

Artículo de investigación

Actividad de la superóxido dismutasa cu/zn en plasma seminal e integridad de la membrana plasmática en semen de cerdo (*Sus scrofa domestica*) conservado con melatonina

Activity of the superoxide dismutase Cu /Zn in seminal plasma and integrity of plasmatic membrane in semen of boar (*Sus scrofa domestica*) conserved with melatonin

Flores-Solano C^{*1}, Meléndez C¹; Carmona G², Márquez Y¹, Mendoza C¹, Vilanova L¹

¹Unidad de Investigación en Ciencias Funcionales Dr. Haity Moussatché (UNIHM), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA), Barquisimeto (Lara, Venezuela). ² Servicios Agroveterinarios VETCLASS. Telf. 0251-2592409. e-mail: caf06@hotmail.com

RESUMEN

Esta investigación tiene como objetivo determinar el efecto de la melatonina sobre el superóxido dismutasa (SOD) en el plasma seminal e integridad de membrana espermática durante la conservación a 16°C. Metodología: Se tomaron muestras seminales de verracos entre 7-18 meses de edad mediante técnica manual de extracción de mano enguantada en Inversiones Porcinas C.A. Las muestras óptimas fueron diluidas y divididas en alícuotas: control (con diluyente), control con vehículo (diluyente y etanol), semen con melatonina (1,25 mM) almacenándose las alícuotas a 16°C para posterior valoración al día 0 y 1 de la preparación. Se evaluó la actividad enzimática de la SOD (kit comercial Cayman[®]) e integridad de membrana (test hipo-osmótico). Los resultados se analizaron mediante ANOVA, con paquete estadístico SPSS 15.0 para Windows con $p < 0,05$. Resultados: las muestras con melatonina el día 0 presentaron actividad enzimática mayor sin diferencias significativas, sostenida hasta el día 01 con la significancia ($p < 0,05$) en comparación al grupo control; con respecto a la integridad de membrana (HOST+) las muestras con melatonina presentaron una elevación significativa ($p < 0,05$) del porcentaje de espermatozoides HOST+ en diferencia a otros grupos al día 0 de conservación, manteniéndose el día 01 de conservación. Conclusión: La melatonina mejora la actividad de la SOD en plasma seminal e integridad de membrana durante la conservación de semen cerdo a 16°C.

Palabras clave: SOD, semen, integridad de membrana, melatonina.

ABSTRACT

The objective of this research is to determine the effect of melatonin on superoxide dismutase (SOD) in seminal plasma and sperm membrane integrity during storage at 16°C. Methodology: Boar seminal samples were taken between 7-18 months of age using manual technique of gloved hand extraction in Inversiones Porcinas C.A. The optimal samples were diluted and aliquoted: control (with diluent), vehicle control (diluent and ethanol), semen with melatonin (1.25 mM), aliquots being stored at 16°C for subsequent evaluation at day 0 and 1 of the preparation. The enzymatic activity of SOD (commercial kit Cayman[®]) and membrane integrity (hypo-osmotic test) was evaluated. The results were analyzed by means of ANOVA, with statistical package SPSS 15.0 for Windows with $p < 0.05$. Results: the samples with melatonin on day 0 presented greater enzymatic activity without significant differences, sustained until day 01 with significance ($p < 0.05$) in comparison to the control group; with respect to membrane integrity (HOST +) the samples with melatonin presented a significant elevation ($p < 0.05$) of the percentage of HOST + sperm in difference to other groups at day 0 of preservation, keeping on day 01 of conservation. Conclusion: Melatonin improves the activity of SOD in seminal plasma and membrane integrity during the conservation of pig semen at 16 °C.

Key words: SOD, semen, membrane integrity, melatonin.

Recibido: 05-10-2017

Aceptado: 08-11-2017

INTRODUCCIÓN

En el cerdo la preservación del semen es limitada debido a que los espermatozoides de esta especie son especialmente sensibles a temperaturas por debajo de 15°C las cuales generan daños en la membrana plasmática y en el acrosoma; lo que altera la viabilidad y la funcionalidad de la célula espermática [1]. Tales efectos de la conservación seminal se han relacionado con la producción excesiva de radicales libres (RL) en el espermatozoide [2] que induce a la lipoperoxidación que conlleva a disminución del potencial de la membrana mitocondrial y aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática [3].

