



**UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y BIOLÓGICAS**

**“DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN INTRACELULAR DE ANIÓN SUPERÓXIDO Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE ALPACA”**

**Tesis para optar el Título profesional de:**

**MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**XIMENA TRELLES MARÍN**

**BACHILLER EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**LIMA, PERÚ**

**2015**

## **DEDICATORIAS**

A Dios, por que sin él nada es posible, por cada momento bueno o malo en la vida, porque cada uno me llevó donde estoy ahora.

A mi mamá, por la paciencia, el apoyo, ser esa fuerza en todos los aspectos de mi vida y el ejemplo de mujer que un día quiero ser.

A mi papá, por los engrimientos, buenos consejos y el apoyo a lo largo de toda la carrera.

A mis hermanos, Claudia y Jorge Luis por ser un ejemplo en mi vida y por haberme dado los sobrinos más hermosos del mundo Sebastián, Camila y Sofía.

A Genito, por ser mi mejor amiga y cómplice, gracias por darme tu tiempo y cariño.

A Gerson, por ser esas ganas de ser mejor, por enseñarme que hay que luchar hasta el final por conseguir lo que uno quiere y acompañarme a soñar muy alto.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director de tesis el Dr. Alexei Santiani por brindarme su apoyo para lograr una meta más en mi vida convertirme en Médico Veterinario.

A la Dra. Shirley Evangelista por haber sido una guía y amiga durante el transcurso de todo el proyecto.

A mi amigo Daniel Muchotrigo Lugo por su ayuda, colaboración y llenar de alegría cada momento.

A la Universidad Científica del Sur, por haber sido mi segundo hogar durante 5 años y seguir dándome su apoyo luego de graduarme para realizar mi tesis sin ninguna dificultad.

## ÍNDICE

I. Introducción.....	1
II. Revisión Bibliográfica.....	3
2.1 Características del semen de camélido sudamericano.....	3
2.2 Criopreservación de semen.....	4
2.2.1 Principios de criopreservación.....	5
2.2.2 Proceso de criopreservación.....	6
2.2.3 Criopreservación de espermatozoides en alpaca.....	7
2.2.4 Dilutores y agentes crioprotectores.....	8
2.2.5 Efectos de la criopreservación en la función espermática.....	10
2.3 Especies reactivas de oxígeno.....	11
2.3.1 Estrés oxidativo seminal.....	12
2.3.2 Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el semen.....	13
2.3.3 Efectos fisiológicos de especies reactivas de oxígeno (ROS) en espermatozoides.....	14
2.3.4 Efectos patológicos de especies reactivas de oxígeno (ROS) en espermatozoides.....	16
2.3.5 Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la criopreservación.....	17
III. Materiales y Métodos.....	18
3.1 Lugar de estudio.....	18
3.2 Fase pre experimental.....	19
3.2.1 Selección de machos.....	19
3.2.2 Colecta de semen.....	19
3.2.3 Manejo inicial de eyaculados.....	19
3.2.4 Proceso de criopreservación.....	20
3.3 Fase experimental.....	20
3.3.1 Anión superóxido.....	21
3.3.2 Peróxido de hidrógeno.....	21
3.3.3 Evaluación espermática.....	22

3.4 Análisis estadístico.....	22
IV. Resultados.....	23
V. Discusión.....	28
VI. Conclusión.....	30
VII. Recomendaciones.....	30
VIII. Referencias Bibliográfica.....	31

### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Porcentaje de espermatozoides vivos de alpaca reactivos para anión superóxido durante la curva de enfriamiento, período de estabilización y pos descongelamiento... 25

Figura 2: Porcentaje de espermatozoides vivos de alpaca reactivos para peróxido de hidrógeno durante la curva de enfriamiento, período de estabilización y pos descongelamiento.....25

Figura 3: Porcentaje de motilidad de espermatozoides de alpaca durante la curva de enfriamiento, período de estabilización y pos descongelamiento..... 26

Figura 4: Espermatozoides de alpaca evaluados a través de microscopia de campo claro (a,c) y de fluorescencia (b,d) (400X)..... 27

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Porcentaje de espermatozoides vivos de alpaca reactivos para anión superóxido, peróxido de hidrógeno y porcentaje de motilidad espermática durante la curva de enfriamiento, período de estabilización y pos descongelamiento..... 23

