



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
BIOLÓGICAS**

**CARRERA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**“ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN ESPERMATOZOIDES
CRIOPRESERVADOS DE ALPACA CON DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE PLASMA SEMINAL”**

Tesis para optar el título profesional de:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presentado por:

Jhoana Stefani Jimenez Carpio (0000-0002-9582-9289)

Asesor:

Shirley Sujey Evangelista Vargas (0000-0001-6105-1889)

Lima – Perú

2021

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 20 de octubre del 2021.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Mg. NATHALY ENCISO BENAVIDES
Miembro: Mg. JORGE LUIS VILELA VELARDE
Miembro: M.V.Z MARTHA ALEJANDRA UGARELLI GALARZA

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:

“ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE ALPACA CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PLASMA SEMINAL”

Presentada por la bachiller:

JHOANA STEFANI JIMENEZ CARPIO

Para optar el Título Profesional de **Médico Veterinario Zootecnista**

Asesorada por la: **Mg. SHIRLEY SUJEY EVANGELISTA VARGAS**

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño de la bachiller de la carrera de **Medicina Veterinaria y Zootecnia** en la sustentación, concluyen de manera unánime (X) por mayoría simple () calificar a:

Tesisista: JHOANA STEFANI JIMENEZ CARPIO			Nota: Diecisiete	
Aprobado ()	Aprobado - Muy buena (X)	Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ()	

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.

ENCISO
BENAVIDES
NATHALY -
Y2096523H

Firmado digitalmente
por ENCISO BENAVIDES
NATHALY - Y2096523H
Fecha: 2021.10.25
23:06:57 +02'00'

Mg. NATHALY ENCISO BENAVIDES
Presidente



Mg. SHIRLEY SUJEY EVANGELISTA VARGAS
Asesora



Mg. JORGE LUIS VILELA VELARDE
Miembro 1



**M.V.Z MARTHA ALEJANDRA UGARELLI
GALARZA**
Miembro 2

DEDICATORIA

A papá, en el cielo;

*Y, a todo aquel que esté luchando contra la depresión y ansiedad, que crea que no
puede seguir más. Sí puedes y sí lo vas a lograr. Confía en ti.*

AGRADECIMIENTOS

Los instrumentos para realizar esta investigación fueron financiados por el Fondo para proyectos de tesis 2018 – 1 para pregrado de la Dirección general de investigación, desarrollo e innovación de la Universidad Científica del Sur, Lima – Perú.

A la Dra. Shirley Evangelista, y el Dr. Alexei Santiani; por guiarme y apoyarme siempre. He aprendido muchísimo siendo parte su equipo de investigación.

Al Sr. Melquiades De la Cruz, encargado de UZYT y ahora un gran amigo. Siempre muy paciente, dispuesto a enseñarme y ayudarme en el trabajo con los animales.

A Fahrid Huanca, un gran ser humano. Me dio una mano justo antes de darme por vencida en este largo camino. No lo sabe, pero le debo un mundo por ello.

A la Sra. Reyna Espíritu y sus pequeñas Helen y Cielo; me ofrecieron su apoyo absolutamente desinteresado en tiempos difíciles durante la investigación.

A Jorge, porque no importa dónde, cuándo o cómo; él siempre está.

A mis almas gemelas en esta vida, Rodolfo y Brian; porque no se tardaron mucho y lograron encontrarme justo a tiempo. Porque en medio de mucho caos, tristeza y desánimo, no solo me acompañaron, sino que lograron hacerme reír una vez mas.

Finalmente y no menos importante, a mi hermosa familia; porque sin ellos no sería la mujer resiliente de hoy; porque son mi refugio cuando la depresión y ansiedad no me dan tregua; y porque a pesar de todo, me han dado y enseñado a dar mucho amor siempre. Soy incapaz de poner en palabras todo lo que siento por ellos. Los amo sin medida.

RESUMEN

Objetivo. Evaluar el estrés oxidativo en el espermatozoide de alpaca criopreservado con diferentes concentraciones de plasma seminal. **Materiales y métodos.** Se emplearon 29 epidídimos de alpaca obtenidos post mortem. Los espermatozoides epididimarios fueron recuperados en un dilutor a base de leche descremada, yema de huevo, fructosa y dimetilacetamina. A continuación, se procedió a separar las muestras en cuatro alícuotas las cuales se mezclaron con plasma seminal (v/v) en una concentración de 0%, 10%, 25% y 50%, respectivamente; luego se evaluó la motilidad, para posteriormente congelarlas. Al descongelamiento se evaluó motilidad, potencial de membrana mitocondrial, viabilidad espermática, peroxidación de lípidos y apoptosis celular mediante citometría de flujo con imágenes. **Resultados.** Los espermatozoides expuestos a 50% de plasma seminal mostraron la motilidad post descongelamiento más baja ($3.5\% \pm 3.7$) y el porcentaje de células apoptóticas más alto ($71.43\% \pm 20.6$). En todas las demás variables, no se hallaron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$). **Conclusiones.** Se obtienen mejores resultados en los parámetros seminales post descongelamiento agregando plasma seminal en una concentración entre 0 y 25%.

Palabras Clave: Plasma seminal, alpaca, estrés oxidativo, espermatozoide, criopreservación.

ABSTRACT

Objective. To assess the oxidative stress on alpaca sperm frozen with different concentration of seminal plasma. **Materials and methods.** 29 post mortem alpaca epididymis were used. Epididymal sperm were suspended in a diluent based on skim milk, egg yolk and fructose and dimethylacetamine. Samples were separated into four aliquots which were then mixed with seminal plasma (v / v) in concentrations of 0%, 10%, 25% and 50% respectively; then, motility was assessed before freezing; then, motility was assessed before freezing. After thawing, mitochondrial membrane activity, sperm viability, lipid peroxidation and cell apoptosis were assessed using flow cytometry with images. **Results.** Sperm exposed to 50% seminal plasma showed the lowest post-thaw motility ($3.5\% \pm 3.7$) and the highest percentages of apoptotic cells ($71.43\% \pm 20.6$). No significant differences were found in the rest of parameters. **Conclusions.** Better results in post-thaw sperm parameters may be obtained when seminal plasma is included in concentration up to 25%.

Keywords: Seminal plasma, alpaca, oxidative stress, sperm, cryopreservation.

INTRODUCCIÓN

La viscosidad del plasma seminal (PS) de alpaca dificulta el manejo del semen y la interacción de los espermatozoides con los crioprotectores, lo cual hace necesaria su licuefacción (1). Sin embargo, esto no excluye que el plasma seminal sea un medio protector para los espermatozoides (2), sobre todo durante procesos ajenos a su fisiología normal, como lo es el congelamiento, el cual involucra eventos de estrés térmico, osmótico y oxidativo.

El estrés oxidativo ocurre por un incremento desmedido de las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), generadas de la reducción incompleta de oxígeno(3) durante el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial (4). Los espermatozoides son particularmente susceptibles a ellos por la gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de su membrana (3) y su insuficiente cantidad de enzimas antioxidantes intracelulares(5).

Los ROS provocan el reordenamiento de fosfolípidos de membrana y alteran el flujo de iones en los espermatozoides, lo cual es necesario en procesos fisiológicos normales como el incremento de motilidad (4), capacitación espermática y reacción acrosomal (6). Por el contrario, su excesiva producción está asociada a la reducción de motilidad (7); activación de la vía de apoptosis (8); disminución de la viabilidad, integridad de membrana y fertilidad (5).

En alpacas, durante la criopreservación los ROS se incrementan (9) provocando disminución de la motilidad, integridad de membrana plasmática, integridad de membrana acrosomal, actividad mitocondrial, viabilidad y fragmentación de ADN (10).