Si bien los espermatozoides son sensibles al estrés oxidativo, también están equipados con un sistema antioxidante [2] en el plasma seminal e intracelular, los cuales están armónicamente integrados [4,5] para contrarrestar los efectos tóxicos de las ERO [2]. Dentro del sistema antioxidante enzimático del semen destacan la Superóxido Dismutasa (SOD) [6] que en plasma seminal juega un papel protector contra la peroxidación lipídica de espermatozoides en muestras normozoospermicas de humanos [7] y se ha podido constatar que a lo largo de la curva de enfriamiento del proceso de criopreservación y al post-descongelamiento la concentración de esta enzima disminuye, dejando expuesto a los espermatozoides a la acción de los RL, factor determinante para el potencial de fertilización de los espermatozoides y la infertilidad masculina [8]. Por tales motivos, se han realizado estudios con el uso de diferentes antioxidantes (vitamina C y vitamina E) en los diluyentes para evitar el efecto deletéreo de los RL durante la conservación espermática en diferentes especies [2]. Reiter y col. [9] han demostrado la actividad antioxidante de la melatonina con efectos superiores a otros antioxidantes (E, C y N-acetilcisteína) a nivel de células hepáticas y una de sus principales cualidades es que varios de los metabolitos, como el N1-acetil-N2-formil 5-methoxykynuramine (AFMK) y N1-acetil-5-methoxykynuramine (AMK), que resultan de la interacción de la melatonina con el radical hidroxilo funcionan también como eliminadores de RL, es decir, que una molécula de melatonina puede neutralizar hasta 3 radicales libres [9, 10, 11]. Con base a estos antecedentes, la presente investigación se planteó como objetivo determinar el efecto de la adición de melatonina sobre la actividad de la SOD en plasma seminal y la permeabilidad de membrana durante la conservación de semen de cerdo diluido.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación es un estudio de tipo experimental con un diseño controlado, realizada en la Unidad de

Ciencias Funcionales “Dr. Haito Moussatché,” (UNIHM) del Decanato de Ciencias Veterinarias de la UCLA-Venezuela.

Población y Muestra: Las 20 muestras de semen para el estudio, fueron tomadas de verracos, de 7-18 meses de edad y de razas Landrace, Large White y Duroc, procedentes de la granja de reproductores de Inversiones Porcinas C.A., ubicada en la carretera vieja Yaritagua-Barquisimeto, estado Yaracuy-Venezuela. Los machos reproductores seleccionados como donadores de semen eran animales sanos, mantenidos en condiciones óptimas de salud, en un hábitat limpio y con una nutrición balanceada, siguiendo lo establecido en el Código de Ética para la Vida de la República Bolivariana de Venezuela (2010) en su segunda parte capítulo 3.

Toma de muestra: La recolección de la muestra seminal se realizó mediante masaje peneano con mano enguantada en un potro adecuado para tal fin. Luego de obtener las muestras experimentales, fueron analizadas en el laboratorio de la granja y las que cumplían con los criterios de selección seminal para los programas de inseminación artificial, fueron diluidas para su conservación a 16 °C con diluyente comercial para semen de cerdo (MR-A®), tomando en cuenta el volumen y la densidad óptica del eyaculado.

Manejo de la Muestra: De cada eyaculado seleccionado al azar, el primer día (día 0) se prepararon 3 alícuotas de cinco (5) ml las cuales fueron etiquetadas como control (sólo con diluyente MR-A®) control con el vehículo (etanol) y la alícuotas con melatonina (Sigma®) a 1,25 mM, esta última diluida y agregada a razón de 20 µl/ml de semen diluido.

Determinación de la Superóxido Dismutasa: Para la preparación de la muestra, se tomó 1,5 mL de semen diluido y colocada en un tubo Eppendorf® para ser centrifugada a 1000 X g por 10 minutos a 4 °C en microcentrifuga de Eppendorf® 5402, para separar de esta manera las células espermáticas del plasma seminal, esta última para la determinar la SOD-CuZn del plasma seminal, mediante el kit comercial (Cayman®) y los resultados fueron expresados en U de SOD/ mg de proteínas.