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
DCFH-DA	Dichlorodihydrofluorescin diacetate
DHE	Dihidroetidio (Dihydroethidium)
DMA	Dimetil acetamida (Dimethylacetamide)
GPx	Glutation peroxidasa
NADH	Nicotinamina adenina dinucleótido reducida
NADPH	Nicotinamina adenina dinucleótido fosfato
PBS	Fosfato buferado salino
PI	Ioduro de propidio
PMN	Polimorfos nucleares
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa

## LISTA DE FÓRMULAS QUÍMICAS

Anión superóxido	$O_2^-$
Óxido nítrico	NO
Peróxido hidrógeno	$H_2O_2$
Peróxido lipídico	ROOH
Radical hidroxilo	OH.
Radical lipídico	R.
Radical lipídico peroxilo	ROO

## RESUMEN

El estudio tuvo por objetivo evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el proceso de criopreservación de semen de alpaca, a través del uso de fluorocromos específicos, para la determinación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Se utilizaron 12 eyaculados provenientes de 5 alpacas macho. Las muestras de semen fueron sometidas a una curva de enfriamiento (35°C hasta 5°C en un periodo de 90 minutos), luego se adicionó el crioprotector Dimetilacetamida (DMA) y se dejó estabilizar por 30 minutos a 5°C. Finalmente, las muestras fueron expuestas a vapor de nitrógeno por 15 minutos y posteriormente sumergidas en nitrógeno líquido. La determinación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno fue realizada durante la curva de enfriamiento a (25°C, 15°C y 5°C), período de estabilización a (5°C durante 15 minutos' y 5°C durante 30 minutos) y luego del proceso de descongelamiento. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) fueron evaluados en los siguientes grupos: (25°C, 15°C, 5°C, 5°C 15', 5°C 30' y pos descongelamiento) La determinación de la producción de anión superóxido se realizó utilizando la prueba molecular *Dihydroethidium* (DHE), mientras que la determinación de la producción de peróxido de hidrógeno se realizó utilizando *dichlorohydrofluorescein diacetate* (DCFH-DA), en ambos casos se observaron las láminas con microscopio de fluorescencia, contabilizando 100 espermatozoides por muestra.

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) fue aumentando a medida que las temperaturas iban disminuyendo, observándose los niveles más altos cuando las temperaturas alcanzaron los 5°C, sin embargo posterior al descongelamiento se observó una leve disminución en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se concluye que durante el proceso de criopreservación se produce un incremento en los porcentajes de espermatozoides que producen especies reactivas de oxígeno (ROS) (anión superóxido y peróxido de hidrógeno), siendo este efecto mayor al final de la curva de enfriamiento.

**Palabras clave:** espermatozoides, criopreservación de semen, especies reactivas de oxígeno y alpaca.



## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the production of reactive oxygen species (ROS) during the cryopreservation of alpaca sperm through the use of fluorescence microscopy in samples incubated with specific fluorochromes for the determination of superoxide anion and hydrogen peroxide. 12 ejaculates from 5 alpaca males were used. Semen samples were subjected to a cooling curve (35 ° C to 5 ° C over a period of 90 minutes), then the cryoprotectant Dimethylacetamide (DMA) was added and allowed to stabilize for 30 minutes at 5 ° C. Finally, the samples were exposed to nitrogen vapor for 15 minutes and subsequently immersed in liquid nitrogen.. Determination of superoxide anion and hydrogen peroxide was carried out during the cooling curve (25 ° C, 15 ° C and 5 ° C), stabilization period (5 ° C 5 ° C 15 '30') and after thawing. Reactive oxygen species (ROS) production was evaluated in the following groups: 25 ° C, 15 ° C, 5 ° C, 5 ° C 15', 5 ° C 30' and after thawing. The superoxide anion production was performed using *Dihydroethidium* (DHE), while the determination of hydrogen peroxide production was conducted using *dichlorohydrofluorescein diacetate* (DFCH-DA), in both cases the slides were observed using the fluorescence microscope, counting 100 sperm per sample.

The production of reactive oxygen species (ROS) was increased as temperatures were decreasing, showing the highest levels when temperatures reached 5 ° C, however post-thaw was observed a slight decrease in the production of reactive oxygen species (ROS). It is concluded that during the process of cryopreservation is an increase in the percentage of sperm that produce reactive oxygen species (superoxide anion and hydrogen peroxide), being greatest effect at the end of the curve.

**Key words:** sperm, semen cryopreservation, reactive oxygen species (ROS) and alpaca.