Se ha reportado que concentraciones de PS al 10% logran mantener la motilidad e integridad acrosomal y reducen el porcentaje de espermatozoides muertos (11); y, al ser adicionado al descongelamiento mejora la motilidad, funcionalidad de membrana y morfología espermática(12). En llamas, se observó que la presencia de PS modifica el patrón de movimiento de los espermatozoides y su ausencia produce la reacción acrosomal espontánea de los mismos; además, en concentraciones de 10 y 50% no es capaz de protegerlos frente al daño producido por la criopreservación; y cuando es agregado después del descongelamiento, tampoco es capaz de mejorar la supervivencia espermática (13).

A la fecha no existen protocolos para el congelamiento de espermatozoides de alpaca, que permitan mantener parámetros de calidad espermática adecuados para lograr tasas de preñez satisfactorias o similares a las obtenidas con semen fresco (14). Además, aún no se tiene claro el rol que cumple la concentración de PS en la prevención del estrés oxidativo producido durante el congelamiento de espermatozoides de alpaca. Por tal motivo, el presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de diferentes concentraciones de PS sobre el estrés oxidativo en espermatozoides criopreservados de alpaca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Manejo del material biológico. El PS se obtuvo de semen colectado con vagina artificial de 3 animales adultos con fertilidad probada. La viscosidad se eliminó mecánicamente con una jeringa (3 ml - 25 G x 5/8") (15); y se centrifugó 2 veces a 600 G por 8 min para eliminar espermatozoides e impurezas. Al finalizar, el sobrenadante se almacenó en nitrógeno líquido (-196°C) hasta su uso.

Los espermatozoides se obtuvieron de 29 epidídimos de alpaca post mortem provenientes del matadero municipal de Huancavelica-Perú, los cuales fueron transportados junto con los testículos dentro del saco escrotal en bolsas individuales con Cloruro de Sodio (NaCl) al 0.9% a 5°C (16). En el laboratorio, los epidídimos fueron aislados y lavados individualmente con NaCl al 0.9% a 37°C; luego se realizaron cortes seriados en cada epidídimo por separado para la recuperación de espermatozoides, la cual se realizó en 1 ml de dilutor en base a leche descremada (18.96 ml), yema de huevo (1 ml), fructuosa (0.960 g) y dimetilacetamida (40 µL). Seguidamente, se evaluó la motilidad progresiva (%) de cada muestra utilizando un microscopio óptico de luz clara (Eclipse E-100, Nikon, Japón). En seguida, cada muestra se dividió en 4 alícuotas para ser suplementadas con PS (v/v) a diferentes concentraciones, 0% (0%PS), 10% (10%PS), 25% (25%PS) y 50% (50%PS) a 37°C, previamente descongelado; cuyas molaridades se modificaron, como se muestra en la Figura 1. Finalmente, los tratamientos se congelaron en pajillas de 0.25 ml en nitrógeno líquido.

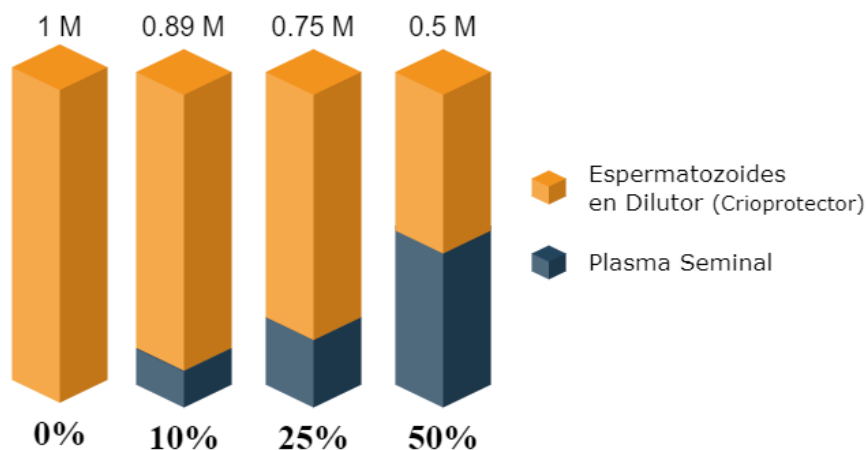


Figura 1. Esquema de molaridades del crioprotector contenido en cada tratamiento de plasma seminal del estudio. *Elaboración propia.*

Criopreservación de espermatozoides. El congelamiento se realizó con el sistema de cryopreservación Freeze Control® (CryoLogic, Australia), programa 7, cuya curva de enfriamiento inicia a los 20°C y desciende gradualmente por 90 min; seguido de un periodo de estabilización (30 min) a los 5°C; y un descenso rápido a partir de los 120 min hasta llegar a los -35°C en el minuto 140. Inmediatamente después las pajillas fueron transferidas directamente al tanque de nitrógeno líquido.

Las muestras se descongelaron en baño maría a 37°C por 1 min y se evaluó la motilidad (%). Para reitrar el dilutor de la muestra se realizaron 2 lavados: en el primero se agregó Buffer fosfato salino (PBS) a 37°C y se centrifugación a 600 G por 8 min; en el segundo lavado, el pellet se resuspendió en PBS nuevamente y se separó en 2 alícuotas iguales que se centrifugaron por última vez. Una alícuota sirvió para evaluar viabilidad y apoptosis celular; y la otra, para peroxidación lipídica y actividad mitocondrial, mediante citometría de flujo. Para la adquisición de datos, se utilizó un citómetro de flujo con analizador de imágenes (FlowSight, Amnis 2012, USA) y el software INSPIRE® versión

100.2.1955 (Seattle, EEUU) tomando 10 000 eventos por cada muestra. Finalmente, el análisis de datos se realizó con el software IDEAS® versión 5.0 (Seattle, EEUU) a través de gráficos de puntos e histogramas. Los histogramas representaron la presencia o ausencia de una sola sonda; mientras que los gráficos de puntos, representaron el cruce de 2 canales, es decir, 2 sondas fluorescentes.

Evaluación de viabilidad espermática (VE) y apoptosis celular (AC). Para identificar la viabilidad espermática se utilizó Ioduro de Propidio (P4864, Sigma Aldrich) en conjunto con el kit FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (V13242, Molecular Probes), para marcar aquellos espermatozoides que estuvieran atravesando por apoptosis.

Después del segundo lavado post descongelamiento, la sonda FITC Annexin-V (ANX) se utilizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El pellet se resuspendió en 100µL de Buffer, con 5µL de FITC Annexin-V (Componente A) y se incubó por 15 min a temperatura de ambiente; en seguida se agregó 0.5 µL de solución de trabajo de Ioduro de propidio (IP) y se incubó por 10 min en oscuridad. Al finalizar, se agregó 400µL de Buffer y se conservó en baño de hielo a 4°C (HC110-Pro Digital Thermal Dry-Bath, Scilogex, USA) hasta la adquisición. Tanto IP como ANX fueron excitadas con un láser de longitud de onda 488 nm, a una potencia de 30 mW y se detectaron en los canales 2 (560 – 595nm) y 5 (642 – 740nm) respectivamente.

Evaluación de actividad mitocondrial (AM) y peroxidación lipídica de membrana (PL). Para medir el potencial de membrana mitocondrial (PMM) se utilizó MitoTracker Deep Red 633 (M22426, Molecular Probes) en conjunto con C11 BODIPY 581/591 (D3861, Molecular Probes), para detectar la presencia de procesos de oxidación lipídica.

Después del segundo lavado post descongelamiento, se agregó 1 μ L de solución stock (200 μ M) de BODIPY (BP) en 100 μ L de muestra, para llegar a una concentración final de 2 μ M y se incubó a 37°C por 30 min. Para el control positivo, antes de utilizar BP, se agregó 10 μ L de sulfato ferroso (215422, Sigma Aldrich) a 800 μ M, para llegar a una concentración final de 80 μ M; y se incubó a 37°C por 60 min. Finalmente, se agregó 0.5 μ L de solución de trabajo de MitoTracker Deep Red 633 (MDR) para llegar a una concentración final de 100 μ M; y se incubó por 10 min a 37°C en oscuridad. MDR fue excitada con un láser de 642 nm a una potencia de 15 mW, que se detectó en el canal 11 (642 – 740nm). Por otro lado, BP fue excitada con un láser de 488 nm a una potencia de 30 mW y se detectó en dos canales: 5 (642 – 740nm) para la sonda intacta (rojo); y 2 (560 – 595nm) para la sonda oxidada (verde).