Las proteínas totales se determinaron mediante el kit Bio Rad (Richmond, CA, EE.UU.) basado en el método de Bradford [12].

Test hipo-osmótico (HOST+): El Test hipo-osmótico evalúa la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides mediante la observación de alteraciones morfológicas que sufren las células espermáticas al ser expuestas a condiciones de hipotonía, lo que causa una edematización entre la membrana plasmática y la membrana acrosómica externa, incluso enrollamiento en el flagelo, debido al intento celular de restablecer un equilibrio entre los compartimientos intra y extracelular. Para realizar la prueba se preparó una solución hipoosmótica (100

Actividad de la superóxido dismutasa en plasma seminal.

mosmol/l) con 490 mg de citrato de sodio y 900 mg de fructosa por cada 100 ml de agua destilada. De esta solución se tomaron 100 μ l por cada 25 μ l de muestra de semen diluido y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. La valoración se colocó en un portaobjetos (75 μ l de la muestra) y se dispuso una lámina cubreobjetos para ser observada con microscopio luz polarizada (Olympus® CX-21, Olympus, Latinoamérica Inc, México) y objetivo 40X. Se consideraron positivos aquellos espermatozoides en los que se observó cualquier grado de torsión helicoidal de la cola ("swelling"), contándose 100 espermatozoides por cada muestra. Las lecturas se realizaron el mismo día en que fue procesado el semen.

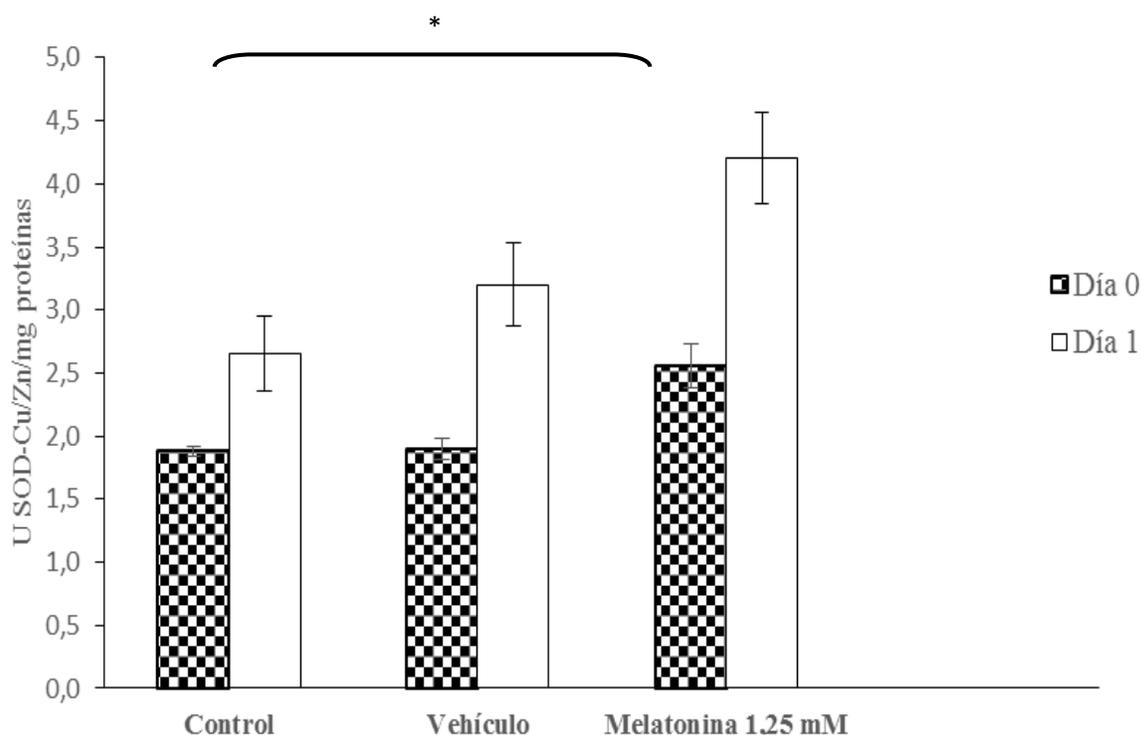
Técnicas de procesamiento y análisis de datos: Los datos fueron analizados mediante paquete estadístico SPSS 15.0 para Windows y se realizó ANOVA de un factor con un criterio de clasificación ($p < 0,05$).

