaca dichas concentraciones impiden observar claramente a los espermatozoides. Con respecto a la estandarización del protocolo de detección de  $H_2O_2$  en espermatozoides de alpaca, pudimos apreciar que si las muestras no eran diluidas con PBS, se observaba el campo con una fluorescencia verde muy marcada sin importar la concentración de DCFH-DA. En cambio, al trabajar con muestras diluidas, la concentración óptima de DCFH-DA es de  $2.5 \mu M$ , ya que con las otras 2 concentraciones no se pueden visualizar adecuadamente los espermatozoides. Como podemos observar en la Figura 1, es sumamente fácil de identificar cuáles son los espermatozoides que se encuentran produciendo  $H_2O_2$ , cuando trabajamos con muestras diluidas ( $20 \times 10^6$  espermatozoides/ml) y una concentración de  $2.5 \mu M$  de DCFH-DA, ya que fluorescen con diversas intensidades de verde.

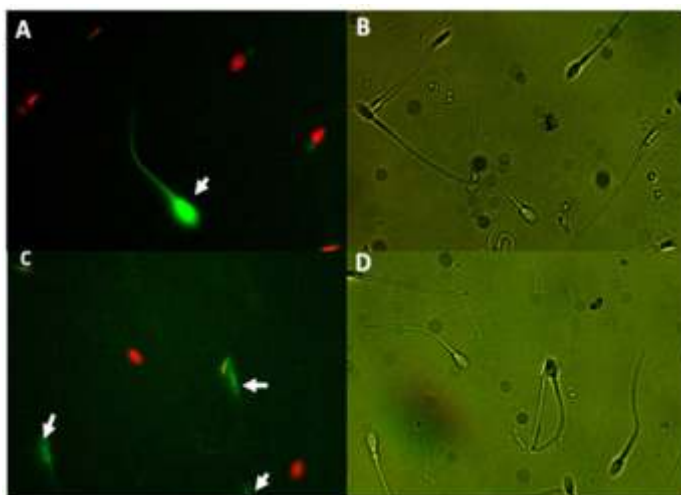


Figura 1. Detección de  $H_2O_2$  en espermatozoides de alpaca: Observaciones con microscopio de fluorescencia (A y C) y con microscopio de luz (B y D). Espermatozoides que fluorescen de verde (flechas) producen  $H_2O_2$

Con respecto a la estandarización del protocolo de detección de  $O_2^-$  en espermatozoides de alpaca, pudimos apreciar que trabajando con la concentración utilizada por Mahfouz *et al.* (2009) en espermatozoides humanos ( $1.25 \mu M$  de DHE), no se lograba detectar  $O_2^-$ , ya que solo se observaba la fluorescencia del control (Yo-Pro1). Fue con la concentración C3 ( $12.5 \mu M$  de DHE) que se logró detectar  $O_2^-$ . Como se puede apreciar en la Figura 2, se pueden diferenciar de manera clara y precisa aquellos espermatozoides que producen  $O_2^-$  (fluorescencia roja o naranja) de aquellos que no producen  $O_2^-$  (fluorescencia verde). Cabe resaltar que los experimentos se realizaron utilizando un microscopio de fluorescencia con un rango de excitación de  $485 - 510 \text{ nm}$  (filtro azul)

y que en el caso del DHE, este fluorocromo precisa de luz con longitudes de onda de  $518 - 606 \text{ nm}$  (filtro verde), es por ello que se uso la combinación de la luz de la lámpara de fluorescencia y la luz de campo claro, obteniéndose así una luz de color verde ( $495 - 566 \text{ nm}$ ) que nos permitió observar el fluorocromo.

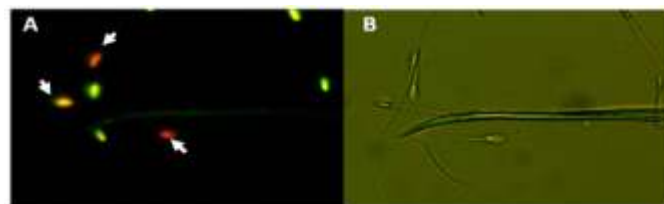


Figura 2. Detección de  $O_2^-$  en espermatozoides de alpaca: Observaciones con microscopio de fluorescencia (A) y con microscopio de luz (B). Espermatozoides que fluorescen de rojo o naranja (flechas) producen  $O_2^-$

## CONCLUSIONES

Las concentraciones adecuadas de DFCHE-DA y DHE para detectar la presencia de peróxido de hidrógeno y anión superóxido en espermatozoides de alpaca son  $2.5 \mu M$  y  $12.5 \mu M$  respectivamente, cuando el semen de alpaca es diluido a una concentración de 20 millones de espermatozoides/mL.

## BIBLIOGRAFIA

- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. 1998. *Biol Reprod* 59:1037-1046.
- Ball BA, Vo AT, Baumber J. 2001. *Am J Vet Res* 62:508-515.
- Mahfouz R, Sharma R, Lackner J, Aziz N, Agarwal A. 2009. *Fertil Steril* 92:819-827.