Análisis estadístico. Este estudio es experimental de tipo transversal, cuyo análisis estadístico se realizó con el software Stata/SE Versión 16.1 (StataCorp LLC, Texas, USA). Para determinar el efecto de la concentración de PS sobre el estrés oxidativo en los espermatozoides epididimarios de alpaca post congelamiento, se analizaron las variables cuantitativas continuas (en unidad de porcentaje): motilidad progresiva, antes y después del congelamiento; viabilidad espermática, actividad mitocondrial, peroxidación lipídica y apoptosis celular post descongelamiento. Para probar que todas las poblaciones tuvieran una distribución normal ($p > 0.05$), se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. En todos los casos, no se presentó una distribución normal, por lo que se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$); y, para determinar la diferencia estadística entre los grupos, se utilizó la misma confrontando cada grupo, uno por uno.

RESULTADOS

El citómetro de flujo que se utilizó en este estudio tenía incorporado un analizador de imágenes, el cual hizo posible la verificación visual de cada espermatozoide en cada población según el canal y sonda fluorescente utilizada, tanto en la adquisición de datos como en su análisis posterior (Figura 2).

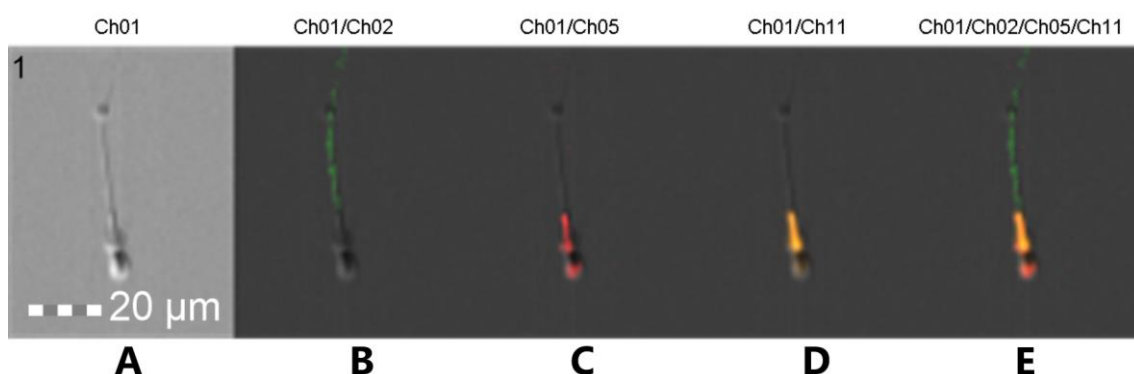


Figura 2. Espermatozoide epididimario de alpaca post descongelamiento (A) con alto potencial de membrana mitocondrial y peroxidación lipídica en su membrana (E); marcado con la sonda Mitotracker Deep Red (D) y la sonda BODIPY intacta (C) y oxidada (B). *Elaboración propia.*

Asimismo, dicha herramienta permitió establecer de forma más precisa los límites de cada grupo de espermatozoides en la muestra; siendo que, en el caso de los histogramas, permitió establecer dos poblaciones muy bien definidas (espermatozoides con fluorescencia alta y fluorescencia baja); mientras que, en los gráficos de puntos, hicieron posible establecer cada cuadrante correctamente; tanto para el estudio de apoptosis celular, como de peroxidación lipídica, tal cual se expone en las muestras representativas de las Figuras 3 y 4, respectivamente.

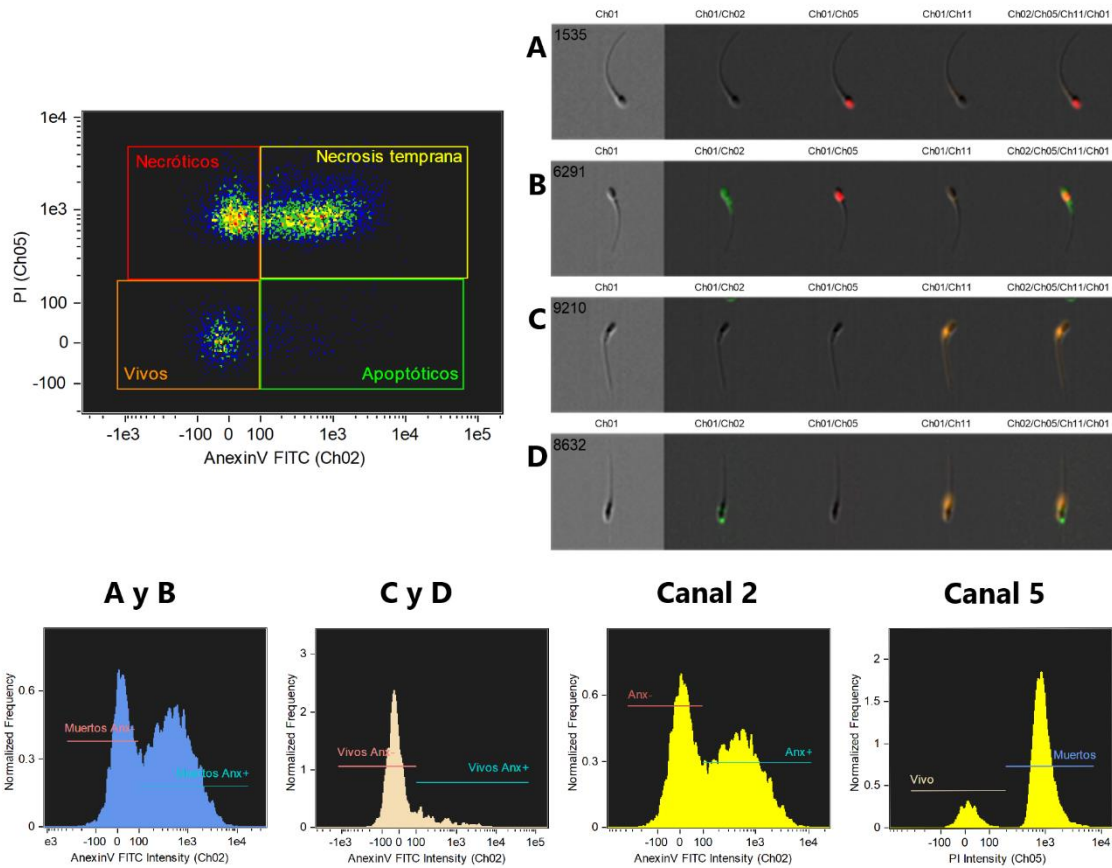


Figura 3. Gráfico de puntos de Ioduro de Propidio (**Canal 5**) versus FITC Annexin V (**Canal 2**) para el análisis de **viabilidad esperámtica** y **apoptosis celular** mediante citometría de flujo con imágenes, en espermatozoides epididimarios de alpaca, con sus respectivos histogramas según canal de detección. **A)** Espermatozoides necróticos (FITC AnnexinV-/PI+), **B)** Espermatozoides con necrosis temprana (FITC AnnexinV+ /PI+), **C)** Espermatozoides vivos (FITC AnnexinV- /PI-); y **D)** Espermatozoides Apoptóticos (AnexinV+ /PI-). *Elaboración propia.*