RESULTADOS

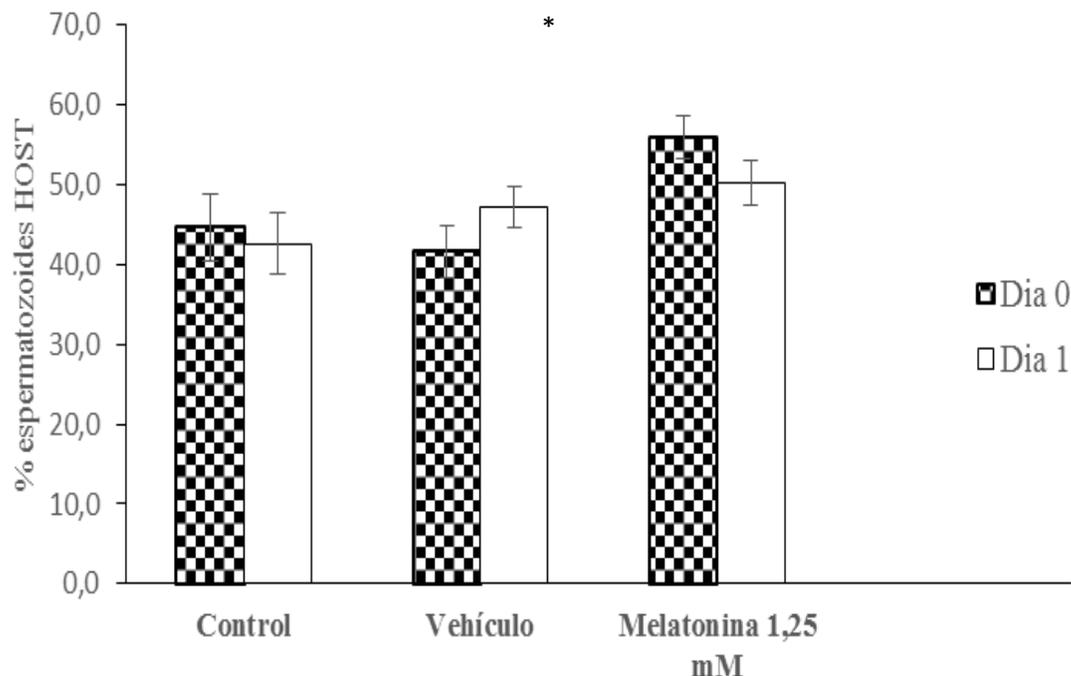
Al evaluar la SOD-Cu/Zn del plasma seminal en las muestras con melatonina presentaron actividad enzimática mayor sin diferencias significativas el día 0 de conservación; esta elevación se mantuvo hasta el día 1 llegando a la significancia ($p < 0,05$) con respecto al grupo control (Gráfica 1).

En lo que respecta a la integridad de membrana (HOST+) las muestras con melatonina presentaron una elevación significativa ($p < 0,05$) del porcentaje de espermatozoides HOST+ con respecto a todos los grupos el día 0 de conservación; esta diferencia se mantuvo el día 1 de conservación pero sin llegar a la significancia ($p < 0,05$) (Gráfica 2).

Gráfica 1. Niveles de SOD-Cu/Zn en plasma seminal, en semen diluido de cerdos de 7-19 meses de edad, el día 0 y 1 de conservación a 16°C con melatonina (1,25 mM). *Diferencias significativas del semen con melatonina con respecto a las muestras con las muestras controles al día 1 de conservación. ANOVA ($p < 0,05$).



Gráfica 2. Integridad de membrana (HOST positivo) en semen diluido de cerdos de 7-19 meses de edad, el día 0 y 1 de conservación a 16°C con melatonina (1,25 mM). *Diferencias significativas del semen con melatonina el día 0 de conservación con respecto a las muestras control y vehículo al día 1 de conservación con las muestras con vitamina E. ANOVA (p<0,05).