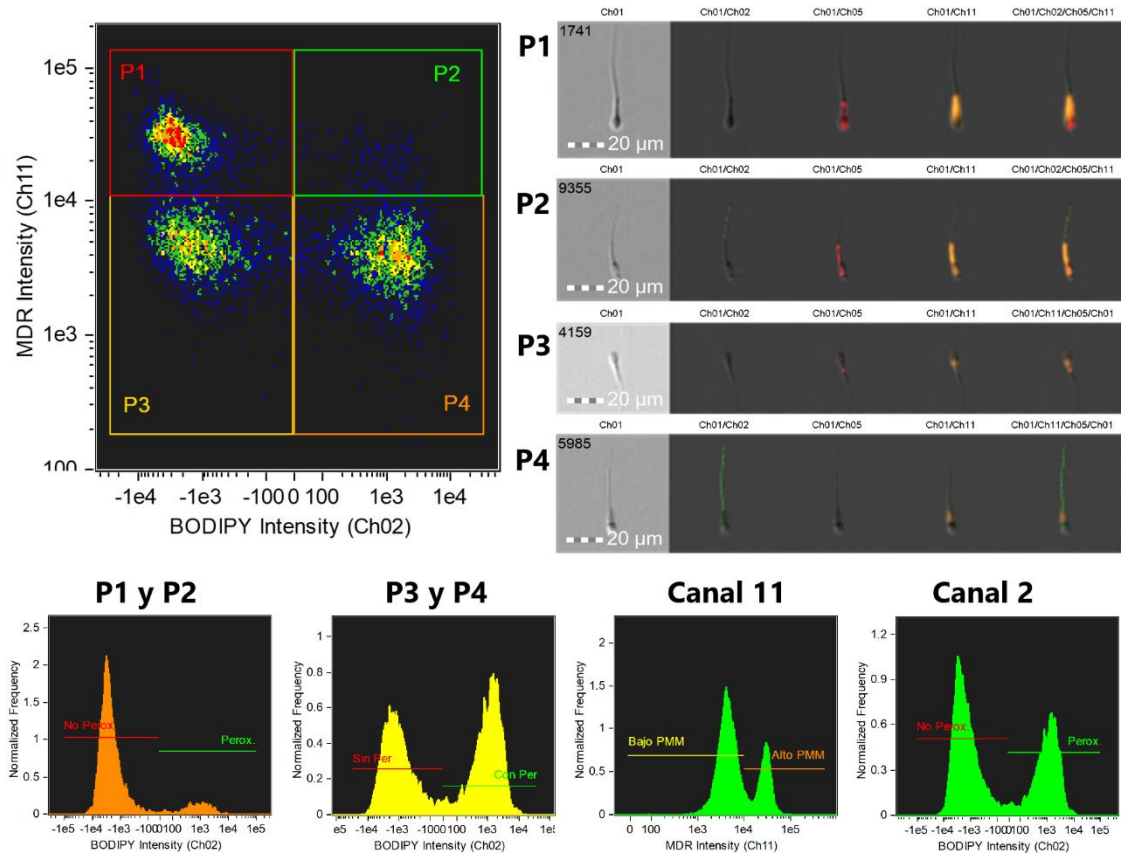
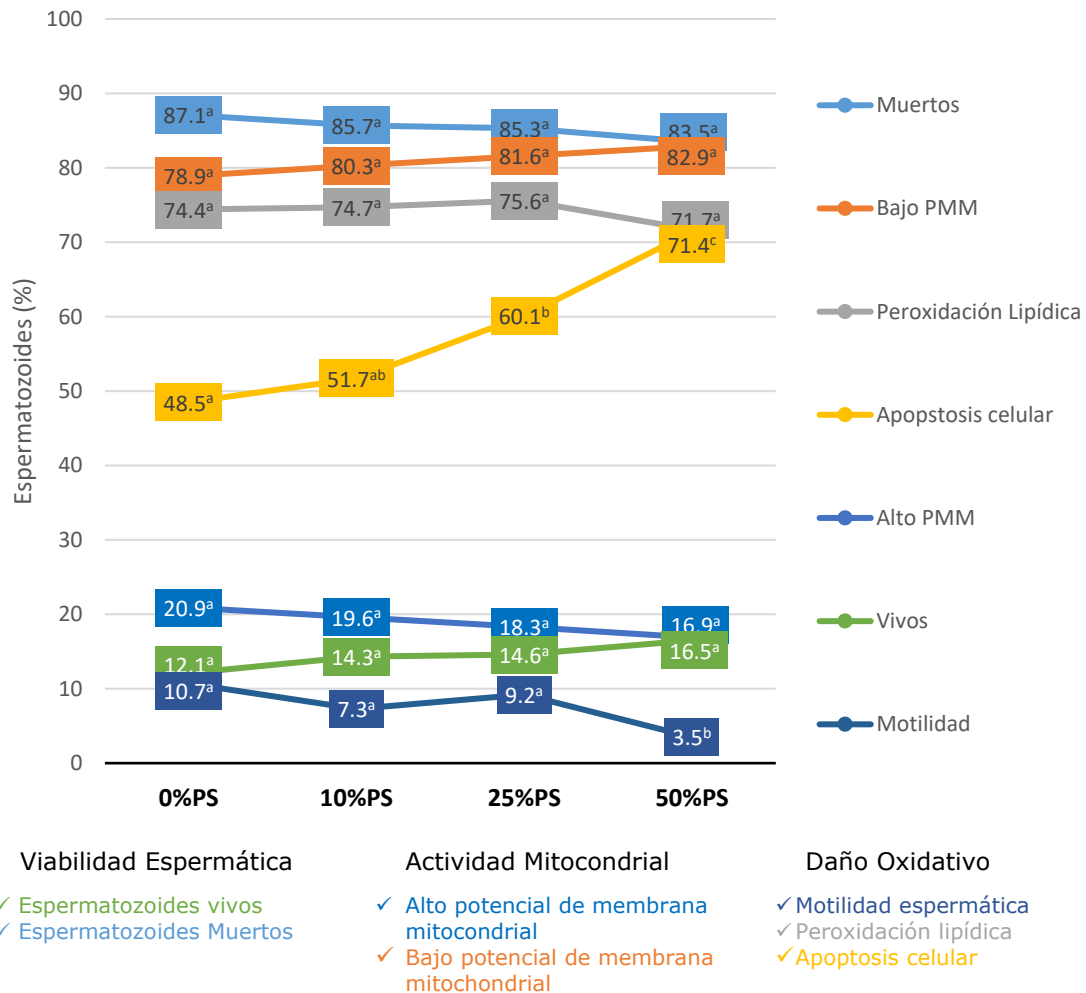


Figura 4. Gráfico de puntos de Mitotracker Deep Red (**Canal 11**) versus C11- BODIPY (**Canal 2**) para el análisis de peroxidación lipídica por citometría de flujo con imágenes en espermatozoides epididimarios de alpaca, con sus respectivos histogramas según canal de detección: **P1**) Espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial sin peroxidación (MDR+ /BP-), **P2**) Espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial con peroxidación (MDR+ /BP+), **P3**) Espermatozoides con bajo potencial de membrana mitocondrial, sin peroxidación (MDR- /BP-); y **P4**) Espermatozoides con bajo potencial de membrana mitocondrial, con peroxidación (MDR- /BP+). *Elaboración propia.*

Cabe resaltar que los resultados de la Figura 5 provienen del análisis únicamente de histogramas de cada sonda; mientras que, las figuras posteriores se han formulado en base a los resultados provenientes de gráficos de puntos (Figura 6 y 7).

Los parámetros generales obtenidos en cuanto a viabilidad espermática, potencial de membrana mitocondrial y daño oxidativo post descongelamiento en los

espermatozoides epididimarios de alpaca según la suplementación de 0%, 10%, 25% y 50% de plasma seminal, se detallan en la Figura 5.



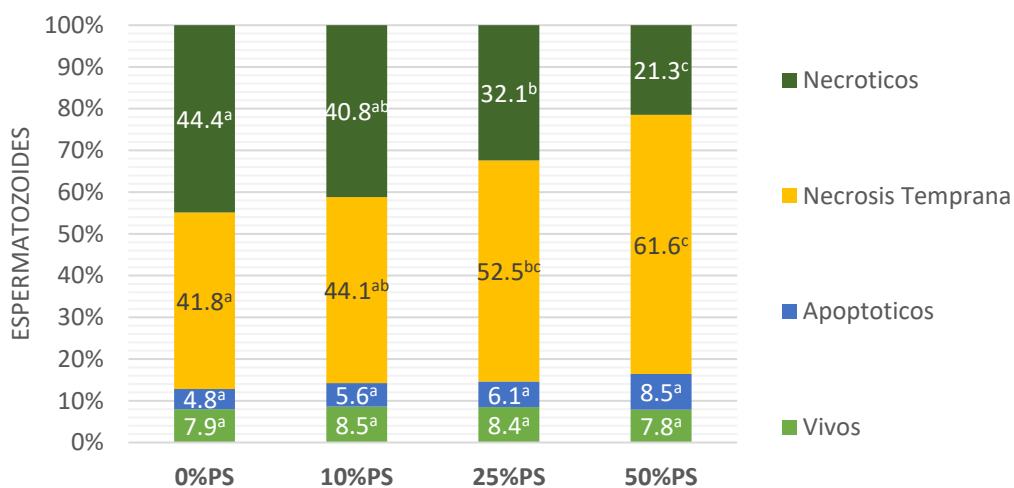
a,b,c Superíndices diferentes dentro del mismo color distintivo (variable) indican diferencias significativas entre grupos experimentales ($p \leq 0.05$). Los valores son promedios porcentuales.

Figura 5. Parámetros seminales post descongelamiento de espermatozoides epididimarios de alpaca sometidos a 4 concentraciones distintas de plasma seminal. Lima – Perú, 2021. ($n=29$)

Respecto a la VE, el porcentaje de espermatozoides vivos post descongelamiento fue considerablemente bajo en todos los grupos experimentales; siendo ligeramente mayor en el grupo 50%PS, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$)

(Figura 5). Por otro lado, en el porcentaje de espermatozoides con alto PMM se puede apreciar una ligera disminución a medida que aumenta la concentración de PS, sin hallarse diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Figura 5).

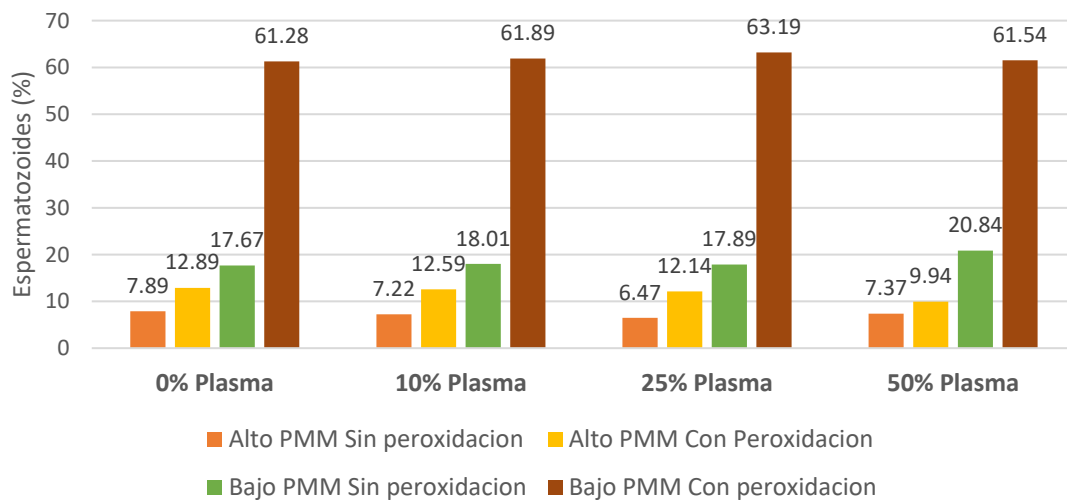
Los niveles de AC fueron estadísticamente distintos entre los grupos ($p \leq 0.05$), obteniéndose los mejores resultados para el grupo 0%PS (Figura 5). Cabe resaltar que la distribución de AC entre las poblaciones de espermatozoides vivos y muertos fue distinta entre los grupos. Es así que, la población de espermatozoides con necrosis temprana fue menor que la población de espermatozoides necróticos en el grupo 0%PS; mientras que, en los demás grupos esta diferencia se invierte (Figura 6). La diferencia entre las poblaciones de espermatozoides con necrosis temprana y espermatozoides necróticos es considerablemente mayor en el grupo 50%PS y va disminuyendo conforme se reduce la concentración de PS.



^{a,b,c} Superíndices diferentes dentro del mismo color distintivo (variable) indican diferencia significativas entre grupos experimentales ($p \leq 0.05$). Los valores son promedios porcentuales.

Figura 6. Distribución de apoptosis celular post descongelamiento en espermatozoides epididimarios de alpaca sometidos a 4 concentraciones distintas de plasma seminal. Lima – Perú, 2021. ($n = 29$)

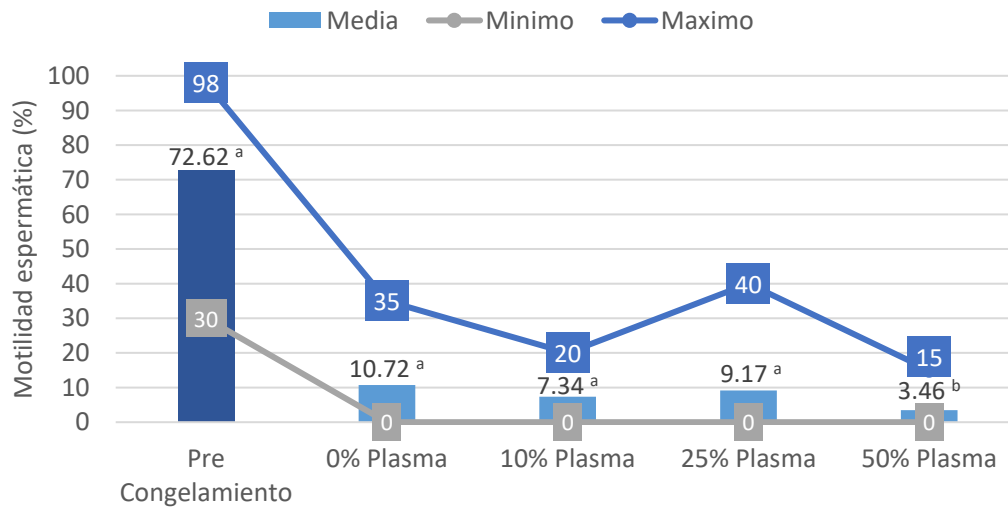
Los niveles de PL en los cuatro grupos experimentales fueron similares entre sí, mayores a 70%. Asimismo, aunque no se halló diferencia estadística entre los grupos, nuevamente se pudo apreciar una ligera disminución para 50%PS, en comparación con los demás grupos (Figura 5). A pesar de ello, la distribución de los niveles de PL entre poblaciones de espermatozoides con alto y bajo PMM fue muy similar entre los grupos, siendo la proporción de PL siempre mayor en ambos casos (Figura 7).



No existe diferencias significativas entre grupos experimentales ($p \leq 0.05$). Los valores son promedios porcentuales.

Figura 7. Distribución de peroxidación lipídica de membrana plasmática según potencial de membrana mitocondrial post descongelamiento, en espermatozoides epididimarios de alpaca sometidos a 4 concentraciones distintas de plasma seminal. Lima – Perú, 2021. ($n=29$)

Finalmente, los espermatozoides de alpaca recuperados de epidídimo tuvieron una concentración espermática media de 144×10^6 espermatozoides/ml (rango: $418 - 8 \times 10^6$ espermatozoides/ml); con una motilidad espermática previa al congelamiento de tipo progresiva, alcanzando un promedio de $72.6\% \pm 17.2$ (Figura 8).