DISCUSIÓN

Estos resultados muestran datos sobre la presencia de La criopreservación espermática es una biotecnología de gran trascendencia, debido a que tiene un papel relevante en la conservación y difusión de recursos genéticos.

Sin embargo, en el cerdo esta técnica no ha tenido tanto éxito como el obtenido en bovinos, por lo tanto el manejo del semen de cerdo para reproducción asistida es principalmente en fresco o conservado mediante refrigeración a 16°C [13]. Además, la conservación de semen es un procedimiento que genera estrés oxidativo (EO) al incrementar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) y al disminuir la disponibilidad de los antioxidantes endógenos [2]. Este evento puede causar daño oxidativo en los espermatozoides durante el almacenamiento y ser la causa de disminución de la movilidad y fertilidad, por lo que se ha evaluado utilizar antioxidantes exógenos [14] que contrarrestan los efectos nocivos de los RL en el semen tanto *In vitro* como *in vivo* con efecto beneficioso sobre la fertilidad [15], por lo que su uso se recomienda como terapia de apoyo para el tratamiento de la infertilidad en los hombres, así como se ha

demostrado que la suplementación con antioxidantes durante la conservación proporciona un efecto crioprotector sobre la calidad del espermatozoide de los mamíferos [16].

En esta investigación la melatonina a una concentración 1,25 mM presentó acción antioxidante en el semen de cerdo el día 0 y 1 de conservación a 16 °C, con aumento significativo de la actividad enzimática de la SOD en el plasma seminal al día 1 de conservación, efectos similares se obtuvieron en otras investigaciones en diferentes especies lo que demuestra que la melatonina protege a los espermatozoides contra el estrés oxidativo [17, 18, 19, 20, 21] al mantener la actividad de la SOD, efecto deseado para mantener la calidad seminal durante la conservación debido a que la SOD del plasma seminal en el cerdo juega un papel fisiológico importante en la lucha contra el estrés oxidativo en los espermatozoides [3], lo cual fue demostrado por Zhang [22] al adicionar SOD al semen de cerdo conservado a 17°C, donde se observó disminución de los niveles de MDA, H₂O₂ con mantenimiento de la calidad seminal.

Otro elemento a tomar en cuenta cuando se evalúa la calidad seminal, es la integridad de la membrana plasmática, esencial para mantener la morfología y

Actividad de la superóxido dismutasa en plasma seminal.

capacidad fecundantes del espermatozoide [23], los RL en exeso propician la lipoperoxidación de la membrana plasmática del espermatozoide, lo que genera profundos cambios en esta en cuanto a la organización y función [24, 25] e incluso llevar a la muerte celular [26]. La melatonina en esta investigación, protegió la integridad de membrana (HOST+) durante la conservación, efecto deseado debido a que se ha encontrado correlaciones altas y positivas con la fertilidad in vivo [23], resultados que coincide con otras investigaciones realizadas en toros [27] y búfalos [20], lo que estaría relacionado con el efecto antioxidante de la melatonina.

CONCLUSIÓN

Con base en los resultados se puede concluir que la melatonina a 1,25 mM, mejora la actividad de la SOD en plasma seminal y la integridad de membrana durante la conservación de semen cerdo a 16°C.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" bajo el código N° 1024-VE-2016

BIBLIOGRAFÍA

[1] Sánchez R. Congelación de semen en porcino. Historia y evolución. 2007. Disponible en URL: <http://www.3tres3.com/los-expertos-opinan/congelacion-de-semen-en-porcino-historia-y-evolucion-1767>.

[2] Córdova-Izquierdo A, Ruiz-Lang CG, Córdova-Jiménez CA, Córdova-Jiménez MS, Guerra-Liera JE, Rodríguez-Denis BE, Salinas KA. Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *RCCV* 2009; 3: 01-38.

[3] Kowalowka M, Wysocki P, Fraser L, Strzerek J. Extracellular superoxide dismutase of boar seminal plasma. *Reprod Domest Anim*. 2008; 43(4):490-496.

[4] Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reprod* 2001; 122: 497-506.

[5] Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittwer FG. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet Méx* 2002; 33, 265-283.