^{a,b,c} Superíndices diferentes dentro del mismo color distintivo (variable) indican diferencia significativas entre grupos experimentales ($p \leq 0.05$). Los valores son promedios porcentuales.

Figura 8. Motilidad progresiva de espermatozoides epididimarios de alpaca antes y después del congelamiento con 4 concentraciones distintas de plasma seminal. Lima – Perú, 2021. ($n=29$)

La motilidad espermática post descongelamiento (media \pm DE) en todos los grupos fue menor a 10%. El grupo 50%PS obtuvo la motilidad post descongelamiento estadísticamente más baja ($3.5\% \pm 3.7$); mientras que, entre las concentraciones de 0%, 10% y 25%, no hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$), resultando ser $10.7\% \pm 9.4$; $7.3\% \pm 5.7$ y $9.2\% \pm 10.4$ respectivamente (Figura 8).

DISCUSION

El presente estudio investigó el efecto de 4 concentraciones de plasma seminal en el congelamiento de espermatozoides epididimarios de alpaca con el fin de (I) identificar el daño oxidativo que puede darse sobre las células y (II) proponer la concentración de plasma seminal más adecuada para el congelamiento de espermatozoides de alpaca, que resulten con menores efectos deletéreos en cuanto al daño oxidativo.

En esta investigación se optó por utilizar espermatozoides recuperados de epidídimo porque, además de ser un modelo experimental factible (16), también tienen la condición de no haber sido previamente expuestos a los componentes del PS, lo cual resulta necesario y pertinente para efectos del presente estudio.

La **motilidad inicial** en el presente estudio fue considerablemente más alta en comparación a las obtenidas por otros autores utilizando espermatozoides epididimarios de alpaca, quienes obtuvieron motilidades de $31.3\% \pm 3.5$ y $36.8\% \pm 12.8$ (16,17). Esto podría deberse al dilutor utilizado en ambos estudios (Tris) el cual no contenía proteínas de la leche y lipoproteínas de baja densidad (LDL), que se han demostrado que protegen a los espermatozoides del choque térmico y mejoran motilidad espermática entre otros parámetros (18). Por otro lado, aunque otros autores utilizaron el mismo dilutor (a base de leche descremada, yema de huevo y fructuosa) también reportaron motilidades menores ($46.1\% \pm 7.7$; $68.9\% \pm 6.1$ y $62.5\% \pm 19.4$) (19–21), lo cual podría deberse a que existen diferencias en los parámetros espermáticos entre individuos y dentro de ellos. (22).

La **motilidad post descongelamiento** (media \pm DE) del tratamiento 50%PS (3.46% \pm 3.7), fue diferente significativamente en comparación a los demás, que fueron estadísticamente iguales entre ellos (10.7% \pm 9.4; 7.3% \pm 5.7 y 9.2% \pm 10.4 respectivamente). La motilidad en el tratamiento 0%PS, fue similar a la observada por Morton *et al.* (23) quienes obtuvieron 8.6% \pm 1.8 en espermatozoides epididimarios en ausencia de PS. Sin embargo, diversos autores que utilizaron el mismo dilutor, obtuvieron motilidades más altas que las observadas en este estudio (52.7% \pm 5.7, 17% \pm 4.3, 24.1% \pm 6.5 y 13.6% \pm 10.7) (16,19,20,24). Asimismo, respecto a los tratamientos con PS, Torres (25) agregando 0% 10% y 50% de PS en alpacas, obtuvo 13.5%, 16.8% y 29% de motilidades post descongelamiento respectivamente; y en llamas, Fumuso (13) obtuvo 29.5% \pm 5.7, 28% \pm 12.3 y 19% \pm 12.7; en ambos casos, motilidades más altas que las reportadas en este estudio. Con respecto a ello, se ha reportado tanto en alpacas (16) como llamas (13) que, a medida que transcurre el tiempo, la motilidad espermática disminuye; en consecuencia, la diferencia en nuestros resultados podría deberse al extenso tiempo de procesamiento previo al congelamiento y la compleja metodología; incluso a pesar de haber tenido el cuidado necesarios en cuanto a temperatura e iluminación.

Los parámetros de **viabilidad espermática** estuvieron entre 12 - 16.5%, con un ligero pero gradual incremento de valores a medida que aumenta la concentración de PS, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas. Estos valores concuerdan con los porcentajes de motilidad progresiva obtenida en este mismo estudio, lo cual coincide con lo reportado por Juárez & Santiani (20), quienes encontraron una correlación positiva entre ambas variables.

Siguiendo con ello, los porcentajes de VE están muy por debajo de estudios previos que obtuvieron 32.3% y 33.8% (19,20); y similares a los obtenidos por Contreras et al. (26), quien reportó 13.5% al descongelamiento. De igual forma, respecto a los parametros de **actividad mitocondrial** en el presente estudio, estos fueron entre 20.9% y 16.9% de espermatozoides con alto PMM, ligeramente mayores a medida que disminuye la concentración de PS, sin ser estadísticamente distintos entre los grupos (Figura 5); además, nuevamente son menores a los encontrados por Zurita (19) y mayores a los reportados por Contreras et al. (26), $34.4\% \pm 18.1$ y $13\% \pm 3.1$ respectivamente.

Aunque todos los grupos de investigación utilizaron animales de descarte durante temporadas similares de estudio, estas diferencias podrían explicarse debido a la concentración del crioprotector contenida en el dilutor; dado que, los crioprotectores al ser de bajo peso molecular y altamente permeables, pueden proteger al espermatozoides del daño por congelamiento (27) durante el cual ocurre un desbalance osmótico que involucra el colapso celular asociado a la formación de hielo extracelular (28); por ello, su presencia siempre resulta esencial y necesaria. En este sentido, podemos observar que Contreras et al. (26) y este estudio utilizaron dimetilacetamida a concentraciones de 0.77M; y, 0.89M, 0.75M y 0.5M; respectivamente; mientras que, Zurita (19) utilizó el mismo crioprotector a una molaridad mayor (1M).

Por otro lado, en relación al parámetro espermático de **apoptosis ceular**, esta investigación es el primer estudio que reporta apoptosis en espermatozoides epididimarios de alpaca post congelamiento, analizados mediante citometría de flujo. Por otra parte, se le hicieron ligeras modificaciones al protocolo del fabricante a fin de depurar aquellas poblaciones de detritus que pudiesen enmascarar resultados. Se

adicionó MDR al protocolo de AC, siendo que la detección de dicha sonda no se cruzaba con las demás.

Annexin V es una proteína de unión a fosfolípidos, Ca^{2+} dependiente, con afinidad por los fosfolípidos Fosfatidilserina de la membrana celular. Bajo condiciones normales, los fosfolípidos de la membrana están distribuidos asimétricamente (29), estando fosfatidilserina y Fosfatidiletanolamida en la cara interna; y, Esfingomielina y Fosfatidilcolina en la externa (30). Esta asimetría puede colapsar debido a eventos fisiológicos como el envejecimiento celular, activación de linfocitos o muerte celular programada (apoptosis) durante los cuales, Fosfatidilserina se transloca a la cara externa de la membrana para marcar la célula que será fagocitada por los macrófagos (31).

De esta forma, Annexin V en combinación con isotiocianato de fluoresceína (FITC) es un marcador de actividad apoptótica, que al utilizarse con IP permiten diferenciar células viables de forma más específica. A diferencia de los protocolos que emplean sondas complementarias, como SYBER-14 y PI (32) para identificar células viables a partir de la integridad de su membrana plasmática; esta nueva combinación logra discriminar células realmente viables, que no hayan activado sus mecanismos de apoptosis dentro de aquellas que mostraron membrana intacta (IP-).

Entonces, respecto a los resultados de AC, estos fueron 48.5%, 51.7%, 60.1% y 71.4% respectivamente; encontrando diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de 0%PS y 10%PS, en contraste con el tratamiento de 25%; y nuevamente distintas al tratamiento 50%PS. Como se observa, hubo un incremento gradual de AC a medida que se incrementa la concentración de PS, llegando a valores superiores de 70%, lo cual resulta importante si se desean emplear dichos resultados en

programas de inseminación artificial. Cabe resaltar que el porcentaje de AC en la muestra incluye tanto la población de espermatozoides marcados vivos (PI-) como muertos (PI+). Es decir, la población que realmente estaría apta para ser utilizada en protocolos de inseminación artificial, sería alrededor de 8%.

Por otro lado, la proporción de espermatozoides necróticos (ANX- /PI+) es mayor en 0%PS; mientras que, la proporción de espermatozoides con necrosis temprana (ANX+ /PI+) aumenta a medida que aumenta la concentración de PS, lo cual permite inferir que podría existir un efecto protector del PS a nivel estructural que estaría evitando la fractura o ruptura de la membrana plasmática durante el congelamiento, a pesar de tener menor cantidad de crioprotector en el dilutor. En decir, este efecto podría haber permitido que las membranas plasmáticas de las células permanecieran intactas por más tiempo, hasta activar sus propios mecanismos fisiológicos de muerte celular programa, en lugar de perder su integridad de inmediato (PI+) debido al congelamiento.

Esta teoría se sustenta principalmente en la molaridad del crioprotector utilizado en cada tratamiento; dado que, la concentración inicial del dilutor de base para el alicuotado y formulación de cada tratamiento fue de 0.99 M \approx 1 M; sin embargo, no todos los tratamientos tuvieron dicha molaridad. La suplementación de PS sobre la suspensión de espermatozoides en dilutor (volumen/volumen), indirectamente causó que la molaridad del crioprotector disminuyera a medida que aumentaba la concentración de PS. En consecuencia, las molaridades en cada tratamiento finalmente fueron 1 M (0%PS), 0.89 M (10%PS), 0.74 M (25%PS) y 0.5 M (50%PS).

Con respecto a la **peroxidación lipídica**, es necesario recordar que BP es un fluorocromo que marca células a partir de la oxidación de su estructura; es decir, cuando la sonda

está inicialmente intacta tiene fluorescencia roja, que al ingresar a la célula y ser oxidada por ROS en el medio, modifica su estructura y fluorescencia irreversiblemente a verde. Asimismo, al ser un análogo de ácidos grasos, difunde fácilmente a través de la bicapa lipídica y el riesgo de perderse con los lavados, es mínimo. Por ello, los lavados previos al uso de BP son imprescindibles para evitar que la sonda lipofílica se una a la yema de huevo del dilutor (33). En resumen, debido al mecanismo de acción de BP, el tiempo y la concentración de ROS son dos puntos importantes a tomar en cuenta.

Los niveles de PL estuvieron entre 72% y 76% con una ligera pero gradual disminución conforme se incrementa la concentración de PS, sin haber diferencia estadística significativa. Estos resultados son similares a los reportados por Evangelista et al (9), quien obtuvo 75% de espermatozoides reactivos a O_2^- y 79% de espermatozoides reactivos a H_2O_2 después del congelamiento. Por el contrario, Santiani et al (17) reportaron menos de 1% de PL en espermatozoides epididimarios frescos. Esto se debe a que durante el congelamiento se incrementa la producción de ROS (9) y esto a su vez provoca peroxidación de membranas y estrés oxidativo.

Por otro lado, en la figura 7 se observa que la proporción de los cuatro grupos de espermatozoides en cada tratamiento son similares, aun existiendo un déficit gradual de crioprotector, inverso a la concentración de PS (Figura 1). Asimismo, se sabe que el PS contiene antioxidantes que podrían contrarrestar el déficit intracelular de los mismos, en caso de estar frente a estrés oxidativo generado durante la criopreservación. Entonces, aunque los resultados respecto a PL en este estudio no son concluyentes, permite cuestionar si la presencia del PS en las muestras podría estar contrarrestando

el efecto oxidativo de la deficiencia de crioprotector en cada tratamiento, para lo cual es necesario más estudios.

Continuando con el análisis, se observa que la proporción de espermatozoides con alto PMM sin PL (Alto PMM /BP-) concuerda con los parámetros de AC (ANX+ /PI-), el mismo que determina que aproximadamente un 8% de la muestra sería apta para técnicas de inseminación artificial (Figuras 6 y 7). Asimismo, los eventos de PL en su mayoría se ubican dentro del grupo de espermatozoides de bajo PMM (Bajo PMM/ BP+). En efecto, tanto en espermatozoides con alto como bajo PMM, la proporción de PL es mayor (Figura 7). Sin embargo, este no es un resultado del todo negativo ya que, en principio, esta sonda no marca una sola estructura celular en cada célula; sino que, al ser un fluorocromo intrínsecamente lipofílico puede atravesar e ingresar en toda la extensión de la membrana espermática; al mismo tiempo, puede mostrarse reactiva en zonas cercanas a eventos de peroxidación y permanecer intacta en aquellas que no (Figura 2). Debido a ello, para la interpretación de este parámetro, recomendamos que debe ser de forma global, midiendo niveles de peroxidación, mas no cantidades de espermatozoides con peroxidacion lipidica, vivos o muertos. En resumen, un espermatozoide que este experimentando PL, no necesariamente es un espermatozoides inviable o incapaz de fecundar, ya que los ROS son fisiológicamente necesarios en procesos asociados a capacitación (34).

Para finalizar, como se evidencia en el presente estudio, la presencia de PS adicionado al dilutor de congelamiento, tiene un efecto positivo sobre la membrana plasmática de los espermatozoides epididimarios de alpaca respecto al daño oxidativo como consecuencia del proceso de criopreservación.

CONCLUSIONES

La presencia del plasma seminal no afecta la viabilidad, la actividad mitocondrial, ni la peroxidación lipídica de los espermatozoides epididimarios de alpaca durante el proceso de criopreservación; sin embargo, cuando se elimina o se agrega hasta en un 25% en el proceso de criopreservación, es posible obtener mejores resultados en cuanto a motilidad espermática y apoptosis celular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kershaw-Young CM, Maxwell WMC. Seminal Plasma Components in Camelids and Comparisons with Other Species. *Reprod Domest Anim.* 2012 Aug;47(SUPPL.4):369–75.
2. Zhang G, Yang W, Zou P, Jiang F, Zeng Y, Chen Q, et al. Mitochondrial functionality modifies human sperm acrosin activity, acrosome reaction capability and chromatin integrity. *Hum Reprod.* 2019 Jan 1;34(1):3–11.
3. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: Chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010 Aug 1;15(4):186–90.
4. Durairajanayagam D, Singh D, Agarwal A, Henkel R. Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction. *Andrologia.* 2021 Feb 1;53(1).
5. Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int.* 2011;2011.
6. Sabeti P, Pourmasumi S, Rahiminia T, Akyash F, Talebi AR. Etiologies of sperm oxidative stress. *Int J Reprod Biomed.* 2016 Apr 1;14(4):231–40.
7. Aitken RJ, Baker MA, Nixon B. Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? *Asian J Androl.* 2015 Jul 1;17(4):633–9.
8. Aitken RJ. Not every sperm is sacred; a perspective on male infertility. *Mol Hum Reprod.* 2018 Jun 1;24(6):287–98.