[6] Hernández A, Hernández A, Barrientos M, Cervantes P, Domínguez B, Absalón-Medina VA. Actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD)

y glutatión peroxidasa (GSH-PX) del plasma seminal de cerdo en Veracruz, México. *AICA* 2015; 6:98-111.

[7] Tavalani H, Goodarzi MT, Vaisi-raygani A, Salimi S, Hassanzadeh T. Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa. *Int Braz J Urol*. 2008; 34(4):485-91.

[8] Lifeng Y, Jining L, Shengmin W, Shenghu Z, Guixiang J, Aihua G. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent European J Urol*. 2013; 66 (1): 60-67.

[9] Reiter R, Tan D, Manchester L, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell Biochem Biophys* 2001; 34:237-256.

[10] Rössmeyer A, Mayo J, Zelosko V, Sainz R, Tan D, Poeggeler B, Antolin I, Zsizsik B, Reiter R, Hardeland R. Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Rep* 2003; 8: 205-213.

[11] Tan D, Manchester L, Reiter R, Plummer B, Hardies L, Weintraub S, Vijayalaxmi T, Shepherd A. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253:614-620.

[12] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.

[13] Johnson L, Weize K, Fiser P, Maxwell W. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci* 2000; 62:143-172.

[14] Membrillo-Ortega A, Córdova A, Hicks J, Ivonne M, Martínez V, Valencia J. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. *INCI* 2003; 28: 699-704.

[15] Walczak-Jedrzejska R, Wolski JK, Lowikowska-Hilczer Jolanta S. Seminal superoxide dismutase activity and its relationship with semen quality and SOD gene polymorphism, *J Assist Reprod Genet*. 2014; 31(5): 549-554.

[16] Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int* 2011; Disponible en: URL: <https://www.hindawi.com/journals/vmi/2011/686137/>

[17] El-Raey M, Badr MR, Rawash ZM, Darwish MG. Evidences for the role of melatonin as a protective additive during buffalo semen freezing. *Amer J Anim Vet Sci* 2014; 9: 252-262.

[18] Jang H, Kim Y, Kim B, Park I, Cheong H, Kim J, Park C, Kong H, Lee H, Yang B. Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Reprod Domest Anim* 2010; 45: 943-950.

[19] Perumal P, Chamuah J, Nahak A, Rajkhowa C. Effect of seasons on semen production, effect of melatonin on the liquid storage (5 °C) with correlated study of birth rate in mithun (*Bos frontalis*). *As Pac J Reprod* 2015; 4:1-12.

[20] Perumal P, Kezhavituo V, Khate K. (2013). Effect of addition of melatonin on the liquid storage (5°C) of mithun (*Bos frontalis*) semen. *Inter J Zoo. Disponible en: URL: http: file:///D:/Downloads/642632.pdf. [Consulta 16 Enero, 2017].*

[21] Succu S, Berlinguer F, Pasciu V, Satta V, Leoni G, Naitana S. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *J Pineal Res* 2011; 50:310-318.

[22] Zhang XG, Li H, Wang L, Hao YY, Liang GD, Ma YH, Yang GS, Hu JH. The effects of different levels of superoxide dismutase in Modena on boar semen quality during liquid preservation at 17°C. *Anim Sci J* 2017; 88(1):55-62.

[23] Quintero A, Rubio-Guillén J, Rigau T, Rodríguez JE. El test de resistencia hiperosmótica: un test de gran utilidad para medir la función espermática en semen de verraco. *Rev Cient BIOTAM*. 2005; II: 409-410.

[24] Tortolero I, Arata-Bellabarba G, Alfonso J, Gómez R, Regadera J. Estrés oxidativo y función espermática. *Rev Venez Endocrinol Metab.* (2005); 3 (3): 12-19.

[25] Villa N, Castaño D, Duque P, Ceballos A. Actividad de la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa en sangre y plasma seminal en caballos colombianos. *Rev Colomb Cs Pec.* 2012; 25(1): 64-70

[26] Sánchez R, Arboleda G. Mitocondria y muerte celular. *Invest Nova* 2008; 6 (10):190-200.

[27] Mohamed E, Badr MR, Rawash ZM, Darwish GM. Evidences for the role of melatonin as a protective additive during buffalo semen freezing. *Amer J Anim Vet Sci.* 2014; 9(4):252-262.