9. Evangelista S, Trelles X, Muchotrigo D, Choez K, Santiani A. Producción intracelular de anión superóxido, peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica durante el proceso de criopreservación de semen de alpaca. *Spermova*. 2014;4(1):61–3.
10. Rodriguez Llanos CV. Efecto del plasma seminal sobre la supervivencia de espermatozoides criopreservados de alpaca. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009.
11. Kershaw-Young CM, Maxwell WMC. The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. *Theriogenology*. 2011 Oct 15;76(7):1197–206.
12. Aisen EG, Huanca López W, Pérez Durand MG, Torres Mamani E, Villanueva Mori JC, Ousset MJ, et al. Spermatozoa Obtained From Alpaca vas deferens. Effects of Seminal Plasma Added at Post-thawing. *Front Vet Sci*. 2021 Feb 10;0:48.
13. Fumuso FG. Efecto del plasma seminal sobre los espermatozoides criopreservados de llama (*Lama glama*). Universidad de Buenos Aires; 2018.
14. Huanca W, Cordero A, Huanca Mamani T, Adams GP. Reproductive biotechnologies in domestic South American camelids: advances and perspectives . *Arch Latinoam Prod Anim*. 2007;15(1).
15. Valdivia M, Ruiz M, Bermúdez L, Quinteros S, Gonzales A, Manosalva I, et al. Criopreservación de semen de alpacas. II congreso Mundial sobre camélidos. Cusco, Perú; 1999.
16. Banda J, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, et al. Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de

- espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. Rev Investig Vet del Perú . 2010;21(2):145–53.
17. Santiani A, Ugarelli A, Evangelista S. Characterization of functional variables in epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using imaging flow cytometry. Anim Reprod Sci. 2016 Oct 1;173:49–55.
 18. Choez Aguilera KR. Determinación de la concentración óptima de distintos agentes crioprotectores para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. Repositorio de Tesis - UNMSM. [Lima, Perú]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2016.
 19. Zurita Burmester RA. Evaluación de glicerol, etilenglicol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y dimetilacetamida como agentes crioprotectores durante el proceso de criopreservación de espermatozoides de alpaca. [Lima, Perú]: Universidad Científica del Sur; 2019.
 20. Juárez J, Santiani A. Determinación del porcentaje de viabilidad espermática mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación en espermatozoides obtenidos de epidídimo de alpaca. Rev Investig Vet del Perú. 2019 Oct 10;30(3):1175–83.
 21. Marino Terreros C, Wilfredo Huanca L, Irma Arriaga C, Antonio Ampuero B. Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. Rev Investig Vet del Peru. 2015;26(3):420–6.
 22. Tibary A, Vaughan J. Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: A review and clinical observations. Small Rumin Res. 2006 Feb

- 1;61(2-3 SPEC. ISS.):283–98.
23. Morton KM, Bathgate R, Evans G, Maxwell WMC. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-, Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reprod Fertil Dev.* 2007 Sep 26;19(7):792.
 24. Canorio Pariona NM. Efecto del proceso de criopreservación sobre las proteínas antioxidantes GPX1 Y GPX4 de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). Repositorio de Tesis - UNMSM. [Lima, Perú]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
 25. Torres Mamani EY. Efecto de la adición de plasma seminal antes y después de la congelación de espermatozoides colectados del conducto deferente de alpaca sobre algunas características espermáticas. [Puno]: UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO; 2018.
 26. Contreras W, García LR, Santiani A. Evaluación de dimetilacetamida y dimetilformamida como agentes crioprotectores para espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). *Rev Investig Vet del Perú.* 2020 Mar 29;31(1):e17548.
 27. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Adv Urol.* 2012;
 28. Morris J, Acton E, Murray B, Fonseca F. Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryobiology.* 2012 Apr 1;64(2):71–80.
 29. Gadella BM, Visconti PE. Regulation of capacitation. In: De Jonge CJ, Barratt C,

- editors. The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration. Cambridge University Press; 2006. p. 134–69.
30. Gadella BM, Miller NGA, Colenbrander B, Van Golde LMG, Harrison RAP. Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: Elimination of labeling artifacts. *Mol Reprod Dev.* 1999 May 1;53(1):108–25.
 31. Demchenko AP. Beyond annexin V: Fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology.* 2013 Mar 14;65(2):157–72.
 32. Silva PFN, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. In: *Theriogenology.* Elsevier Inc.; 2006. p. 958–78.
 33. Ortega Ferrusola C, González Fernández L, Morrell JM, Salazar Sandoval C, Macías García B, Rodríguez-Martínez H, et al. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C 11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction.* 2009 Jul 1;138(1):55–63.
 34. Aitken RJ. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev.* 2017 Oct 1;84(10):1039–52.

ANEXO 1

4/7/22, 3:34 PM

Correo: jhoana jimenez carpio - Outlook

[Revista MVZ Córdoba] Acuse de recibo de su manuscrito

Revista MVZ Córdoba <revistas@correo.unicordoba.edu.co>

Jue 07/04/2022 15:27

Para: Jhoana Stefani Jimenez Carpio <jimenez.jhoana@hotmail.com>

Jhoana Stefani Jimenez Carpio:

Gracias por enviar el manuscrito, "Estudio del estrés oxidativo en espermatozoides criopreservados de alpaca con diferentes concentraciones de plasma seminal" a Revista MVZ Córdoba. Con nuestro sistema de gestión de revistas en línea, podrá iniciar sesión en el sitio web de la revista y hacer un seguimiento de su progreso a través del proceso editorial:

URL del manuscrito: <https://revistamvz.unicordoba.edu.co/authorDashboard/submission/2833>

Nombre de usuario/a: jhoana

En caso de dudas, contacte conmigo. Gracias por elegir esta revista para publicar su trabajo.

Revista MVZ Córdoba

El siguiente mensaje se está enviando a nombre de Revista MVZ Córdoba.

ANEXO 2



RESOLUCIÓN DIRECTORAL ACADÉMICA DE CARRERA N° 069-DACMVZ- DAFCVB-U. CIENTÍFICA-2021

Lima, 05 de abril de 2021

Visto el proyecto de tesis presentada por **JHOANA STEFANI JIMENEZ CARPIO**, bachiller de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, se expide la presente Resolución:

CONSIDERANDO:

- ✓ Que, para optar el título profesional de Médico Veterinario Zootecnista en la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Científica del Sur, es necesario la realización y sustentación de una tesis.
- ✓ Que, el Reglamento de Tesis pertinente, dispone que el Proyecto de Tesis debe ser presentado a la Carrera de acuerdo al perfil aprobado, el cual debe ser dictaminado por el Comité de Investigación.
- ✓ Que, **JHOANA STEFANI JIMENEZ CARPIO**, ha cumplido con presentar su proyecto de tesis titulado **"EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PLASMA SEMINAL SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO EN EL ESPERMATOZOIDE CRIOPRESERVADO DE ALPACA"**, bajo la Asesoría de la **Mg. SHIRLEY SUJEY EVANGELISTA VARGAS**.
- ✓ Que la Comisión de Grados y Títulos de la Carrera ha emitido una evaluación favorable, habiendo sido aceptado por el Comité de Ética y recomienda la inscripción del proyecto citado.

Estando a lo dispuesto por el Reglamento General de la Universidad Científica del Sur, el Reglamento de Tesis de la Carrera y a las normas vigentes, en uso de las atribuciones conferidas a la Carrera,

SE RESUELVE:

1. **AMPLIAR** el plazo de sustentación del Proyecto de Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario Zootecnista titulado: **"EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PLASMA SEMINAL SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO EN EL ESPERMATOZOIDE CRIOPRESERVADO DE ALPACA"**.
2. Declarar a **JHOANA STEFANI JIMENEZ CARPIO**, expedita para la realización del Proyecto de Tesis aprobado.
3. **JHOANA STEFANI JIMENEZ CARPIO** tendrá hasta el 05 de agosto del 2021 para presentar la tesis concluida.

Regístrese, comuníquese y archívese.



M.V.Z. María Lourdes Velarde Marcos
Decana de la Carrera de Medicina
Veterinaria y Zootecnia

T// (51) 610 6738
informes@cientifica.edu.pe
cientifica.edu.pe